

Nachweis und Quantifizierung von Nanopartikeln

Der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

der Universität Leipzig

eingereichte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Dipl.-Biochem. Marco Dorn

geboren am 13.08.1983 in Dresden

Leipzig, den 20.02.2015

(Datum der Verteidigung)

Bibliographische Beschreibung

Dorn, Marco

Nachweis und Quantifizierung von Nanopartikeln

Universität Leipzig, Dissertation

174 Seiten, 214 Literaturzitate, 65 Abbildungen, 7 Tabellen

Nanopartikel stellen ein potentiell Gesundheitsrisiko dar. Andererseits spielt die Nanotechnologie eine Schlüsselrolle bei der technologischen Entwicklung. Deshalb ist es notwendig das Risikopotential was von Nanopartikeln ausgeht zu bewerten. Diese Arbeit adressiert diese Problemstellung, indem die wirksame Dosis von Nanopartikeln in einzelnen Zellen und Alveolen quantifiziert wird, und so ein neues Dosis-Konzept zum Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Studien erlaubt.

Lungenepithelzellen stellen die wichtigste Barriere zur Aufnahme von industriell relevanten Nanopartikeln im Alltag dar. In dieser Dissertation wurden die Metalloxid-Nanopartikel Al_3O_3 , TiO_2 , Fe_3O_3 , ZnO und CeO_2 in einzelnen Lungenzellen und Alveolen des Lungengewebes mit Hilfe der Ionenstrahlmikroskopie orts aufgelöst nachgewiesen und quantifiziert. Die zelluläre Internalisierung ausgewählter Nanopartikel wurde mit Hilfe des Protonen-Rückstreusignals untersucht.

Biologische Proben und insbesondere Einzelzellen, neigen wegen ihrer geringen Dicke, zu einer relativ geringen Intensität der charakteristischen Röntgenstrahlung. Ein höherer Probendurchsatz konnte erreicht werden, indem die Präparate auf einen Aluminiumrahmen übertragen, und eine kürzere Distanz zwischen Probe und Röntgendetektor kalibriert wurde.

Die Untersuchungen weisen nach, dass die Oberflächeneigenschaften für die Aufnahme der Partikel entscheidend sind. Die Metalloxid-Nanopartikel zeigen eine geringere zelluläre Konzentration, wenn die Oberfläche der Partikel mit einer Proteinhülle modifiziert ist. Gleichzeitig sind bei der Mehrzahl der Zellen, die Nanopartikel ebenfalls an der Zelloberfläche lokalisiert, wenn sie keine Proteinhülle tragen.

Sowohl in den Alveolen des Lungengewebes als auch in gedehnten primären Typ-II-Pneumozyten war eine stark inhomogene Verteilung der Nanopartikel-Konzentration zu beobachten. Hier liegt die Stärke der Ionenstrahlmikroskopie darin, die Konzentration in einzelnen Zellen bzw. Alveolen erfassen zu können. Dadurch erlaubt es diese Arbeit, das Risiko abzuschätzen, was durch die Extremlastung in einzelnen Zellen entsteht.

In der Praxis ist es schwierig die applizierte Dosis als Risikomaß für die gesundheitliche Gefährdung zu verwenden, da die zelluläre Partikel Aufnahme von verschiedensten Faktoren wie z.B. der Applikationsform, der spezifischen Aufnahmebarriere oder den Oberflächeneigenschaften des Nanopartikels abhängig ist. Die Ionenstrahlmikroskopie erlaubt es, der wirksamen zellulären Dosis einen toxischen Effekt zuzuordnen. Dadurch ist das in dieser Arbeit neu eingeführte Dosis-Konzept für den systematischen Vergleich von toxikologischen Studien auf *in vitro* und *in vivo* Basis geeignet und trägt zur Reduktion von Tierversuchen bei.

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung	II
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung und generelle Eigenschaften von Nanopartikeln	1
1.1.1 Anwendungsbereiche und biologische Effekte von Nanopartikeln	1
1.1.2 Risikobewertung von Nanomaterialien	4
1.1.3 Lungengewebe als physiologische Barriere für Nanopartikel	4
1.1.4 Stabilität und Aggregationsverhalten der Nanopartikel-Dispersion im wässrigen Milieu	6
1.1.5 Protein-Korona	8
1.2 Zielsetzung	9
1.3 Charakterisierung und Anwendungsgebiete ausgewählter Nanopartikel	10
1.3.1 Zinkoxid (ZnO)	11
1.3.2 Cer(IV)-oxid (CeO ₂)	13
1.4 Methoden zum Nachweis und Quantifizierung von Nanopartikeln	14
1.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	14
1.4.2 Atomemissionsspektroskopie (AES)	15
1.4.3 Elektronenstrahlmikroanalyse (EMSA)	15
1.4.4 Durchflußzytometrie (FACS)	16
1.4.5 Ionenstrahlmikroskopie (IBM)	17
1.4.6 Massenspektrometrie (MS)	18
1.4.7 Radiolabeling	19
2. Material & Methoden	21
2.1 Eingesetzte Nanopartikel und deren Charakterisierung	21
2.1.1 Nanopartikelpräparation mittels Ultraschall	24

2.2	Probenpräparation	26
2.2.1	Beschichten von Probenhaltern	26
2.2.2	Kulturzellen	26
2.2.3	Gewebe	27
2.2.4	Dehnung von primären AT-II-Zellen	28
2.3	Technik der Ionenstrahlmikroskopie	28
2.3.1	Ionenstrahllaboratorium Lipsion	29
2.3.2	Probenkammer (Nanosonde)	30
2.3.3	Messvorgang und Fokussierung	32
2.3.4	Datenaufnahme- und Verarbeitung	34
2.3.5	Ladungsbestimmung	34
2.3.5.1	Apertur-Blende	34
2.3.5.2	Faraday-Becher	35
2.3.5.3	Fit des RBS-Spektrums	36
2.3.6	Totzeitkorrektur	37
2.4	Angewandte Methodik der Ionenstrahlmikroskopie	39
2.4.1	Rutherford-Rückstreu-spektrometrie (RBS)	39
2.4.1.1	Nicht-Rutherford-Effekt	42
2.4.1.2	RBS Spektrenauswertung	43
2.4.2	Proton-induzierte Röntgenemission (PIXE)	44
2.4.2.1	Spektrenauswertung mittels GeoPIXE II	47
2.4.3	Scanning Transmission Spectroscopy (STIM)	48
2.4.3.1	STIM-Kalibration	50
2.4.4	Aufbau und Kalibration des Röntgendetektors	51
2.5	Biophysikalische Methoden	53
2.5.1	Massenspektrometrische (ICP-MS) Elementquantifizierung von Zinkionen	53
2.5.2	Bestimmung des zellulären Volumens	55
2.6	Molekularbiologische Methoden	55
2.6.1	Kultivierung von Lungenzellen (A549)	55

2.6.2	Einfrieren und Auftauen von kultivierten Zellen	56
2.6.3	Passagieren von A549-Zellen	56
2.6.4	Zellzahlbestimmung	57
2.6.5	Toxizitätsnachweis	57
2.6.5.1	MTT-Test	57
2.6.5.2	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	58
2.6.5.3	Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH)	59
2.7	Statistische Auswertung	60
3.	Ergebnisse	61
3.1	Tiefenprofilanalyse (Z-Achse) der zellulären Nanopartikelaufnahme anahnd des Protonen-Rückstreusignals	61
3.1.1	Rutherford-Rückstreu-Analyse von biologischen Proben	61
3.1.2	RBS-Analyse im zellulären Kontext	64
3.1.2.1	Al ₂ O ₃	67
3.1.2.2	CeO ₂	68
3.1.2.3	ZnO	71
3.2	Quantitative Elementanalyse mittels PIXE	73
3.2.1	Optimierung des Elementnachweises	73
3.2.1.1	Charakterisierung der Absorber	74
3.2.1.2	Optimierung der Messanordnung des Röntgendetektors	75
3.2.1.3	Präzision der Elementanalyse	76
3.2.2	Optimierung des Trägermaterials zur Analyse von Lungengewebe	78
3.2.3	Einfluss des Puffers auf den zellulären Elementgehalt	79
3.3	Zellulärer Elementgehalt von Lungenepithelzellen	83
3.3.1	Allgemeiner Nachweis der Elementverteilung	83
3.3.2	Elementgehalt von primären AT-II-Zellen in Abhängigkeit der Dehnung	84
3.3.3	Nanopartikel im biologischen Milieu	86
3.4	Quantifizierung und Aufnahme von NP in Lungenzellen	88
3.4.1	Ortsaufgelöste Quantifizierung von Metalloxid-NP in A549-Zellen	89

3.4.2	CeO ₂	91
3.4.2.1	Kinetik und Dosisabhängigkeit der CeO ₂ -NP Aufnahme	91
3.4.2.2	Aufnahmemechanismus von CeO ₂ -NP	94
3.4.2.3	Atmung als selektiver Parameter der NP-Aufnahme	95
3.4.2.4	CeO ₂ -NP-Quantifizierung durch die Lichtstreuung	97
3.4.3	ZnO	99
3.4.3.1	Kinetik und Dosisabhängigkeit der ZnO-NP Aufnahme	99
3.4.3.2	Elementare Kollokalisierung nach ZnO-Exposition	100
3.4.3.3	Beziehung zwischen wirklicher zellulärer Dosis und Toxizität	101
3.4.3.4	Rolle freier Zink-Ionen	103
3.4.4	Graphen als Nanopartikel-Carrier	104
3.5	Quantitative Elementanalyse von Lungengewebe	107
3.5.1	Vergleich zwischen isolierten Einzelzellen und Gewebe	107
3.5.2	TiO ₂ -Aerosol	108
3.5.3	Zinkoxid-Aerosol	110
4.	Diskussion	112
4.1	Methodische Diskussion	112
4.1.1	Probenpräparation und Trägermaterial	112
4.1.2	Ladungsbestimmung	114
4.1.3	Grenzen und Möglichkeiten des Elementnachweises	116
4.2	Analyse des zellulären Rückstreusignals	117
4.3	NP-Nachweis in Lungengewebe	119
4.4	Elementgehalt von Lungenepithelzellen	122
4.4.1	Allgemeiner Nachweis des zellulären Elementgehalts	122
4.4.2	Elementgehalt von Lungenepithelzellen im Kontext zu anderen Zelltypen	123
4.4.3	NP-Postmodifikation durch Phosphor und Kalzium	127
4.4.4	Graphen als NP-Carrier	128

4.5	Quantifizierung von Nanopartikeln in Lungenzellen	129
4.5.1	Allgemeine Aussagen zur Aufnahme von Metalloxid-NP	129
4.5.2	CeO ₂	133
4.5.3	ZnO	136
4.5.4	Effektiv wirksame Dosis	137
5.	Zusammenfassung	140
6.	Summary	143
7.	Literaturverzeichnis	146
Danksagung		161
Selbständigkeitserklärung		162
Lebenslauf		163

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
ADC	Analog-Digital-Umsetzer (engl. Analog-Digital-Converter)
CNTs	Carbon Nanotubes
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DLS	Dynamic Light Scattering (dynamische Lichtstreuung)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
h	Stunde
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IBM	Ion Beam Microscopy
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
min	Minute
mm	Millimeter
MWCNTs	Multi-Walled Carbon Nano Tubes
NP bzw. NPs	Nanopartikel
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PAH	poly (allylamin hydrochlorid)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIXE	Particle- Induced X-Ray Emission
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
PSPM	poly(sulfopropyl methacrylate)
RBS	Rutherford-Backscattering-Spectrometry
ROI	region of interest
ROS	Reactive oxygen species
siRNA	Small interfering RNA
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
STIM	Scanning-Transmission-Ion-Microscopy
SWCNs	Single-Walled Carbon Nano Tubes
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
T _z	Totzeit
UV	Ultraviolett
Voxel	Datenpunkt in einer dreidimensionalen Rastergrafik
XRF	X-ray fluorescence

1. Einleitung

1.1 Bedeutung und generelle Eigenschaften von Nanopartikeln

1.1.1 Anwendungsbereiche und biologische Effekte von Nanopartikeln

Aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten erlangten Nanopartikel (NP) auch über den wissenschaftlichen Bereich hinaus große Beachtung. NP-Konstrukte werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt bereits in Autoreifen, Sportartikeln, Kosmetika, Sonnencreme, und elektronischen Gütern verwendet. Dabei zeigen neuartige Produktentwicklungen auf Nanopartikelbasis großes Potential im diagnostischen und medizinischen Bereich. In diesem Zusammenhang kommt der Sicherheits- und Toxizitätsbewertung dieser Anwendungen besondere Relevanz zu. Beispielsweise beträgt eine typische Applikationsmenge von TiO₂-NP in Sonnencreme 160 µg TiO₂ pro Quadratzentimeter¹. Gleichzeitig ist bekannt, dass TiO₂-Partikel unter Einwirkung von UV-Licht intrazellulär reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Wasserstoffperoxid produzieren können^{2 3}. Eine Penetration der NP in den intrazellulären Raum würde also eine starke und signifikante Schädigung der Zelle bewirken. Doch in diesen Zusammenhang war im Tiermodell die Penetrationstiefe von TiO₂ auf das stratum corneum begrenzt⁴.

Feinstaub ist ebenfalls ein Beispiel für den Kontakt mit Nanomaterialien im Alltag. Feinstaub enthält Partikel mit einem Durchmesser unterhalb von 10 µm. Oberhalb einer Größe von 2,5 µm können Partikel durch den Bronchialschleim aus der Lunge oder den Bronchien transportiert werden, während unterhalb dieser kritischen Größe die Partikel alveolengängig sind. Die Luftqualität in Städten wird dabei üblicherweise in Mikrogramm Feinstaub (Partikeldurchmesser < 10 µm) pro Kubikmeter Luft angegeben. In deutschen Städten liegt dieser Wert regulär im Bereich von 10 – 100, wobei Werte über 300 als gesundheitsschädlich klassifiziert sind. In asiatischen Metropolen konnten Werte von mehreren hundert µg/m³ beobachtet werden.

Während der Produktion oder Bearbeitung von Nanomaterialien ist, durch Staubbildung, das Risiko einer Aufnahme über die Lunge sehr hoch. Dabei werden bei ausgewählten NP-Stäuben ähnliche toxische Effekte vermutet wie bei Asbest⁵. Im Falle einer NP-Aufnahme in das Blut oder das Gewebe der Organe sind vielfältige Toxizitätsmechanismen der Nanopartikel möglich, welche im folgenden beschrieben werden sollen.

Nanomaterialien sind im Allgemeinen durch eine sehr große Oberfläche, welche mit abnehmenden Radius zunimmt, gekennzeichnet. Da an dieser Grenzfläche anisotrope Kräfte wirken können, ist es eher unwahrscheinlich das Nanopartikel inert sind. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass bei

NP mit kleineren Partikelgrößen (bspw. CuO) die Toxizität zunehmen kann^{6 7}. Allerdings hängt der Effekt nicht zwangsläufig von der Partikelgröße ab, sondern ist eher von den spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Partikels abhängig. Neben der Größe der Oberfläche, gibt es andere wichtige Faktoren, wie chemische Reaktivität, Oberflächen-Adsorption oder Oberflächen-Ladung, welche einen wichtigen Einfluss auf die Toxizität haben können.

Wird von einer Aufnahme eingeatmeter Partikel über die Lunge ins Blut ausgegangen, so ist durch die große Oberfläche eine Bindung von Proteinen sehr wahrscheinlich. Zu Beginn überwiegt hier die unspezifische Bindung zahlenmäßig im Überschuss vorhandener Proteine wie Albumin. Doch im Verlauf der Exposition tendieren diese dazu, durch spezifisch bindende Proteine geringerer Häufigkeit ersetzt zu werden. Im Fall von Albumin kann die Nanopartikel-Bindung zur irreversiblen Änderung der Protein-Konformation führen^{8 9}. Dies führt zur dauerhaften Exposition von physiologisch unbekanntem Epitopen an der Oberfläche des NP-Protein Komplexes. Folglich kann bei entsprechend vorhandener Zahl dieser Epitope eine chronische Entzündung generiert werden. Ebenfalls konnte in diesem Zusammenhang eine direkte Aktivierung von Inflammationsmarkern in vaskulären Endothelzellen (HUVEC) durch Fe₂O₃ und ZnO Nanopartikel gezeigt werden¹⁰. Dieses Ergebnis ist von besonderer Relevanz, da die Entzündung von Gefäß-Endothelzellen den ersten Schritt in der Entwicklung von Arteriosklerose darstellen kann¹¹.

Ein anderer wesentlicher Mechanismus, über welchen NP in der Lage sind Toxizitätseffekte hervorzurufen, ist die Produktion von ROS. Hierbei handelt es sich chemisch um äußerst reaktive Moleküle die Sauerstoff enthalten. Prominente Beispiele sind das Hydroperoxid-Anion (O₂^{·-}), das Hydroxyl-Radikal (HO[·]) und Wasserstoffperoxid. NP fungieren hierbei als Reduktionsmittel von Sauerstoffverbindungen. Allerdings ist der Mechanismus durch welchen NP ROS produzieren bisher unbekannt^{12 13}. Es wird angenommen, dass eine aktive Elektronenkonfiguration an der NP-Oberfläche einen Elektronen-Donor schafft^{14 15}. Oft führen ROS auch zu inflammatorischen Reaktionen. Beispielsweise konnte eine direkte Beziehung zwischen Größe der NP-Oberfläche, ROS-Produktion und inflammatorischer Wirkung in Lungengewebe festgestellt werden^{16 17}. Im Allgemeinen besteht ein Konsens darüber, dass die ROS-Produktion der häufigste und wichtigste Mechanismus ist über welchen NP toxische Effekte hervorrufen. Dies kann durch eine nicht lokale Begrenzung der Wirkung und durch die extrem hohe Reaktionsfähigkeit in Kettenreaktionen begründet werden. Daneben ist das toxische Wirkungsspektrum von ROS sehr breit. Alle wesentlichen biochemischen Stoffklassen wie Proteine, Nukleinsäuren, Membranen oder Zucker kommen als Reaktionspartner in Frage. Im Zusammenhang mit CeO₂ und humanen Lungeneithelzellen konnten ebenfalls toxische Wirkungen von NP beschrieben werden. Hier führten CeO₂-NP zur Reduzierung wichtiger intrazellulärer Toxizitätsmarker wie Glutathion und α -

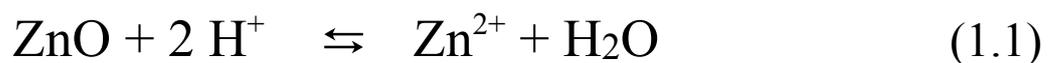
Tocopherol oder zum Anstieg der Lactatdehydrogenase-Aktivität¹⁸.

Einige NP können intrazelluläre Membranen passieren und so toxische Effekte hervorrufen. Im Besonderen sei hier die Passage über die mitochondriale Membran genannt¹⁹. Durch die Unterbrechung der Elektronentransportkette können NP hier zur zusätzlichen Produktion von Hydroperoxid-Anionen beitragen.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist nicht bekannt, ob NP wie CeO₂, ZnO oder TiO₂ in den Zellkern penetrieren können. Allerdings kann eine NP Applikation zur Schädigung der DNA führen^{20 21}. Der nukleäre Ausschluss von NP ist zu erwarten, da der passive Transport durch die Kernpore durch deren Breite von ca. maximal 10 nm limitiert ist. Ionen, welche durch NP freigesetzt werden, können allerdings durch die Kernpore diffundieren und so, ebenfalls wie ROS, indirekt zur NP vermittelten DNA-Schädigung führen.

Im Zusammenhang mit UV-Strahlung zeigen NP Eigenschaften die dem photoelektrischen-Effekt ähnlich sind. Durch die UV abhängige Aktivierung von Elektronenpaarlücken können NP Elektronen auf einzelne Atome oder Moleküle übertragen. Dies führt ebenfalls zu Bildung freier Sauerstoff-Radikale oder zur Spaltung kovalenter Bindungen in organischen Molekülen.

Bestimmte NP wirken nicht selbst toxisch, sondern über die Freisetzung ihrer Ionen. Dies ist für CdSe, Silber-NP, Fe₃O₄, Co/Ni Ferritin-NP und ZnO bekannt. Hierbei kommt ZnO besondere Beachtung zu, da diese Partikel bei physiologischen pH praktisch unlöslich in Wasser sind und Zinkionen eine große physiologische Bedeutung zukommt. Nach einer endosomalen Aufnahme von ZnO-NP können diese weiter im Lysosom prozessiert werden. Dort liegt ein pH-Wert von 4 - 5 vor, was zur nahezu vollständigen Auflösung der Partikel führt (Gleichung 1.1).



Insbesondere durch den „proton sponge effect“ können Zinkionen in das Zytosol gelangen. Bei diesem Effekt lassen kationische Partikel das Endosom osmotisch anschwellen. Im Endstadium führt das zur Zerstörung der endosomalen Membran und damit zur Freisetzung der Zinkionen.

Durch ihre vielfältigen elektrischen, mechanischen und magnetischen Eigenschaften sind Single wall carbon nanotubes (SWCNT) als Ausgangsmaterial für zahlreiche kommerzielle Anwendungen geeignet. In diesem Kontext ist es wichtig Daten über deren Biokompatibilität, toxisches Potential oder Gesundheitsrisiken in Hinblick auf neue Produkte zu sammeln und zu berücksichtigen.

Wird die Gefahr von carbon nanotubes (CNT) in Zellen der Leber bewertet, lässt sich eine verminderte Toxizität bei Lipid-beschichteten, im Vergleich zu oxidierten oder Polymer (PSPM, PAH) beschichteten CNT, feststellen²².

1.1.2 Risikobewertung von Nanomaterialien

Das Produktionsvolumen von Nanopartikeln wie TiO_2 liegt bei ungefähr bei 4 Millionen Tonnen pro Jahr (2008)²³. Das Volumen von ZnO NP liegt bei 1,2 Millionen Tonnen (2012)²⁴. Im letzten Jahrzehnt kann ein starker Anstieg von Produkten auf Nanopartikeln basieren beobachtet werden. Dabei finden NP in alltäglichen Produkten wie Zahnpasta oder Sonnencreme als auch in innovativen Produkten der Biomedizin Anwendung²⁵. Mögliche toxische Effekte von Nanomaterialien können nach der oralen oder dermalen Applikation sowie durch Inhalation hervorgerufen werden. Um die Gefahr von NP nach einer möglichen Aufnahme in die Blutbahn zu bewerten, wurden Studien nach intravenöser Injektion radioaktiv markierter NP durchgeführt²⁶.

Im Arbeitsumfeld stellt der Einfluss von NP-Aerosolen ein verhältnismäßig häufiges Risiko dar, weshalb die Grenzwerte oft in g/m^3 angegeben werden. Da die Größe der Partikeloberfläche wesentlich die Eigenschaften und somit auch die Toxizität von Partikeln bestimmt, wird alternativ die absolute Anzahl von Partikeln pro Kubikmeter Luft als Grenzwert angegeben. Beispielsweise haben sich verschiedene europäische Länder darauf verständigt, dass für Metalloxid-NP (Dichte $> 6 \text{ g/cm}^3$ & Durchmesser $< 100 \text{ nm}$) ein Grenzwert von 20000 Partikeln pro Kubikmeter gilt.

Im Rahmen des REACH (European Community Regulation on chemicals) – Programms der Europäischen Union, wurde ein sogenannter DNEL-Wert (derived no effect level) entwickelt. Dieser spiegelt die Ergebnisse der Toxizitätsbewertungen für jeden einzelnen Nanopartikel wider. Da die Mechanismen durch welche NP toxisch wirken individuell sehr verschieden ausfallen, wird zwischen einer Langzeitexposition und einem akuten Wert unterschieden ($\text{DNEL}_{\text{long-term}}$ & $\text{DNEL}_{\text{acute}}$). Beispielsweise beträgt dieser Wert für die Langzeitexposition von TiO_2 $17 \mu\text{g/m}^3$ für einen Zeitraum von acht Stunden.

1.1.3 Lungengewebe als physiologische Barriere für Nanopartikel

In der vorliegenden Arbeit wurde primär die Wechselwirkung von NP mit Epithelzellen der Lunge untersucht. Dabei kamen A549 Zellen (humane basal alveolare adenokarzinom Epithelzellen) und Lungengewebe der Maus sowie gedehnte primäre Typ II Pneumozyten zum Einsatz. In den Biowissenschaften haben sich dabei die A549-Zellen als in vitro Modell der Typ II Alveolarepithelzellen etabliert. Neben der oralen Exposition von NP (z.B. Zahnpasta, Nahrungsmittelzusätze) hat die pulmonale Aufnahme die größte Bedeutung. Nach einer potentiellen Aufnahme, können NP von alveolaren Epithelzellen direkt in das Lymp- oder Blutsystem

penetrieren. Im Gegensatz zur oralen Exposition, muss im Falle der Inhalation jedoch eine zusätzliche Barriere (Surfactant) beachtet werden. Surfactant ist eine grenzflächenaktive Substanz, welche im Wesentlichen aus Phospholipiden und Proteinen besteht. Sie setzt die Oberflächenspannung der Alveolen herab und verhindert so deren Kollabierung im Atemprozess. Surfactant wird von Pneumozyten Typ II produziert, welche ungefähr 5% der Alveolaroberfläche bedecken. Typ I Pneumozyten kleiden ca. 95% der Alveolaroberfläche aus (Abb. 1.1.3). Sie sind nicht mehr teilungsfähig und für den Gasaustausch zwischen Blut und Luft zuständig.

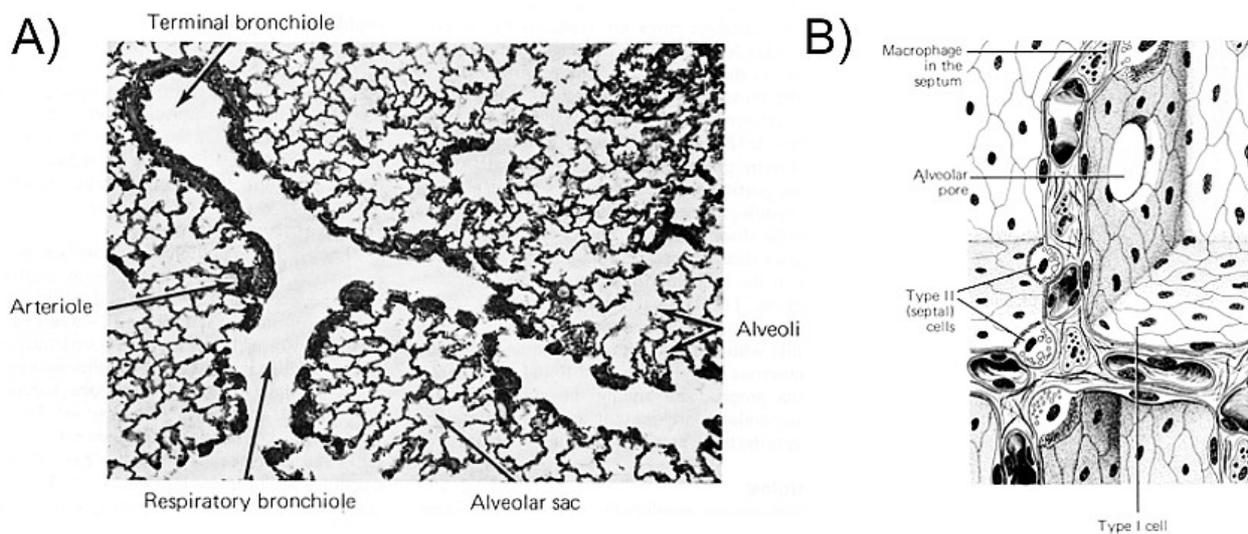


Abb. 1.1.3 Mikroskopische und schematische Darstellung von Lungengewebe der Maus. **A)** Mikroskopische Aufnahme einer terminalen Bronchiolen, welche sich in zwei respiratorische Bronchiolen aufspaltet. Deutlich lässt sich eine netzartige Struktur des Gewebes erkennen, welche durch das häufige Auftauchen von Alveolen bedingt ist. **B)** Schematische Abbildung von Alveolen. Deutlich zu erkennen ist die Überzahl an Typ I Pneumozyten, welche den größten Anteil der Epithelfläche bedecken. Zusätzlich in direkter Nachbarschaft der Pneumozyten lokalisierte Makrophagen können frühe Aufgaben der Immunabwehr wahrnehmen. Alle Abbildungen wurden von John a. Long et al.²⁷ adaptiert.

Der Surfactant verhindert beim Ausatmen das Kollabieren der Alveolen indem er die Oberflächenspannung verringert. Ein potentieller proinflammatorischer Effekt von NP auf Pneumozyten kann zur Dysfunktion von Surfactant führen²⁸. Da Surfactant Metalloxid-NP bindet²⁹, kann die Dysfunktion von Surfactant die Wechselwirkung von NP mit Lungen-Epithelzellen erhöhen und deren Aufnahme begünstigen. In diesen Zusammenhang ist es interessant, die Gegenwart von Makrophagen im Alveolargewebe zu erwähnen (Abb. 1.1.3 B). Sie spielen eine elementare Rolle bei der zellulären Antwort auf die NP Exposition der Lunge. Beispielsweise können Epitopmodifikationen, welche von einer NP-Protein-Bindung hervorgerufen wurden, von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden.

1.1.4 Stabilität und Aggregationsverhalten der Nanopartikel-Dispersion im wässrigen Milieu

Generell muss bei der Untersuchung der Interaktion zwischen biologischen Strukturen und NP die Wechselwirkung zwischen den NP und der flüssigen Phase, sowie die Wechselwirkung zwischen den NP selbst, berücksichtigt werden.

Da sich Nanopartikel in der wässrigen Phase nicht lösen, liegt ein System mit zwei unterschiedlichen Phasen vor (flüssige wässrige Phase und feste Phase der Nanopartikel), zwischen denen eine positive Grenzflächenenergie vorhanden ist, die sich dadurch ausdrückt, dass die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwangsläufig gestört sind. Die NP-Suspension ist somit ein metastabiler Zustand und zeigt einen Trend zur Entmischung. Beim Dispergieren wird durch Ultraschallbehandlung Energie aufgebracht, welche dem Trend zur Entmischung durch Aggregation entgegenwirkt.

In Abhängigkeit vom Abstand der Teilchen wirken unterschiedlich starke Kräfte mit welchen die Stabilität der Suspension beschrieben werden kann: elektrodynamische Wechselwirkung (van der Waals Kraft), elektrostatische Wechselwirkung (Coulomb Kräfte), Lösungsmittel Interaktionen und sterische Wechselwirkungen. Um die Stabilität von anziehenden und abstoßenden Teilchen in kolloidalen Systemen auf einfache Weise zu beschreiben, wird die Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek Theorie (DLVO-Theorie) verwendet³⁰. Diese beschreibt bei der Interaktion von geladenen Teilchen im wässrigen Medium die Summe der wirkenden Kräfte und somit die Kolloidstabilität.

Die Grenzflächenkräfte werden dabei durch das Energiepotential beschrieben. Dieses gibt die erforderliche Energie an, welche aufgebracht werden muss um zwei Oberflächen auf einen Abstand anzunähern. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass für metastabile Dispersionen in der Summe für sehr kurze Teilchenabstände anziehende Energien wirken und für große Teilchenabstände abstoßende (Abb. 1.1.4). Dazwischen liegt das primäre Maximum (V_{\max}). Es stellt in einer metastabilen Dispersion die Energiebarriere (z.B. kinetische oder thermische Energie) dar, welche zur Aggregation überwunden werden muss. Je größer das primäre Maximum (V_{\max}) ausgeprägt ist, um so stabiler ist die Dispersion.

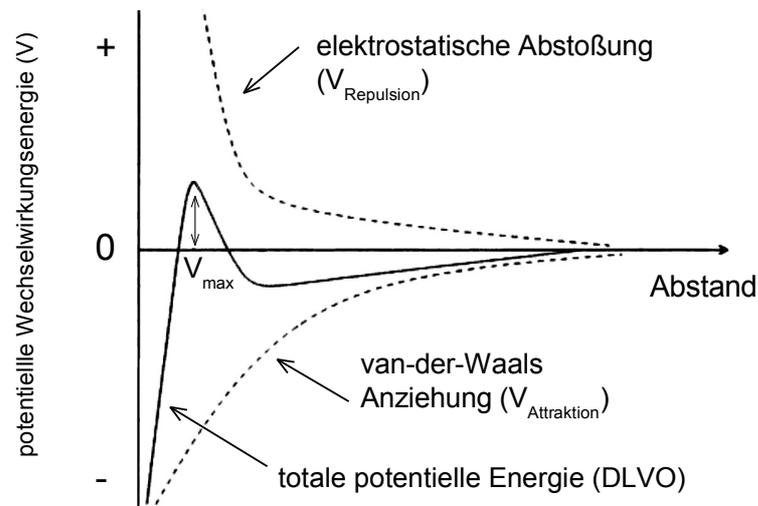


Abb. 1.1.4 Schematische Darstellung der DLVO-Theorie für kolloidale Teilchen. Grafik adaptiert von A. Fuchs (1998)³¹.

Im biologischen Kontext sind Nanopartikel oft in wässriger Lösung dispergiert und dort liegen normalerweise verschiedene Ionen vor, welche auf der Oberfläche der Metalloxid-NP adsorbieren. Deshalb wird das Zeta-Potential und die Dicke der Stern-Doppelschicht berücksichtigt um die Stabilität der Dispersion zu beschreiben. Denn in Abhängigkeit der Ionenkonzentration stoßen sich gleiche Ladungen durch die elektrostatische Wechselwirkung ab, was zur Stabilisierung der Dispersion beiträgt.

Daneben können im biologischen Kontext auf der Partikeloberfläche angelagerte Liganden, wie z.B. Polymere oder Proteine, die Partikel sterisch stabilisieren. Dabei hängt das Ausmaß der Stabilisierung von der Polymerkonzentration ab, da eine unvollständige Bedeckung der Partikeloberfläche die Zusammenlagerung zweier Partikel durch Brückenbildung sogar begünstigen kann. Bei ausreichender Konzentration kann der Ligand anziehenden Kräfte unterbinden, indem er als abschirmende Schicht wirkt. Zusätzlich werden bei der Annäherung zweier Partikel die Liganden, z.B. lösliche Ketten, komprimiert bzw. überlagern sich. Dadurch sind weniger Konformationen möglich und die Teilchen werden entropisch stabilisiert.

1.1.5 Protein-Korona

Generell zeigen NP, welche im biologischen Kontext betrachtet werden, die Fähigkeit durch das Binden von Proteinen eine Hülle auszubilden (auch Protein-Korona genannt, siehe Abb. 1.1.5). Die Eigenschaften dieser Korona hängen unter anderem von der Partikelgröße, Oberflächenladung, freier Energie oder funktionalen Gruppen ab³². In der Literatur wird gegenwärtig zwischen einer harten und weichen (soften) Protein-Korona mit langen und kurzen Protein-Austauschraten unterschieden^{33,34}.

Gelangen NP in eine physiologische Umgebung, wie z.B. Blut, so ist von einer Wechselwirkung zwischen NP und Proteinen auszugehen. Bei einer Bindung zwischen NP und Protein kann die Konformation des Proteins irreversibel verändert werden, was zur Exposition von neuen Epitopen führen kann³². Daneben kann eine Bindung die Aktivität des Proteins vermindern oder auslöschen³⁵.

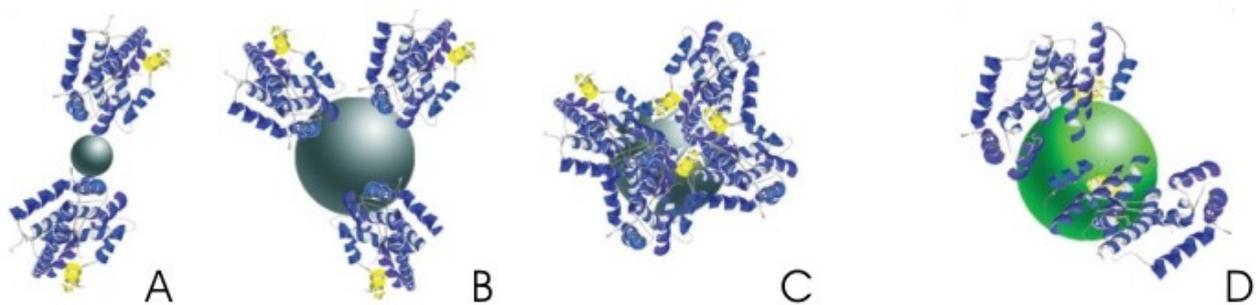


Abb. 1.1.5 Schematische Darstellung verschiedener Ausprägungsarten der Protein NP Interaktion die zu einer Protein-Korona führen am Beispiel von PAA beschichteten Gold NP³⁶. **A)** Bedeckung nach Wechselwirkung mit kleinen NP. **B)** Großer NP mit geringem Bedeckungsgrad. **C)** Großer NP mit ausgeprägtem Bedeckungsgrad und möglicher Konformationsänderung des gebundenen Proteins. **D)** Die Eigenschaften der NP Oberfläche können die Menge an gebundenen Protein beeinflussen.

Die Bindung von Proteinen an Nanopartikel kann ebenfalls wesentlich deren Ladung, Aggregationsverhalten oder die zelluläre Aufnahme und Verteilung beeinflussen^{37,38}. Beispielsweise kann davon ausgegangen werden, dass eine Opsonierung des NP zur Phagozytose führt³⁹. Andererseits wird diskutiert, dass die Bindung von Albumin oder Lipoproteinen die Verweildauer des NP-Protein-Komplexes im Blut verlängern können⁴⁰.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit soll sein, Metalloxid-NP (ZnO, CeO₂, Fe₂O₃, TiO₂, Al₂O₃) in einzelnen Zellen orts aufgelöst (zweidimensional) nachzuweisen und zu quantifizieren. Zur Lösung der Fragestellungen dient die Methode der Ionenstrahlmikroskopie (PIXE & RBS). Diese ist eine standardfreie Technik und benötigt zur Visualisierung und Quantifizierung der NP keine Markierung. Oft werden NP zur Visualisierung und Quantifizierung mit Fluoreszenzgruppen konjugiert. Allerdings können diese Gruppen in der Nanoskala eine ähnliche Größe wie der Nanopartikel selbst aufweisen und so dessen Eigenschaften beispielsweise bei der Aufnahmekinetik oder intrazellulären Prozessierung wesentlich verändern.

Erstmalig soll so die Aufnahme, Verteilung und Quantifizierung von Metalloxid-NP auf Einzelzellebene dargestellt werden. Dabei ist die zu erwartende NP Menge pro Zelle sehr gering. Allerdings ist die Ionenstrahlmikroskopie zur Lösung dieser Aufgabe sehr gut geeignet, da sie für biologische Elemente eine Sensitivität im einstelligen ppm-Bereich aufweist.

Durch die Analyse des des zellulären Rückstreusignals soll die zelluläre Aufnahme der NP untersucht werden, indem die Position des NP auf der Z-Achse bestimmt wird. Intrazellulär lokalisierte NP zeigen eine niedrigere Rückstreuenergie im Vergleich zu extrazellulär assoziierten Partikeln, da erstere durch eine zusätzliche Zellschicht bedeckt sind.

In-vitro-Studien bieten den Nachteil, dass die Ergebnisse, durch die Abwesenheit von umgebenden Gewebe oder Nährstoffen, nicht im natürlichen Umfeld der Zelle entstehen und dadurch nur schwer auf die Wirkung im Organismus übertragbar sind. Auf der anderen Seite können durch *in-vitro*-Untersuchungen Kosten reduziert und auf Tierexperimente verzichtet werden. Die vorliegende Arbeit soll deshalb dazu beitragen, die Aussagekraft von *in-vitro*-Daten zu erhöhen, indem anstelle der extrazellulär applizierten Dosis (µg/ml) die wirklich wirksame intrazelluläre NP-Dosis (µg/g) quantifiziert wird. Somit soll diese Arbeit erstmalig eine Beziehung zwischen der wirklichen intrazellulären NP-Dosis pro Zelle und einem Effekt (Toxizität) aufzeigen. Dadurch soll es möglich werden, im Kontext der europäischen Richtlinie⁴¹, das Risiko einzelner NP genauer bewerten zu können und gleichzeitig die Anzahl von Tierversuchen zu verringern.

Es ist wichtig die intrazelluläre Dosis als Referenz für einen Effekt des NP zu berücksichtigen, da die Applikationsdosis in Masse pro Volumeneinheit nicht den speziellen Eigenschaften von NP Rechnung trägt. Durch die geringe Größe und Masse spielen Diffusion und Sedimentation⁴² eine untergeordnete Rolle, wodurch eine große Anzahl von Partikeln gar nicht erst mit einer adhären wachsenden Zelle in Kontakt treten. Daneben modifizieren Substanzen in biologischen Lösungen die Oberfläche der NP, wodurch deren Größe und somit die Aufnahme stark beeinflusst werden

kann.

In den vorliegenden Untersuchungen erlaubt die Ionenstrahlanalyse durch die Fokussierung des Ionenstrahls eine Einzelzellanalyse mit einer Auflösung bis unter 1 μm . Im Vergleich zur Bulk-Analyse bietet die Einzelzellanalyse den Vorteil, zelluläre Effekte im Kontext der natürlichen morphologischen Umgebung untersuchen zu können. Daneben ist es durch die Einzelzellanalyse möglich die Extrempunkte einer Belastung feststellen, was für die Festlegung der Grenzwerte bei einer Risikoabschätzung hilfreich ist. Daten der Einzelzellanalyse sind somit für die Genomanalyse bedeutend. Im Fall von Krebs erlaubt die Sequenzierung von einzelnen Zellen die Heterogenität eines Tumors zu beschreiben bzw. seltene Tumorzellen im Anfangsstadium zu entdecken⁴³. Ein Nachteil der Einzelanalyse ist die Beschränkung der Analyse auf eine kleine Zellzahl und die damit einhergehende geringe Aussagekraft des Mittelwerts.

Wie bereits von K. Arakawa⁴⁴, C. Jeynes⁴⁵ und E. Ortega^{46 47} gezeigt, können NP-ähnliche Agentien wie cis-platin, Galliumnitrat oder Cobalt als biologisch aktive Verbindungen erfolgreich auf Einzelzellebene mittels Ionenstrahlmikroskopie quantifiziert werden. Viele etablierte Methoden zur zellulären Quantifizierung von NP zeigen wesentliche Limitierungen (Probentiefe, strukturauflösende Präparation, Markierung des NP, Auflösungsvermögen), welche durch die Ionenstrahlmikroskopie überwunden werden. Insbesondere die Quantifizierung zelleigener Spurenelemente wie Eisen und Zink wird durch die Ionenstrahlanalyse erreicht, da diese im Vergleich zur Elektronenstrahlmikroanalyse ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis bietet. Dies ist relevant, da diese Ionen von NP freigesetzt werden können und relativ geringe Dosen toxische Effekte hervorrufen können^{48 49}.

1.3 Charakterisierung und Anwendungsgebiete ausgewählter Nanopartikel

Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Nachweis und der Quantifizierung von NP in biologischen Material. Dabei kamen im wesentlichen ZnO und CeO₂ Nanopartikel zum Einsatz. Im Folgenden wird deshalb näher auf deren Eigenschaften, Charakterisierung sowie Anwendungsmöglichkeiten eingegangen.

Im Allgemeinen wird die kontrollierte Synthese von NP wie ZnO oder CeO₂ durch FSP (flame spray pyrolysis) realisiert. Diese Methode wird ebenfalls in der Industrie verwendet und liefert NP in einer reproduzierbaren Partikelgröße, bei einer gleichzeitigen Abwesenheit von Mikroporosität⁵⁰. Die TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) wird routinemäßig angewendet um Auskunft über die Größe eines NP zu erhalten. Daneben liefert TEM, bedingt durch ein hohes Auflösungsvermögen, Informationen über die Beschaffenheit der NP Oberfläche. Beispielsweise ist

es möglich eine den NP umhüllende Protein-Schicht (Korona) mittels TEM zu erkennen⁵¹. Da in Lösung viele NP andere Eigenschaften und die Tendenz zur Aggregation zeigen, ist es wichtig deren Größe in Hinblick auf das Lösungsmittel zu untersuchen. Diese Information ist nicht durch TEM zugänglich, kann aber beispielsweise durch eine Analyse mittels DLS (dynamic light scattering) gewonnen werden. Als Maß bezüglich des Aggregationsverhaltens von NP wird häufig das Zeta-Potential verwendet. Der Wert dieses Potentials (mV) beschreibt die Stabilität kolloidaler Systeme. Nähert sich das Potential dem Wert 0 mV an, so führt dies vermehrt zur Aggregation. Werte jenseits von 0 mV, welche ungefähr über +30 mV oder unter -30 mV liegen, beschreiben ein stabiles kolloidales System.

1.3.1 Zinkoxid (ZnO)

Zinkoxid ist eine weiße pulvrige Substanz mit äußerst geringer Löslichkeit in Wasser. Die Verbindung entstand bereits in frühen Zeiten als Nebenprodukt der Kupferproduktion und wurde, bedingt durch seine antibakterielle Eigenschaft, bei der Behandlung von Verletzungen eingesetzt. Da ein Fokus dieser Arbeit auf der biologischen Relevanz von NP liegt, soll an dieser Stelle die sehr geringe Löslichkeit von Zinkoxid in wässrigen Systemen (pH 7.4) als erstes genannt sein. Allerdings nimmt die Löslichkeit mit fallenden pH stark zu. In stark basischer Umgebung ist Zinkoxid ebenfalls nicht stabil und wird zu Zinkhydroxiden umgesetzt.

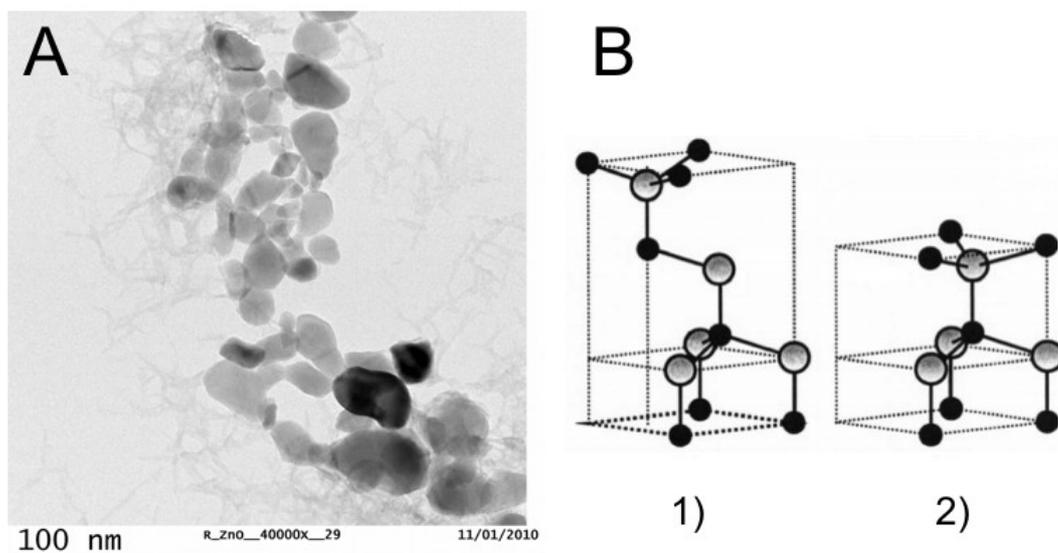


Abb. 1.3.1 Strukturelle Charakterisierung von Zinkoxid NP **A)** Morphologie von Zinkoxid NP dargestellt mittels TEM Analyse (Adaptiert von S. Moya et al.) **B1)** Kubische (Zinkblende) Kristallstruktur und **B2)** hexagonale Kristallstruktur (Wurzit) von Zinkoxid. (Strukturen jeweils adaptiert von Ü. Özgür et al.).

Bei physiologischen pH ist Zinkoxid allerdings nicht völlig unlöslich, das Gleichgewicht liegt, zu Ungunsten freier Zn^{2+} -Ionen, stark auf der Seite von ZnO . In komplexeren Lösungen wie z.B. Kulturmedien kann durch Anwesenheit von Phosphat-Ionen von der Bildung unlöslichen Zinkphosphats ausgegangen werden. Somit entziehen die Phosphat-Ionen, ähnlich wie Serum (FKS), Zink-Ionen aus dem Löslichkeits-Gleichgewicht und können so zur Auflösung der Nanopartikel beitragen. Die aufgeführten Eigenschaften gestalten es somit sehr schwierig, die echte extrazelluläre Dosis von Zinkoxid NP z.B. in Kulturmedien zu kennen.

Im Wesentlichen wird Zinkoxid in zwei Formen vorgefunden: hexagonal (Wurtzit) und kubisch (Zinkblende). Im Allgemeinen neigen ZnO NP vergleichsweise stark zur Aggregation (Abb. 1.3.1). Bezüglich der Zinkoxid vermittelten Toxizität lässt sich vermerken, dass bis zum heutigen Zeitpunkt kein vollständiger Konsens darüber besteht, ob Zinkionen oder Zinkoxid NP für die Toxizität verantwortlich sind. Im Allgemeinen ist eine endozytotische Aufnahme der Zinkoxid NP sehr wahrscheinlich. Während der intrazellulären Prozessierung ist es sehr wahrscheinlich, dass die NP in das Lysosom gelangen. Dort herrscht ein saurer pH Wert von 4 – 5 vor. Unter diesen Bedingungen liegt ZnO fast vollständig gelöst vor, wodurch freie Zink-Ionen in hoher Konzentration vorhanden sind. Diese wirken in hohen Dosen stark toxisch, weshalb bei der Zinkoxid NP vermittelten Toxizität die Rolle der freien Zink-Ionen berücksichtigt werden muss. Obwohl der Mechanismus der potentiellen ZnO -vermittelten Toxizität bis zum heutigen Zeitpunkt unvollständig verstanden ist, werden ZnO NP in alltäglichen Gebrauchsgütern wie z.B. Sonnencreme zum Schutz vor UV-Strahlen eingesetzt.

Die Anwendungsbereiche von Zinkoxid NP sind breit gefächert. Dazu zählen unter anderem Sonnencremes, Biosensoren, Nahrungs-Zusatzstoffe, Pigmente, Gummi-Produkte oder elektronische Materialien⁵². Zinkoxid wird daneben als Katalysator bei chemischen Reaktionen eingesetzt. Im speziellen sei hier die Methanol-Synthese genannt. Die vergrößerte Oberfläche trägt dazu bei, die Effizienz dieser Reaktion zu verbessern. Daneben wird Zinkoxid eine große Bedeutung im Halbleiter-Bereich zugesprochen. Dort wird es in Varistoren (spannungsabhängiger Widerstand), Transistoren, Szintillatoren, LEDs oder piezoelektrischen Bauelementen verwendet. Außerdem gehört der Halbleiter Zinkoxid zur Gruppe der transparent elektrisch leitfähigen Oxide. Diese absorbieren vergleichsweise wenig Licht im sichtbaren Bereich, weshalb Zinkoxid bei der Produktion von Flüssigkristallbildschirmen und Dünnschicht-Solarzellen eingesetzt wird. In diesem Zusammenhang kann eine Dotierung von ZnO NP mit Aluminium deren Leitfähigkeit erhöhen, was zu Verbesserung der Solarzellen-Effizienz beiträgt. Parallel wird Zinkoxid in der Industrie unter anderem als chemischer Sensor, in Solarzellen oder als Lumineszenz-Einheit eingesetzt^{53 54}. Einige Untersuchungen ergaben eine Resistenz von ZnO gegenüber

hochenergetischer Strahlung⁵⁵, was ZnO als Ausgangsmaterial für Raumfahrtanwendungen prädestiniert.

1.3.2 Cer(IV)-oxid (CeO_2)

Als zweiter wesentlicher Nanopartikel kam Ceriumoxid zum Einsatz. Dies ist ein relativ unbekanntes Metalloxid, welches aber aus unterschiedlichen Gründen wissenschaftlich interessant ist und in der Industrie eine große Rolle spielen kann. Der Name Cerium leitet von dem Planeten Ceres ab und es kommt als Metall der seltenen Erden in der Natur relativ häufig als Mineral in Form von Cerit, Monazit oder Bastnäsit vor. Die stabilste oxidische Form ist Cer(IV)-oxid (CeO_2) und ist ausschließlich Teil dieser Arbeit (Abb. 1.3.2 A & B1). Daneben existiert Cer(III)-oxid (Ce_2O_3) als stabile oxidische Form, welches sich durch seine stärker ausgeprägte gelbe Farbe von Cer(IV)-oxid abgrenzen lässt.

Im biologischen Kontext ist zu erwähnen, dass bezüglich der Toxizität von Ceriumoxid unterschiedliche Ergebnisse vorliegen. Im Zusammenhang mit Lungenepithelzellen (A549) wurde eine signifikante Erhöhung des oxidativen Stresses durch CeO_2 NP nachgewiesen¹⁸. Dabei waren Werte für Glutathion und α -Tocopherol reduziert und die Laktat-Dehydrogenase Aktivität erhöht. Die Fähigkeit von CeO_2 oxidativen Stress zu induzieren, konnte ebenfalls in einem anderen Zelltypen bestätigt werden. Konträr dazu berichten einige Untersuchungen von der Fähigkeit des Ceriumoxids unterschiedliche Zelltypen vor oxidativen Stress zu schützen^{56 57 58}.

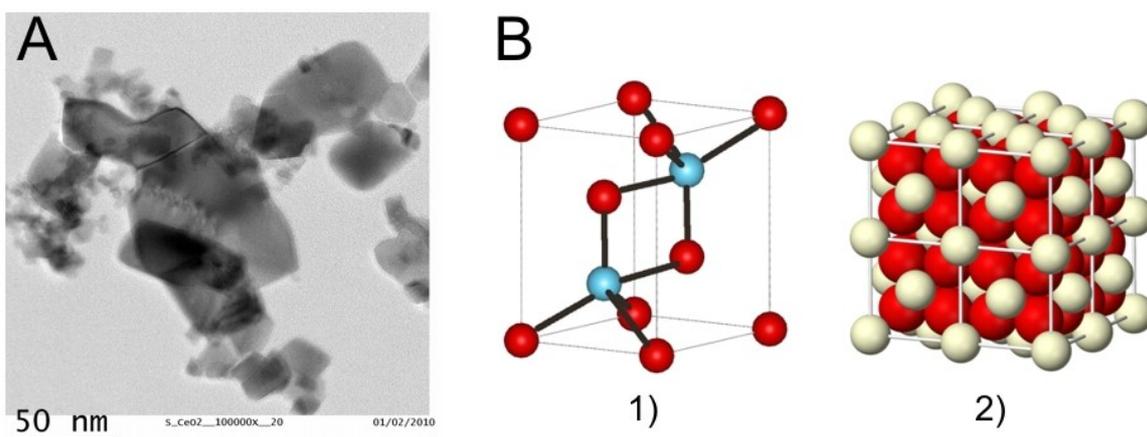
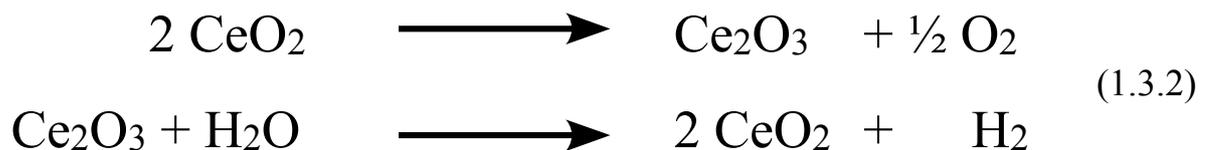


Abb. 1.3.2 Strukturelle Charakterisierung von Ceriumoxid NP **A)** Morphologie von Ceriumoxid NP dargestellt mittels TEM Analyse (Adaptiert von S. Moya et al.). **B)** Kristallstruktur der beiden häufigsten Ceroxide: 1) Cer(III)-oxid (Ce_2O_3) und 2) Cer(IV)-oxid (CeO_2)⁵⁹.

Eine mögliche Begründung für die antioxidative Kapazität von Ceriumoxid kann durch das Vorherrschen unterschiedlicher Valenzzustände (Ce^{3+} und Ce^{4+}) auf der Oberfläche des Partikels gegeben werden. Diese können durch Sauerstoff-Lücken hervorgerufen werden und freie Radikale durch Änderung des Oxidations-Status ($\text{Ce}^{4+} \rightarrow \text{Ce}^{3+}$) einfangen.

Die Anwendungsmöglichkeiten von Ceriumoxid sind vielfältig. Eine wichtige Anwendung ist der Einsatz als Katalysator. Dort vermag es Kohlenstoffmonoxid oder Stickoxide in höherer Effizienz, und somit in geringeren Mengen im Vergleich zu herkömmlichen Katalysatoren, zu oxidieren. In der Autoindustrie werden Ceriumoxid-NP Diesel in einer Endkonzentration von 5 ppm zugesetzt⁶⁰. Dies verringert die Verbrennungstemperatur und resultiert in einer geringeren Menge an ausgestoßenen Partikeln. Daneben können Ceriumoxid-NP den Verbrennungsprozess von Diesel verlängern. Unter anderem kann Ceriumoxid für die Produktion von Wasserstoff aus Wasser verwendet werden⁶¹ (Gleichung 1.3.2). Dies ist wirtschaftlich relevant, da bei knapp werdenden Ressourcen, wie z.B. Öl, die Brennstoffzelle an Bedeutung gewinnen kann.



Ceriumoxid-NP werden auch als Poliermittel eingesetzt⁶². Im Vergleich zu Silka- oder Aluminiumpartikeln zeigen sie eine geringere Härte. Dadurch wird die Oberfläche des zu säubernden Materials weniger zerkratzt. Ceriumoxid kann ebenfalls als Material für Solarzellen verwendet werden⁶³.

1.4 Methoden zum Nachweis und Quantifizierung von Nanopartikeln

1.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Begründet durch ein hohes Auflösungsvermögen ist TEM am Besten zur Charakterisierung und intrazellulären Lokalisierung von NP geeignet^{64 65}. Es ist im Besonderen zu berücksichtigen, dass die Bild- sowie Präparatqualität sehr stark von der gewählten Präparationsmethode abhängen kann. Eine detaillierte Aufnahme von subzellulären Strukturen oder die Unterscheidung von Organellen ist normalerweise in einer Standard TEM-Analyse gegeben. Allerdings wird bei dieser Methode, bedingt durch den anspruchsvollen Präparationsprozess, mehr Analysezeit im Vergleich zu anderen Methoden benötigt. Im Besonderen ist die Präparation von Lungengewebe ein technisch anspruchsvoller Prozess, da Faktoren wie der Perfusionsdruck oder die Kollabierung des

Lungengewebes berücksichtigt werden müssen⁶⁶. Die Quantifizierung von Nanomaterialien mit Hilfe von TEM ist möglich, doch es werden zusätzliche kontrastverstärkende Reagenzien wie Immunogold-Partikel oder Quantenpunkte (quantum dots) benötigt⁶⁷. In diesen Zusammenhang wurde das kompartimentierte Volumen in Beziehung zur Anzahl der vorhandenen Partikel gesetzt. Allerdings lässt sich dieser Ansatz verbessern, da die exakte intrazelluläre Partikeldichte nicht durch TEM ermittelt werden kann. Daneben bleibt die Probenpräparation ein kritischer Schritt, welcher die Analyse auf einen zellulären Ausschnitt begrenzt. Die intrazelluläre Konzentration von NP in Beziehung zum gesamten Zellvolumen bleibt somit unbekannt. Außerdem ist TEM ohne weitere Hilfsmittel nicht in der Lage, die chemische Struktur eines NP von anderen zellulären Strukturen abzugrenzen oder aus Gründen des Kontrastes, Partikel sehr geringen Durchmessers zu identifizieren.

1.4.2 Atomemissionsspektroskopie (AES)

In dieser Methode werden die elementspezifischen Spektrallinien genutzt um ein einzelnes Element zu identifizieren. Bezüglich biologischer Elemente misst diese Methode Werte im ppb-Bereich (parts per billion)⁶⁸. Dies hebt die AES als eine der sensitivsten Methoden zur Quantifizierung von NP hervor. Zusätzlich ist AES für die Analyse großer Zellzahlen geeignet. Allerdings ist es mit dieser Methode nicht möglich die Konzentration oder Verteilung von NP in einzelnen Zellen zu studieren. Der Probenpräparation kommt bei der AES ähnlich hohe Bedeutung zu wie bei der TEM-Analyse. Hierbei können durch die erforderliche stark saure Probenbehandlung vor der Messung, zelluläre Strukturen irreversibel modifiziert werden⁶⁹. In diesem Zusammenhang erlaubt die AES nicht zwischen internalisierten oder extrazellulär assoziierten NP zu unterscheiden. Eine Analyse der Aufnahme-Kinetik von NP in einzelnen Zellen ist also nicht gegeben. Daneben gestaltet sich die Bewertung von Nanomaterialien wie Carbon-Nanotubes (CNT) schwierig, da die Methode der AES den Kohlenstoff von CNT-NP nicht von zellulären Kohlenstoff unterscheiden kann. Im Weiteren ist die Methode der AES nicht sehr gut geeignet um NP nachzuweisen, welche aus zellulären Elementen wie Eisen oder Zink bestehen⁶⁸.

1.4.3 Elektronenstrahlmikroanalyse (ESMA)

Neben IBM ist ESMA die einzige Methode welche in der Lage ist einzelne Elemente zu identifizieren und sie orts aufgelöst, mit einer Auflösung von ca. 1 μm , darzustellen. Bei EMSA ist die Analyse auf die zweidimensionale Ebene beschränkt, wohingegen IBM durch das

Rückstreusignal eine Information in der Z-Achse liefert. Die Analyse von Spurenelementen (Fe, Zn) kann bei vielen biologischen und medizinischen Fragestellungen eine Rolle spielen. Allerdings ist die Analyse dieser Elemente durch EMSA eher ungenau. Die Ursache hierfür ist in dem hohen Untergrundsignal zu suchen, welches von der unvermeidlichen Bremsstrahlung generiert wird. Dabei werden kleine Signale von Spurenelementen von der Bremsstrahlung stark beeinträchtigt oder überlagert. Dennoch zeigt die Elektronenstrahlmikroanalyse eine hohe Sensitivität bei der Bestimmung zellulärer Strukturelemente wie Phosphor oder Schwefel. Zusätzlich ermöglicht EMSA eine hohe Anzahl von physiologisch relevanten Elementen gleichzeitig zu analysieren. Auch die Quantifizierung von biologischen Elementen wie Natrium und Magnesium, welche durch Ionenstrahlmikroskopie nicht zugänglich sind, ist mittels EMSA möglich. Dies prädestiniert EMSA als ergänzende Methode zur IBM-Analyse von Spurenelement-Gehalten in biologischen Proben. Allerdings ist die Elektronenstrahlmikroanalyse auf eine gewisse Tiefe von einigen Mikrometern limitiert, da Elektronen im Vergleich zu Protonen eine niedrigere Masse aufweisen. Dies kann es schwierig gestalten, die totale Elementkonzentrationen in einzelnen Zellen oder Gewebe zu ermitteln⁷⁰.

1.4.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Methode der Durchflusszytometrie wird im Allgemeinen angewendet um mikroskopische Partikel oder Zellen bezüglich der Oberflächeneigenschaften, Granularität oder Fluoreszenz zu charakterisieren. Routinemäßig wird, beispielsweise in der Immunbiologie, durch die Wahl eines geeigneten Antikörpers eine Zellseparation von Blutzellen mittels Durchflusszytometrie erreicht. Die oben genannten Parameter sind durch die Detektion von vorwärts und seitwärts gestreuten Licht oder durch die Fluoreszenz zugänglich. Der größte Vorteil von FACS ist die gleichzeitige Analyse verschiedenster zellulärer Parameter in einer vergleichbar kurzen Analysezeit und einer sehr hohen Zellzahl. Daneben ist die Durchflusszytometrie eine preiswerte Methode, welche relativ einfach zugänglich ist.

Die Durchflusszytometrie eignet sich sehr gut, die zelluläre NP-Aufnahme qualitativ zu beschreiben, wenn die Partikel mit einem Fluorophor markiert werden^{71 72}. Der Nachteil ist, dass dieser Nachweis nicht authentisch genug für eine Risikobewertung ist, da nicht eindeutig ist, ob der Partikel intrazellulär lokalisiert ist und Werte extremer Belastung durch die hohe Zellzahl weniger Gewichtung finden. Daneben fehlt dieser Methode die Möglichkeit, Information über die intrazelluläre Verteilung der NP oder die elementspezifische Identität unmarkierter Partikel zu gewinnen. Als oberflächensensitive Methode, ist die Durchflusszytometrie in der Lage die zelluläre

Aufnahme geeigneter NP wie TiO₂ zu untersuchen⁷³. Da NP aber sehr stark durch ihre Oberflächeneigenschaften definiert sind, kann die Durchflusszytometrie nicht als geeignet angesehen werden, um die zelluläre Aufnahme eines breiten Spektrums von Nanomaterialien zu studieren. TiO₂- und Gold-NP stellen eine Ausnahme dar. Bei diesen NP ist eine hohe Rate der Seitwärtsstreuung zu erwarten, da diese Partikel einen vergleichsweise hohen Brechungsindex aufweisen^{74 75}. Durch eine Konjugation der NP erlaubt es die Durchflusszytometrie mit Hilfe des Fluoreszenzsignals die NP-Aufnahme zu studieren⁷⁶. Für eine absolute Quantifizierung intrazellulärer NP ist eine Kalibrierung des Signals erforderlich. Dies ist jedoch schwierig, da sich das Fluoreszenzsignal durch die Aufnahme der NP, z.B. durch die Aggregation oder Prozessierung der NP verändern kann.

Bei der Durchflusszytometrie ermöglicht die Seitwärtsstreuung die NP-Aufnahme qualitativ zu detektieren⁷⁷. Durch eine Kalibration zwischen Seitwärtsstreuung und der ionenstrahlanalytisch ermittelten NP-Konzentration, könnte die Seitwärtsstreuung für die absolute Quantifizierung unmarkierter intrazellulärer NP verwendet werden.

1.4.5 Ionenstrahlmikroskopie (IBM)

Wie die Elektronenstrahlmikroskopie gehört diese Methode ebenfalls zur Gruppe der Röntgenfluoreszenzanalyse. Sie umfasst in dieser Arbeit drei verschiedene Techniken, welche jeweils mit Protonen als Inzidenzteilehen durchgeführt werden: PIXE (Proton-Induced X-ray Emission) RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) und STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy). Für die zelluläre Quantifizierung von Nanopartikeln sind PIXE und RBS essentiell. STIM kann ergänzend aufgeführt werden, um ein zelluläres Dickenprofil zu erstellen oder ggf. die zelluläre Position der NP zu studieren, da STIM im Allgemeinen bei niedrigeren Strömen durchgeführt und somit eine höhere Auflösung zeigt. Die Methode der Ionenstrahlmikroskopie erlaubt es Informationen über zelluläre Spurenelemente mit sehr hoher Genauigkeit und Sensitivität (ppm Bereich) ohne Destruktion der Probe auf Einzelzellebene zu gewinnen⁷⁸. Beispielsweise konnte die intrazelluläre Verteilung von karzinostatischen Medikamenten wie Cisplatin oder Molybdocendichlorid mittels Röntgenfluoreszenz-Techniken aufgezeigt werden^{44 79}. Die Kombination von drei unterschiedlichen Techniken in der Ionenstrahlmikroskopie bietet ein großes Spektrum von Vorteilen. IBM konnte sich in der Vergangenheit als wirkvolles Methode profilieren, Spurenelement-assoziierte Krankheiten in Geweben aufzuzeigen^{80 81}. Im Kontrast zu Fluoreszenz-Techniken ist IBM ein sogenannter „label-free-approach“. Die Markierung des NP erfolgt oft durch die kovalente Verbindung mit einer Fluoreszenzgruppe. Durch die geringe Größe

der NP besteht die Gefahr, dass dadurch die Eigenschaften des Partikels an sich verändert werden. Daneben kann das Fluoreszenzsignal durch die zelluläre Umgebung geschwächt werden. Dies ist durch die geringe Dichte und Dicke von Zellmaterial bei der charakteristischen Röntgenstrahlung nicht der Fall. Dieser potentielle Einfluss ist nicht zu unterschätzen, da bei kleinen Partikeln wie Nanomaterialien eine Funktionalisierung wesentlich deren Aufnahme beeinflusst⁸². Im Gegensatz zur Elektronenstrahlmikroanalyse werden bei der Ionenstrahlmikroskopie die elementspezifischen Photonen durch Protonen induziert. Im Vergleich zu Elektronen produzieren diese weniger Bremsstrahlung. Dadurch kann ein höheres Signal/Rausch Verhältnis für mengenmäßig gering vertretene Elemente beobachtet werden. Deshalb ist IBM der Elektronenstrahlmikroanalyse vorzuziehen, wenn die Spurenelement-Konzentrationen von medizinisch relevanten Elementen , wie z.B. Eisen oder Zink, untersucht werden soll. Daneben erlaubt die IBM als einzige Methode eine Analyse der Partikel-Aufnahme gleichzeitig zur Konzentrationsbestimmung, indem der Energieverlust zurückgestreuter Protonen gemessen werden kann. In der RBS-Analyse wird routinemäßig ein Schichtmodell angewendet, um über eine Simulation des Experimentes die Dicke und die atomare Komposition der Probe zu bestimmen. Hier verschiebt sich das Rückstreu-Signal aufgenommener NP zu niedrigeren Energien, da das Inzidenzteilchen nach der Kollision mit dem NP eine zusätzliche Zellschicht passieren muss.

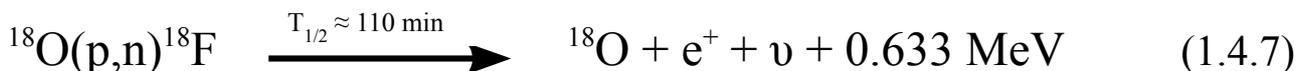
1.4.6 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektroskopie zur zellulären Quantifizierung von Nanopartikeln heranzuziehen ist eine relativ neue Herangehensweise. Aus diesem Grund sind auf diesem Feld zur Zeit nur wenige Veröffentlichungen vorhanden. Die Massenspektrometrie erlaubt es in relativ kurzer Zeit die aufgenommene NP-Menge einer hohen Zellzahl zu bestimmen. Ein großer Vorteil der Massenspektrometrie ist, dass ein großes Spektrum von Nanomaterialien, einschließlich kohlenstoffbasierte Nanomaterialien, quantifiziert werden können. Dazu gehören polymerartige NP, Liposomen, Virus basierte NP, CNT, diamantartige NP und polymerbasierte Mizellen⁸³. Daneben wurde durch die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) eine Quantifizierung von CeO₂-NP in Lungenepithelzellen demonstriert (Chen et al., 2010). Allerdings konzentriert sich diese Studie auf die Analyse einer großen Zellzahl. Bedingt durch den Säureverdau bei der Probenpräparation, erlaubt diese Studie allerdings nicht zwischen extrazellulär gebundenen oder internalisierten NP zu unterscheiden. Im Vergleich zur Ionenstrahlmikroskopie, welche eine standardfreie und nicht zerstörende Technik ist, erfordert die MS eine separate Kalibrierung für jeden NP. Da zur Quantifizierung mittels ICP-MS die untersuchten Atome in der

gleichen Oxidationsstufe wie bei der Kalibrierung vorliegen müssen, wird die Probe in der Regel mit einer starken Säure, wie bspw. Königswasser, behandelt. Dabei wird die zelluläre Struktur der Probe zerstört und die intrazelluläre Verteilung der NP ist nicht zugänglich.

1.4.7 Radiolabeling

Neben den oben aufgeführten Methoden ist die radioaktive Markierung von NP eine traditionelle Methode um deren Aufnahme zu studieren. Insbesondere dann, wenn die Verteilung der Partikel in Organen oder im gesamten Organismus untersucht werden soll. Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des HINAMOX Projektes angefertigt. Dabei wurde durch Kooperationspartner die zuvor erwähnte Distribution von Metalloxid-NP in Organen der Maus untersucht²⁶. Im Allgemeinen erfolgte dabei der Nachweis der Metalloxid NP durch die radioaktive Aktivierung des Sauerstoff-Atoms (Gleichung 1.4.7). Die Reaktion wurde in einem Zyklotron durch den Beschuss mit hochenergetischen Protonen (18 MeV) realisiert.



Neben dieser Strategie, ist es weit verbreitet, NP mit ¹¹¹In oder ^{99m}Tc zu markieren. Diese Nuklide wurden wegen ihrer milden Kopplungs-Verfahren und ihrer günstigen Halbwertszeiten in Hinblick auf eine *in-vivo*-Analyse adaptiert. Bezüglich der Kopplung zwischen Nuklid und NP sind verschiedene Herangehensweisen bekannt. Typischerweise wird der NP mit einem Chelator (DTPA, HYNIC oder Histidin) konjugiert^{84 85 86}. Daneben ist die Einkapsulierung der radioaktiven Komponente in den NP-Kern bekannt^{87 88}. Außerdem wurde eine direkte Markierung des NP mit dem Nuklid in der Literatur beschrieben^{89 90}.

Um die genaue Position der emittierten Photonen-Energie zu detektieren, bedarf es einer weiteren Methodik. In diesen Zusammenhang haben sich SPECT (Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie) und insbesondere PET (Positronen-Emissions-Tomographie) als Standard etabliert. Diese sind in der Lage die genaue Position (x-y-z) des Signals zu lokalisieren und mit Hilfe geeigneter Software, dieses anschließend in einem Voxel darzustellen. Der Vorteil Radioaktiv-basierter Analysesysteme wie PET und SPECT liegt in ihrer hohen Sensitivität im pM-Bereich, der möglichen Quantifizierung und in ihrer nicht-destruktiven Art^{91 92}. Das bedeutet, eine Analyse kann im lebenden Organismus durch intravenöse, orale oder kutane Applikation zeitnah durchgeführt werden. Die Stärke von PET und SPECT liegt darin, die Verteilung von NP im

Organismus bzw. Organen zeitabhängig darzustellen. In den meisten PET-Untersuchungen kommt Fluordesoxyglucose (Fluor-18 Halbwertszeit: 110 min) zum Einsatz. Längerfristige Studien sind mit den entsprechenden Nukliden, wie z.B. Technetium-99m oder Cobalt-60 möglich. Diese finden selten Anwendung, da bei *in-vivo*-Studien ein gesundheitliches Risiko bei Strahlenexposition über einen langen Zeitraum gegeben ist. Insbesondere bei SPECT wird für die Detektion der Richtung des Signals ein Kollimator benötigt, welcher über 99% der emittierten Photonen ausblendet.

Als Nachteil kann weiterhin aufgeführt werden, dass die Auflösung dieser Methoden in der Regel deutlich über 1 mm liegt. Dies beschränkt deren Anwendung auf die Analyse der NP-Verteilung in Organen oder Geweben und zeigt, dass sie für die Einzelzellanalyse oder speziell für die Untersuchung einzelner Alveolen ungeeignet sind.

2. Material & Methoden

2.1 Eingesetzte Nanopartikel und deren Charakterisierung

Die Untersuchung der NP-Eigenschaften erfolgte mittels der dynamische Lichtstreuung (DLS), Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)⁹³, und durch die Bestimmung des Zeta-Potentials sowie durch die Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Die Charakterisierung der Metalloxid-NP wurde von J. Fleddermann am Nanosight-Gerät (Nanosight LM 14) und in der Gruppe von Prof. N. Sträter (DLS) sowie Prof. S. Moya (Zeta-Potential & TEM) durchgeführt.

Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel und der dazugehörigen Partikelgrößen, welche mit DLS oder NTA ermittelt wurden, sind als Übersicht in Tabelle 2.1.1 und Tabelle 2.1.2 dargestellt.

Bei der DLS-Methode wird die Interferenz von Streulicht analysiert, welches mit einem Laser erzeugt wurde. Fluktuationen dieser Interferenz geben Auskunft über die Geschwindigkeit der Teilchenbewegung, woraus wiederum die Diffusionskonstante abgeleitet werden kann. Bei der NTA-Methode wird die Partikelposition im zweidimensionalen Raum optisch dargestellt und direkt die Bewegung der Teilchen analysiert. Da die NTA-Methode einzelne Partikel untersucht ist diese Methode, im Vergleich zu DLS besser, geeignet eine polydisperse Probe zu charakterisieren. Aus der Geschwindigkeit der Teilchenbewegung ist es möglich den Diffusionskoeffizient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) zu berechnen und unter Verwendung der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 2.1) kann somit, bei Berücksichtigung der Viskosität (η), der hydrodynamischen Radius (R_0) eines Teilchens bestimmt werden.

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_0} \quad (2.1)$$

Der hydrodynamischen Radius repräsentiert die Größe des Teilchens und berücksichtigt dabei die umgebende Solvathülle, welche in biologischen Medien beispielsweise aus Ionen oder Proteinen besteht, die an der Partikeloberfläche adsorbieren. Partikelgrößen ab ungefähr 200 nm konnten durch die DLS-Methode nicht bestimmt werden, da höchstwahrscheinlich durch die Aggregation der Partikel, keine verwertbare Autokorrelationsfunktion gebildet werden konnte.

Tabelle 2.1.1 Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel und deren Herkunft

Nanopartikel	Hersteller
Carboxyl-Graphen	Nanjing XFNano Material Tech Co., Ltd
Al ₂ O ₃	PlasmaChem GmbH, Berlin, D
TiO ₂	PlasmaChem GmbH, Berlin, D
Fe ₃ O ₄	PlasmaChem GmbH, Berlin, D
ZnO	Evonik Degussa GmbH, Essen, D
CeO ₂	Evonik Degussa GmbH, Essen, D
Gold	Sigma-Aldrich Inc. Shanghai, China
Silber	Sigma-Aldrich Inc. Shanghai, China

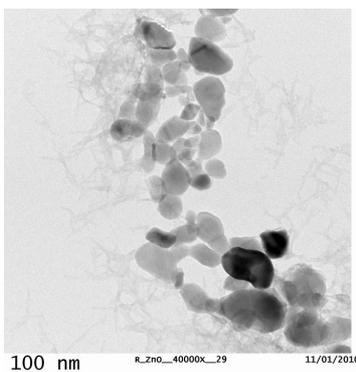
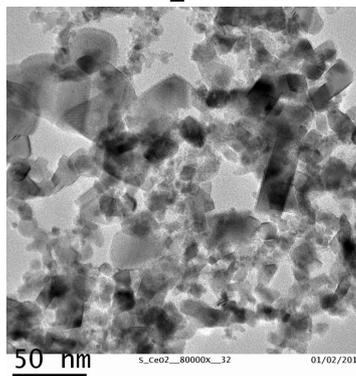
Tabelle 2.1.2 Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel-Größen. Die Bestimmung der Metalloxid-NP-Größen wurde von Jana Fleddermann mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) oder Nano tracking analysis (NTA) durchgeführt⁹⁴. Gezeigt ist jeweils der Durchmesser mit Standardabweichung von drei unterschiedlichen Messungen.

Nanopartikel	Dichte g/cm ³	Medium (FKS 10 %)		Medium (FKS 0 %)	
		DLS	NTA	DLS	NTA
		Ø in nm	Ø in nm	Ø in nm	Ø in nm
Al ₂ O ₃	3,9	111 ± 5	151 ± 2	n.d.	221 ± 4
TiO ₂	4,2	69 ± 6	192 ± 6	n.d.	233 ± 4
Fe ₃ O ₄	5,2	64 ± 7	182 ± 2	n.d.	217 ± 8
ZnO	5,6	124 ± 4	174 ± 5	n.d.	183 ± 13
CeO ₂	7,2	75 ± 4	134 ± 2	n.d.	221 ± 9
Gold	19,3	13	--	--	--
Silber	10,5	49	--	--	--

Die Charakterisierung des ZnO- bzw. TiO₂-Aerosols wurde mittels FMPS (Fast-Mobility Particle Sizer) und APS (Aerodynamic Particle Sizer) in der Arbeitsgruppe von Dr. Sören T. Larsen im National Research Center for the Working Environment in Kopenhagen durchgeführt. Dabei war eine Verteilung Partikelgröße zwischen ca. 10 nm und 10 µm zu beobachten, wobei die meisten Partikel einen Durchmesser von ca. 200 nm oder ca. 3 µm aufwiesen.

Die Charakterisierung von Gold- und Silber-NP sowie der Graphen-Partikel wurde von Xiangyan Zhou in der Gruppe von Prof. Gao durchgeführt, indem die NP-Größe von Gold- und Silber-NP mittels DLS ermittelt wurde. Daneben wurde die Transmissionselektronenmikroskopie zur Charakterisierung von NP eingesetzt. Diese Methode kann Informationen über Morphologie, Größe und Aggregationsverhalten der Partikel liefern. Daneben ist es durch das hohe Auflösungsvermögen der Elektronenmikroskopie möglich, die Oberflächenmorphologie bei einzelnen Partikeln zu visualisieren. Da in dieser Arbeit ZnO-NP, CeO₂-NP und Graphen näher untersucht wurden, erfolgte eine Charakterisierung der Partikel mittels TEM (Abb 2.1). Insbesondere im Fall von Graphen ist die Analyse mittels TEM sinnvoll, da diese Partikel durch ihre planare Struktur nicht mit DLS oder NTA analysiert werden können. Die Graphen-Partikel zeigten bei einer Dicke von 5 – 10 nm einen lateralen Durchmesser von ca. 5 µm.

A) ZnO

B) CeO₂

C) Graphen

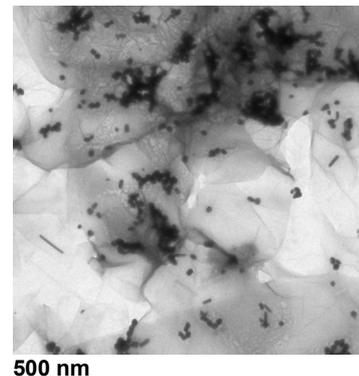


Abb 2.1 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Analyse von Nanopartikeln. **A)** ZnO-NP **B)** CeO₂-NP **C)** Typische TEM-Analyse Graphen Partikeln welche mit Gold-NP kovalent konjugiert sind. Zur Analyse wurde jeweils ein Tropfen NP-Lösung (2 µg/ml in H₂O) auf ein Formvar Kupfergitter aufgetragen, luftgetrocknet und mittels TEM (JEOL JEM 2100F, Japan) analysiert.

Im Allgemeinen beschreibt das Zeta-Potential die Stabilität eines kolloidalen Systems. Dabei wird die Oberflächenladung der Partikel gemessen, wobei Werte zwischen -100 und 100 mV für das

Zeta-Potential üblich sind. Bei Werten welche ca. unter 25 mV oder über -25 mV liegen, überwiegen Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den NP und das kolloidale System kollabiert durch Aggregation. Befindet sich ein geladener NP in Suspension, so lagert sich auf der Partikeloberfläche eine fest gebundene Schicht von Teilchen, wie z.B. Ionen oder Aminosäuren, an. Eine wiederum zweite Schicht von schwach gebundenen Teilchen lässt die Ladung des Partikels nahezu neutral erscheinen. Bewegt sich nun der Partikel in einen elektrischen Feld, wird die locker gebundene Teilchenschicht abgetragen und der Partikel trägt eine Ladung. Die Geschwindigkeit mit der sich die Partikel im elektrischen Feld bewegen ist dabei proportional zum Zeta-Potential und wird oft durch die Laser-Doppler-Anemometrie gemessen. Dabei streuen die Teilchen das Licht eines Laserstrahls, wenn sie diesen passieren. Durch den Dopplereffekt tritt eine Frequenzverschiebung des gestreuten Lichts ein, die von der Geschwindigkeit und Ladung des Partikels abhängig ist. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel und dem dazugehörigen Zeta-Potential ist in Tabelle 2.1.3 dargestellt.

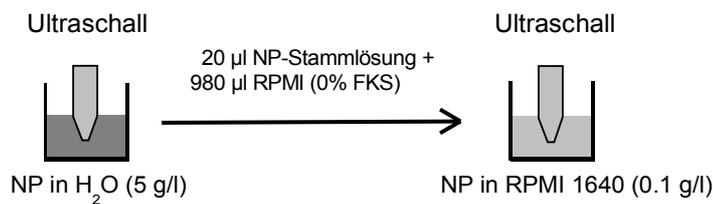
Tabelle 2.1.3 Übersicht des Zeta-Potentials der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel. Die Messung des Zeta-Potentials wurde von Jana Fleddermann in Kulturmedium (RPMI 1640) durchgeführt⁹⁴.

Nanopartikel	Medium (FKS 10 %)	Medium (FKS 0 %)
ZnO	$-11,4 \pm 0,8$	$-10 \pm 0,6$
CeO ₂	$-11,3 \pm 1,9$	$-6,7 \pm 0,8$
TiO ₂	$-11,0 \pm 1,1$	$-7,4 \pm 0,3$
Fe ₃ O ₄	$-11,6 \pm 0,3$	$-9,7 \pm 0,8$
Al ₂ O ₃	$-11,6 \pm 0,4$	$-10,4 \pm 1,0$

2.1.1 Nanopartikelpräparation mittels Ultraschall

Die Herstellung aller in dieser Arbeit untersuchten Nanopartikeln erfolgte unter Verwendung einer NP-Stammlösung von 3 oder 5 g/l in Wasser. Da Nanopartikel im Allgemeinen zur Aggregation neigen, bzw. ihre Größenverteilung inhomogen ist, wurde eine Ultraschallbehandlung durchgeführt. Dabei wurden durch die Scherkräfte die Nanopartikel dispergiert. Der detaillierte Ablauf der Präparation erfolgte jeweils nach dem Schema in Abb. 2.1.1. Die Partikel wurden mit dem Spitzenultraschallgerät (Branson Sonifier 250) präpariert.

A) ohne Proteinkorona (FKS 0%)



B) mit Proteinkorona (FKS 10%)

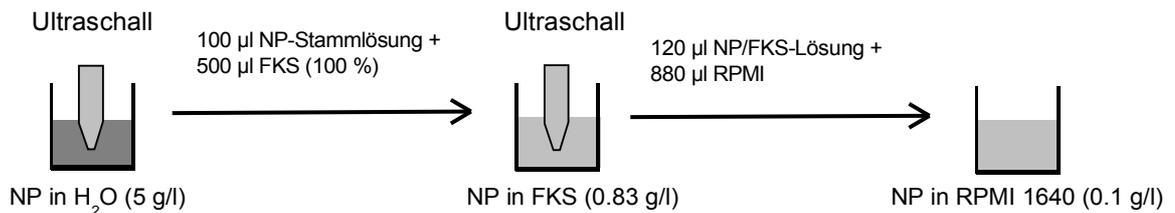


Abb 2.1.1 Schema zur Nanopartikelpräparation mittels Spitzenultraschall **A**) Präparation ohne Proteinkorona (FKS 0%) in Kulturmedium (RPMI 1640) **B**) Präparation mit fetalen Kälberserum (FKS) welches zur Ausbildung einer Proteinhülle um die NP (Proteinkorona) führt.

Da Nanopartikel in der Regel eine große Oberflächenaktivität zeigen und diese deren Aufnahme und zelluläre Verteilung wesentlich beeinflussen können, wurden bei der Präparation mittels Spitzenultraschall zwei verschiedene Präparationstypen, in Ab- oder Anwesenheit einer Proteinkorona, angewendet (Abb. 2.1.1).

Die Ultraschallbehandlung im oben gezeigten Schema wurde hauptsächlich mit dem Spitzenultraschallgerät (Branson Sonifier 250, 20 kHz, 200 W) für 1 Minute pro Arbeitsschritt durchgeführt. Dabei wurde der Wert für Duty Cycle auf 50 % gesetzt und für den Output-Control eine Intensität von 4 ausgewählt. Es ist wichtig zu beachten, ein Röhrchen mit einem kleinen Radius (15 ml Falcon) zur Ultraschallbehandlung zu verwenden, da der Spitzenultraschall eine geringe horizontale Effizienz zeigt. Nach der Ultraschallbehandlung wurde die NP-Stammlösung (0.1 g/l) für 30 Minuten unter UV-Licht sterilisiert.

Im Fall von Graphenoxid-konjugierten-NP erfolgte die NP-Präparation in einem Wasserbad-Ultraschall-Gerät (Firma Bandelin Electronic, Model RK 156 BH), da erfahrungsgemäß kohlenstoffhaltige im Vergleich zu Metalloxid-NP an der Ultraschallspitze kleben bleiben können. Zur Präparation wurde die GO-NP-Stammlösung (GO-Au & GO-Ag je 400 µg/ml) und die NP-Stammlösung (Au & Ag NP je 150 µg/ml) auf der höchsten Intensitätsstufe für 10 Minuten behandelt.

2.2 Probenpräparation

2.2.1 Beschichten von Probenhaltern

Um A549-Zellen auf den für die Ionenstrahlanalyse vorgesehen Probenhaltern zu kultivieren mussten diese mit Fibronectin beschichtet werden, da deren Boden aus dem hydrophoben Material Polypropylen besteht. Die 9,6 cm² große Kulturfläche eines Probenringes ist dabei identisch zu der einer standardisierten Mikrotiterplatte mit 6 Kavitäten. Nach einer Sterilisation mit 80-prozentigem Alkohol unter UV-Licht für 30 Minuten, wurden pro Probenhalter 2 ml einer 5 µg/ml Fibronectinlösung pipettiert und 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2 Kulturzellen

Polypropylenfolie (4 µm Dicke, Goodfellow) wurde auf einen Probenhalter-Ring aufgezogen. Im nächsten Schritt wurden 16000 Zellen pro Quadratcentimeter eingesät und nach einer Inkubationsphase von 24 Stunden erfolgte die Exposition mit NP durch den Austausch des Kulturmediums. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen fünf mal mit PBS (vorgewärmt auf 37°C, ohne Ca oder Mg, pH 7,4) gewaschen, um auszuschließen, dass extrazellulär assoziiertes Nanomaterial den Konzentrationswert verfälscht. Im letzten Schritt wurden die Zellen durch Behandlung mit reinem wasserfreiem Methanol (vorgekühlt auf -20°C) für 10 Minuten direkt auf der Polypropylenfolie fixiert. Bis zum Tag der Analyse wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Im Fall von primären AT-II-Zellen der Ratte erfolgte die Probenpräparation nach dem gleichen Prinzip. Allerdings wurde die Polypropylenfolie mit 50 µg/ml Fibronectin beschichtet. Daneben zeigte sich dass eine ionenstrahlanalytische Analyse auf der siliziumbasierten Dehnfolie nicht möglich war, weil sich die Probe während der Messung auflud. Deshalb wurden die Zellen nach dem Dehnungsexperiment passagiert und unter den oben beschriebenen Konditionen auf einen

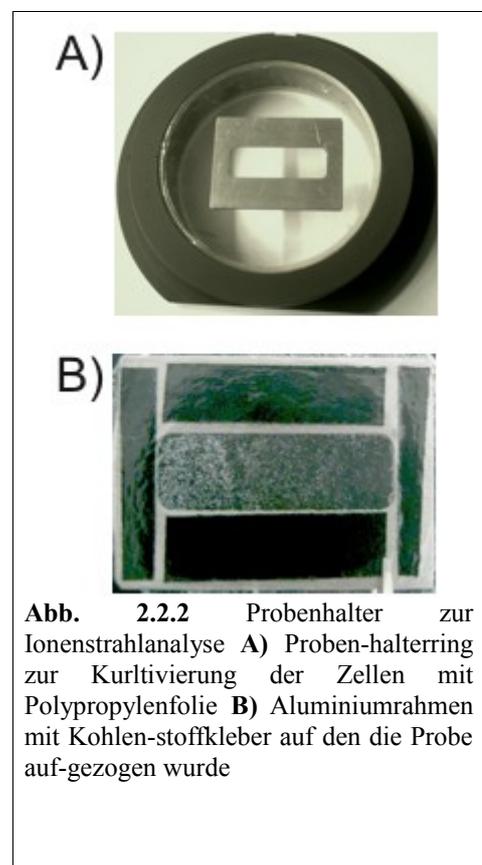


Abb. 2.2.2 Probenhalter zur Ionenstrahlanalyse **A)** Probenhalterring zur Kultivierung der Zellen mit Polypropylenfolie **B)** Aluminiumrahmen mit Kohlenstoffkleber auf den die Probe aufgezogen wurde

Probenhalter-Ring übertragen und fixiert. Im letzten Schritt wurden die Proben mittels leitfähigen Kohlenstoffkleber auf einen Aluminiumrahmen aufgezogen (Abb. 2.2.2). Dieser Arbeitsschritt verkürzt wesentlich die erforderliche Messzeit, da die Probe näher am Röntgendetektor platziert werden kann. Daneben werden Fehlerquellen, z.B. Schattenwurf der Schalenkante, welche durch die Geometrie der Probenkammer entstehen können ausgeschlossen.

2.2.3 Gewebe

Die Experimente welche den Einfluss von NP-Aerosolen auf das Lungengewebe der Maus zum Ziel hatten, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Sören T. Larsen im National Research Center for the Working Environment in Kopenhagen durchgeführt. Nach der Exposition in NP-Aerosol wurde die Mäuse mit CO₂ anästhesiert. Da Lungengewebe eine diffizile Struktur zeigt und die Alveolen leicht während des Präparationsvorgangs kollabieren können, wurde die Methodik der Perfusion gewählt, welche die morphologische Struktur weitestgehend originalgetreu konserviert⁹⁵. Die Präparation von Lungengewebe zur strukturellen Analyse erfolgte, mittels einer frisch hergestellten 4 % Paraformaldehyd-Lösung (in PBS, pH 7,4), durch Perfusion für 30 Minuten. Durch Paraformaldehyd werden die Proteine unter Wasserabspaltung über die Amid-Gruppe vernetzt. Die Lunge wurde vom Thorax entfernt, zweigeteilt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd-Lösung (in PBS, pH 7,4) nachfixiert. Anschließend wurde das Gewebe durch eine aufsteigende Ethanolreihe von 50%, 75%, 85% und 96% für jeweils eine Stunde entwässert. Im nächsten Schritt wurde der Alkohol durch eine Behandlung mit Xylol entfernt. Dazu wurde das Gewebe für jeweils 5 Minuten in drei unterschiedliche Gefäße mit Xylol getaucht. Danach wurden die Schnitte in flüssigen Paraffin eingebettet und nach Leipzig gesendet.

Zur ionenstrahlanalytischen Untersuchung wurde das Gewebe mittels Mikrotom in 10 µm dicke Schichten geschnitten, auf handelsübliche Objektträger aufgezogen und wie oben beschrieben mit Xylol



Abb. 2.2.3 Lungengewebe eingebettet in DePeX und mittels Kohlenstoff- kleber auf einen Aluminiumrahmen zur ionenstrahlanalyse aufgezogen.

behandelt um das Gewebe zu entparaffinisieren[#]. Anschließend wurden die Proben luftgetrocknet und auf die Probe ein Tropfen von ungefähr 100 µl/cm² DePeX (Serva) gegeben. DePeX ist ein Trägermaterial aus Polystyren, Xylol und Weichmachern, welches sich als wasserfreies Einbettmittel für die Mikroskopie etabliert hat. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur war die Konsistenz des Einbettmittels ausreichend fest, um die Schnitte, mit

[#] Die Anfertigung der Gewebeschnitte wurde in Kooperation mit Dr. habil. M. Nowicki (Institut für Anatomie, Universität Leipzig) durchgeführt.

Kohlenstoffkleber präparierten Aluminiumrahmen, vom Objektträger abziehen (Abb. 2.2.3).

Für die Analyse von ZnO-NP wurde das alternative Trägermaterial Limonen verwendet, da DePeX Zink enthält welches inhomogen verteilt ist. Limonen ist ein Naturstoff (Terpen), welcher durch Methanolextraktion oder Wasserdampfdestillation aus Zitrusfrüchten gewonnen wird. Zur Präparation wurden 600 µl Limonen Mount™ (Sigma) mit 200 µl Weichmacher-Lösung (1 M Campher in Chloroform) versetzt und 5 Minuten mittels Vortexer gemischt. Anschließend wurde der Gewebeschnitt mit 100 µl/cm² Limone-Lösung überschichtet. Nach 24 stündiger Aushärtung bei Raumtemperatur und Verflüchtigung des Chloroforms, wurde die gesamte Probe für ungefähr 5 Minuten mit Ethanol (80%) überschichtet. Nach weiteren 5 Minuten wurde mit Hilfe eines Skalpell die Probe vom Objektträger abgezogen und mit Kohlenstoffkleber auf einem Aluminiumrahmen befestigt.

2.2.4 Dehnung von primären AT-II-Zellen

In Zusammenarbeit mit Prof. H. Wirtz und Dr. H. Kuhn der Abteilung für Pneumologie wurden von Marcus Buschner primäre ATII-Zellen aus der Rattenlunge (männliche Sprague Dawley Ratte) mit Hilfe von Elastase (25 µg/ml) isoliert¹¹⁸ und auf einem dehnbaren Substrat auf Siliziumbasis (Bioflex, Flexcell International) kultiviert. Vor der Kultivierung wurde das Substrat für 24 Stunden mit Fibronectin (50 µg/ml) beschichtet. Die Dehnung erfolgte unter Einsatz des FX-4000T Flexercell-Tension-Plus-Systems (Flexcell International). Dabei wurden drei verschiedene Dehnungsmodi eingesetzt: 40-15, 40-30 und 60-15. Hier beschreibt beispielsweise die Bezeichnung 40-15 eine Dehnung bei einer Frequenz von 40 min⁻¹, wobei durch die Dehnung eine Oberflächenänderung von 15 % eintritt. Der Modus 40-15 simuliert eine physiologische Atmung unter Ruhebedingungen, Modus 40-30 beschreibt eine unphysiologische tiefe Atmung und Modus 60-15 eine Atmung unter starken Arbeitsbedingungen.

2.3 Technik der Ionenstrahlmikroskopie

Zur Analyse der physiologisch relevanten zellulären Elementverteilung von P, S, Cl, K, Ca, Fe und Zn sowie der Detektion der NP relevanten Elemente Al, Ti, Fe, Zn, und Ce in Lungenzellen wurde die Methode der Ionenstrahlmikroskopie angewendet. Das Ziel der orts aufgelösten zellulären Konzentrationsbestimmung wurde dabei durch die Kombination zweier verschiedener Spektroskopie-Methoden (RBS, PIXE) erreicht. Die genannten Spektroskopie-Methoden wurden im Ionenstrahlmikroskop-Laboratorium an der Nanosonde LIPSION der Fakultät für Physik und

Geowissenschaften der Universität Leipzig durchgeführt. Weitere bedeutende Ionenstrahllaboratorien, welche ebenfalls wichtige Beiträge im Bereich der Biologie oder Medizin geleistet haben, befinden sich in Singapur (F. Watt)⁹⁶, Takasaki (Y. Kobayashi)⁹⁷, Oxford/Surrey (G. Grime)⁹⁸, München (G. Dollinger)⁹⁹ und Bordeaux (R. Ortega)¹⁰⁰.

2.3.1 Ionenstrahllaboratorium Lipsion

Das seit 1998 im Betrieb befindliche Ionenstrahllaboratorium Lipsion stellt eine der weltweit leistungsfähigsten Anlagen dieser Art dar¹⁰¹. Die Bezeichnung Lipsion setzt sich dabei aus Lipsia und Ion zusammen. Lipsia ist ein alter slawischer Name für die Stadt Leipzig und kann mit „Linden-Ort“ übersetzt werden.

Die wesentlichen Bestandteile der Anlage sind ein SingletronTM Linearbeschleuniger (max. 3,5 MeV), je ein Schalt- und 90°-Magnet, eine RBS/Channeling Kammer, jeweils ein Objekt -und Apertur-Blendensystem, einer Fokussiereinrichtung in Form eines russischen Quadrupletts und einer Probenkammer (Nanosonde) am Ende der Beamline (Abb. 2.3.1). Der Beschleuniger funktioniert nach dem Prinzip von Cockroft und Walton und die Ionenquelle besteht aus einer Glasröhre welche mit Wasserstoffgas (H₂) oder Helium (He) gefüllt ist. Nach einer Ionisierung werden die Ionen unter Hochspannung beschleunigt. Dabei ergibt sich die kinetische Energie der Teilchen aus der Potentialdifferenz und der Ladung der Teilchen ($E_{\text{kin}} = U \cdot q$). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt (November 2012) ist es möglich die Anlage mit Protonen (H⁺), Molekülen (H²⁺) oder Heliumionen (He⁺) als Inzidenzteilchen zu betreiben. In den Resultaten der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Protonen mit einer Energie von 2250 keV als Inzidenzteilchen verwendet. Der Ionenstrahl wird in einem elektrostatischen Linearbeschleuniger erzeugt, wobei nach dem Austritt aus dem Beschleunigungsrohr elektrostatische Ablenkplatten die Position des Strahls justieren. Die gesamte Strahlführung erfolgt in der sogenannten Beamline im Hochvakuum, im Bereich von 10⁻⁸ mbar, um einen Verlust an Brillanz zu minimieren.



Abb 2.3.1 Übersicht Lipsion Laboratorium (A) und Nanosonde-Messplatz (B).

Nach dem Austritt aus dem Beschleuniger ist es möglich den Strahl mittels Schaltmagnet in die RBS/PIXE/Channeling-Messkammer zu lenken. Eine orts aufgelöste Analyse ist in dieser Kammer nicht gegeben, allerdings erlaubt der Einsatz relativ hoher Ströme eine statistisch genauere RBS-Analyse sowie PIGE (Particle Induced Gamma-ray Emission) Untersuchungen. Um eine Teilchenselektion bezüglich der Teilchenart und der Energie zu erreichen, wird ein 90° Magnet eingesetzt. Durch das Magnetfeld (B) wirkt eine Lorentzkraft auf die Teilchen ein. Diese werden durch ihre Masse (m) und Ladung (q) charakterisiert und befinden sich durch die Lorentzkraft auf einer Kreisbahn mit einem definierten Radius (R). Aus der Gleichsetzung von Lorentzkraft und Zentripetalkraft folgt Gleichung 2.3.1:

$$R = \frac{\sqrt{2m E_{kin}}}{q B} \quad (2.3.1)$$

Im weiteren Strahlverlauf dient eine Objekt- und Aperturblende zur Strahlkollimierung und ggf. zur Einstellung des Messstroms. Zur Analyse von biologischen Proben wurde eine Objekt-Blende mit $100 \mu\text{m}$ und eine Aperture-Blende mit $300 \mu\text{m}$ Größe verwendet. Zusätzlich sind zwischen den Quadrupol-Linsen-Paaren zwei weitere kleine Blenden installiert, um die Streuung des Strahls in x - und y -Richtung zu minimieren. Bevor der Strahl in die Probenkammer eintritt, erfolgt die Fokussierung durch einen Elektromagneten (Quadrupol). Zusätzlich sorgt eine hinter dem zweiten Dublett befindliche Rastereinheit für die Ablenkung des Strahls in horizontale und vertikale Richtung. Dies ermöglicht, in Abhängigkeit des gewählten Messstroms und der Blenden-Konfiguration, die orts aufgelöste Analyse der Probe im Mikro -oder Nanometerbereich in der Nanosonde. Im Allgemeinen ist die gesamte Beamline auf einem über 10 Meter tiefen Fundament platziert, um äußere mechanische Störsignale zu eliminieren. Zusätzlich dient eine aktive Streufeldkompensation (AMK-5) zur Abschirmung externer Magnetfelder. Die ablenkenden Kräfte werden dabei durch drei Helmholtzspulen-Paare kompensiert.

2.3.2 Probenkammer (Nanosonde)

Die Probenkammer des Lipsion ist für zwei verschiedene Modi entwickelt worden. Im geschlossenen Zustand werden Proben unter Vakuum analysiert und ausserdem können Studien mit einem externen Strahl durchgeführt werden. In letzteren Fall ist die zusätzliche Installation einer speziellen Austrittsnase zu beachten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien wurden ausschließlich unter Vakuumbedingungen durchgeführt. Die wesentlichen Elemente der

Probenkammer sind: Röntgendetektor, RBS-Detektor, Stage und das Mikroskop (Abb. 2.3.2). Wahlweise kann neben dem Mikroskop eine PIN-Diode installiert werden, welche direkt hinter der Probe als STIM-Detektor dient.

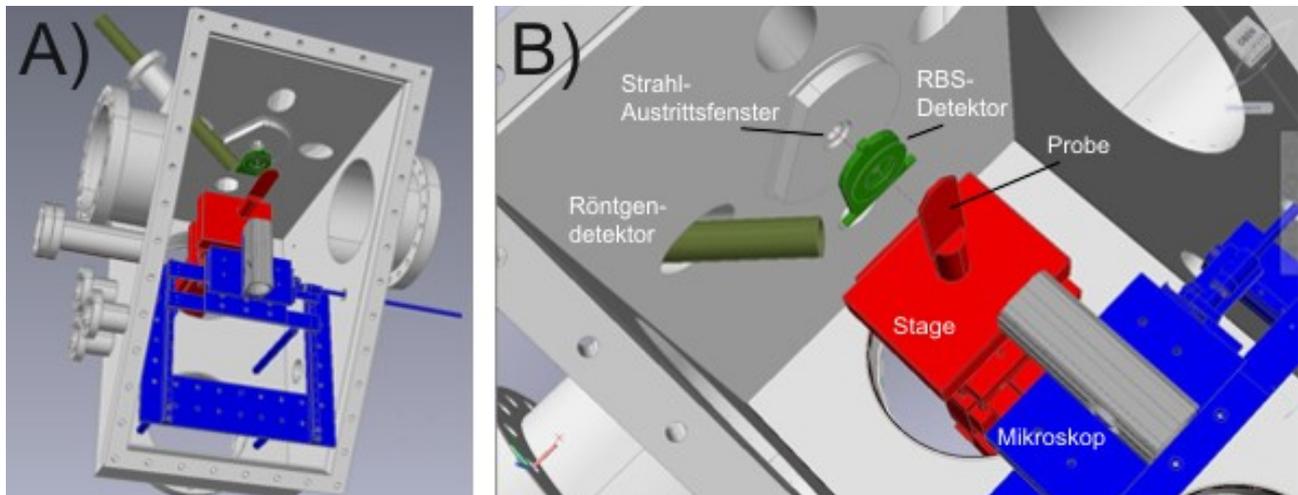


Abb. 2.3.2 Darstellung der Probenkammer (Nanosonde) am LIPSION. **A)** Übersichtsdarstellung der geöffneten Kammer **B)** Detaillierte Darstellung der wesentlichen Einzelkomponenten. Alle Abbildungen wurden maßstabsgetreu mit der Software AutoCAD von Dipl.-Ing. Joachim Starke entworfen.

Der Röntgendetektor (Canberra HPGe, Auflösung 148 eV bei 5,9 keV) ist in einem Winkel von 135° zur Strahlachse installiert, was einer Cornell-Geometrie entspricht. Dabei ist der Röntgendetektor im Vergleich zum RBS-Detektor nicht fix positioniert, sondern es ist möglich den Abstand zwischen Probe und Röntgendetektor zu variieren (Abb. 2.3.2). Als RBS-Detektor dient ein PIPS-Ringdetektor. Die Konstruktion des RBS-Detektors erlaubt es durch ein wenige Millimeter breites Loch in der Mitte des Detektors ein Strahlaustrittsfenster zu gewährleisten. Unter Berücksichtigung der Detektorfläche, ergibt sich somit ein mittlerer Rückstreuwinkel von 6° für den RBS-Detektor.

Um eine mögliche Wechselwirkung der Inzidenzteilchen mit Atomen aus der Luft zu minimieren, wurden die Messungen in der Nanosonde stets unter Hochvakuum (10^{-6} Torr) durchgeführt. Die Zahl der Moleküle pro cm^3 kann dadurch um etwa zehn Dimensionen verringert werden (Normaldruck $\sim 2,7 \times 10^{19}$ Moleküle pro cm^3 ; Hochvakuum $\sim 10^9 - 10^{13}$ Moleküle pro cm^3). Die benötigte Zeit zur Evakuierung betrug ungefähr 30 Minuten.

Zur Positionierung der Probe wurde eine Plattform (Stage) eingesetzt, welche sich mit Hilfe der Software mpStage in drei Ebenen verschieben lässt (X-Y-Z). Die Verschiebung der einzelnen Ebenen wird jeweils mit Hilfe eines piezoelektrischen (X-Z-Achse) und elektrischen Motors (Y-Achse) realisiert. Die Genauigkeit liegt im Bereich von ca. 100 nm. Parallel zur Stage kann ein Goniometer (in Abb. 2.3.2 nicht gezeigt) betrieben werden. Das Goniometer ermöglicht es, die

Proben während Aufnahme zu drehen und erlaubt so eine dreidimensionale Rekonstruktion des analysierten Materials¹⁰². In dieser Arbeit kam während der Messungen das Goniometer nicht zum Einsatz.

2.3.3 Messvorgang und Fokussierung

Zur Aufnahme der Daten wurde das Programm MpSys verwendet. Dieses wird ebenfalls wie das Programm zur Steuerung der Stage (mpstage) unter Linux betrieben. Die Datenspeicherung erfolgte dabei in sogenannten „Eventfiles“ (EVT-Dateiformat), wobei aufkommende Daten sukzessive in Echtzeit, in die Datei geschrieben werden. In direkter Kopplung mit der mpSys-Software steht eine „beam-blanker“ Einheit, welche den Eintritt des Strahls in die Probenkammer in Abhängigkeit vom Start oder Stop der Messung regelt. Die eigentliche Messung erfolgt durch das Abtasten der Probe, welches durch eine elektromagnetische Ablenkeinheit nach dem Linsensystem erreicht wird. Am Lipsis sind dabei prinzipiell drei verschiedene Mess-Modi möglich: Raster, Triangle und Shape. Wie in Abb. 2.3.3.1 dargestellt, wurde für diese Arbeit ausschließlich das Raster verwendet. Durch die Wahl unterschiedlich starker Magnetfelder ist es möglich, die Scanfeldgröße einzustellen. Die verfügbaren Größen, für die X- oder Y-Ebene, gestalten sich wie folgt: 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 μm . Es ist anzumerken, dass die Rastereinheit nicht auf das Scannen einer quadratischen Fläche limitiert ist.

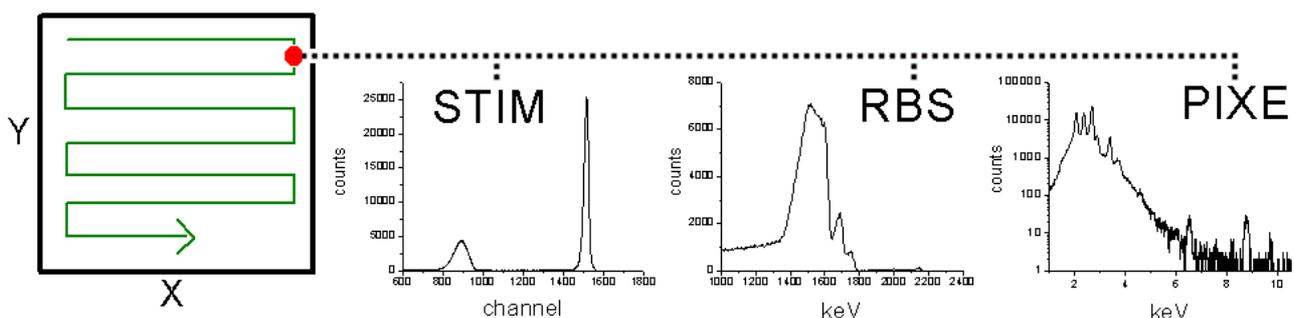


Abb 2.3.3.1 Messschema der Rastereinheit am Lipsis. Während des Messvorgangs im Zeilenraster können die drei verschiedenen Analysemethoden PIXE, RBS und STIM gleichzeitig durchgeführt werden.

Es können beispielsweise rechteckige Flächen (25 μm x 800 μm) gescannt werden, was in den Materialwissenschaften beim Protonenstrahlschreiben Anwendung findet. Darüber hinaus ist die Analysefläche nicht auf die oben genannten Scanfeldgrößen beschränkt, sondern kann beliebig mit einem sogenannten „scaling-factor“ skaliert werden. Theoretisch sind dabei auch kleinere Flächen als 156 μm^2 analysierbar. Allerdings bleibt die Auflösung beim Einsatz des scaling-factors

identisch, so dass im Fall der PIXE-Analyse, welche eine routinemäßige Auflösung ca. 1 μm zeigt, eine Scanfeldgröße unterhalb von 12 x 12 μm nicht sinnvoll ist. Ein weiterer wichtiger Parameter zur Datenaufnahme ist der Trigger. Dieser bestimmt nach welchem Parameter die Datenaufnahme ausgerichtet wird. Verfügbare Parameter sind: Zeit (clock), Ladung (charge) und external (externes Signal). In dieser Arbeit wurde die Messung primär nach der Zeit ausgerichtet, d.h. der Strahl verweilt während des Rastervorgangs eine fixe Zeit von 250 μs pro Pixel und wandert anschließend zum nächsten Pixel weiter.

Durch eine geeignete Anpassung des Fokussierstromes am Quadrupol, kann die Auflösung des Systems effektiv verändert werden. Zur Bestimmung des Auflösungsvermögens wurde ein Kupfergitter der Firma Plano als Standardprobe verwendet (Abb. 2.3.3.2 A & B). Durch die Betrachtung zweier Extrempunkte (Minimum und Maximum der Pixe-Ausbeute) einer Masche kann das Auflösungsvermögen in Mikrometern abgelesen werden (Abb. 2.3.3.2 C). Dabei werden die beiden Extrempunkte jeweils 12,5 % unterhalb des Maximums und oberhalb des Minimums festgelegt. Üblicherweise lag die laterale Auflösung routinemäßig im Bereich von 700 – 1500 nm für PIXE. Im Fall von STIM konnte beispielsweise ein deutlich besseres Auflösungsvermögen im Bereich von 250 nm erzielt werden, da bei STIM durch eine Blenden-Konfiguration mit geringerem Durchmesser wesentlich niedrigere Ströme als bei PIXE eingesetzt wurden.

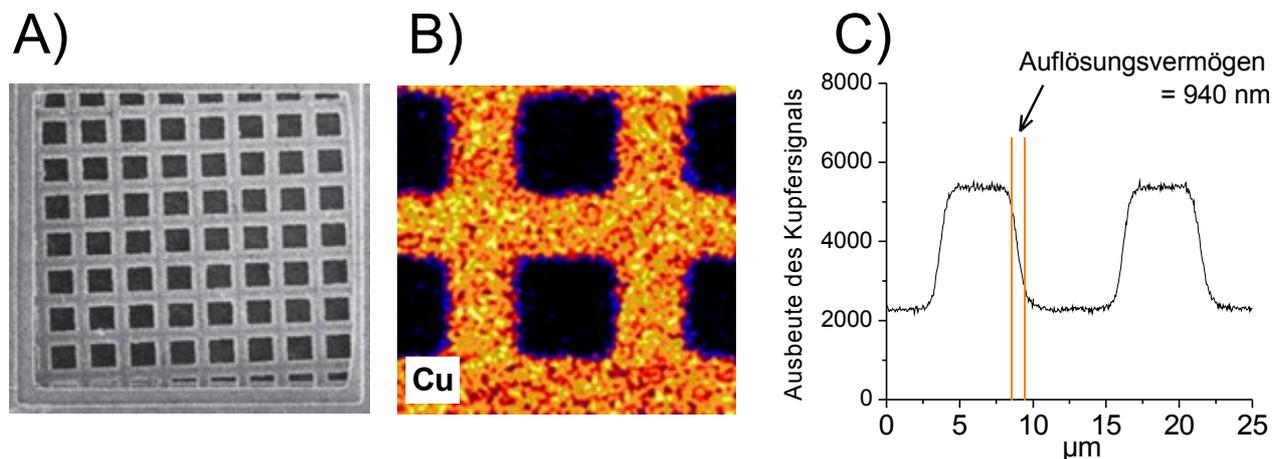


Abb 2.3.3.2 Standardprobe zur Bestimmung der Auflösung bei den PIXE-Messungen. **A)** Mikroskopische Aufnahme der kommerziellen Standardprobe (Kupfergitter). **B)** PIXE-Ausbeute des Kupfersignals der Standardprobe. **C)** Bestimmung des lateralen Auflösungsvermögens unter Berücksichtigung des Minimums und Maximums des PIXE-Signals.

2.2.4 Datenaufnahme- und Verarbeitung

Der Röntgendetektor (EG&G Ortec) am Lipsion ist ein Germaniumdetektor welcher zu der Klasse der Halbleiterdetektoren zählt. Wenn ein Röntgenquant auf den Kristall trifft erzeugt er ein Elektron-Loch-Paar im Kristall. Die Anzahl der Elektron-Loch-Paare (freie Ladungsträger) ist dabei proportional zur Energie des Quants und wenn die freien Ladungsträger in einem elektrischen Feld zu den Elektroden wandern ist ein Stromimpuls detektierbar. Der im Detektor erzeugte Impuls wird jeweils durch einen Vorverstärker verstärkt und mittels einer ADC (Canberra) in ein digitales Signal umgewandelt. Danach wird das Signal mit dem MicroDas-System (MARC Melbourne) verarbeitet. Dieses erlaubt den gleichzeitigen Betrieb von bis zu vier Kanälen, so dass bis zu vier Ionenstrahlanalytische Methoden gleichzeitig durchgeführt werden können. Somit wird die X- und Y-Position und der Kanal (Energieinhalt des Quants) des Impulses durch das MicroDas-System an den Messcomputer vermittelt. Dort werden die Daten sukzessiv in eine Event-Datei, durch das Programm MpSys, gespeichert. Gleichzeitig ist MPSys das Programm, welches erlaubt die Messung mit vielfältigen Funktionen zu steuern und die zweidimensionale Elementverteilung der Probe während der Messung darzustellen (Mapping).

2.3.5 Ladungsbestimmung

In Abhängigkeit der Probenstruktur kann die Ladung (Q) an der Nanosonde durch verschiedene Methoden direkt während der Datenaufnahme gemessen oder aus dem Rückstreupektrum bestimmt werden. Die fehlerfreie Integrierung der Ladung ist für die Konzentrationsbestimmung mittels PIXE sehr wichtig, da sie die Gesamtzahl der auf die Probe getroffenen Inzidenzteilchen repräsentiert und diese direkt in die Konzentrationsberechnung für jedes Element einfließen. Absorbiert die Probe den Ionenstrahl vollständig, so ist es möglich den Strom direkt vom Probenmaterial abzuleiten und über ein Amperemeter zu bestimmen. Allerdings sind biologische Proben in der Regel nicht leitfähig.

2.3.5.1 Apertur-Blende

Durch die direkte Ableitung des Stroms von der Apertur-Blende ist es möglich die Anzahl der auf die Probe getroffenen Protonen zu bestimmen⁸⁰. Dabei wird in Abwesenheit der Probe zwischen dem Strom an der Apertur-Blende und dem Strom im Faraday-Becher ein Kalibrationsfaktor gebildet. Während der Datenaufnahme wird die Ladung über den Strom der Apertur-Blende integriert und

nach der Messung mit Hilfe des Kalibrationsfaktors errechnet, welche Ladung auf die Probe getroffen ist. Voraussetzung für diese Methode ist allerdings die Annahme, dass die Stromstärke während der gesamten Messung konstant bleibt.

2.3.5.2 Faraday-Becher

Im Falle einer relativ dünnen Probe mit geringer Dichte, kann der Strom direkt durch einen Faraday-Becher hinter der Probe bestimmt werden. Da biologische Proben nur einige Mikrometer dick sind und eine Dichte um eins aufweisen, kommen sie für diese Art von Ladungsbestimmung in Frage. Allerdings zeigt diese Methode den Nachteil, dass durch eine potentielle Streuung des Strahls, welche von der Struktur und Dichte der Probe abhängig ist, nicht alle Teilchen in den Faraday-Becher treffen.

Daneben ist die Innenseite des Faraday-Bechers mit Kohlenstoff ausgekleidet und das Rückstreusignal dieses Kohlenstoffs ist ebenfalls im Rückstreupektrum zu erkennen (Abb. 2.3.5.2 A).

Die Signalausbeute hängt dabei von der Größe der transparenten Probenfläche ab, da beispielsweise die Aluminium-Rahmen auf den die Proben aufgezogen wurden, verschiedene Größen zeigen und die vom Faraday-Becher zurückgestreuten Protonen vollständig absorbieren.

Somit besteht die Gefahr, dass das Kohlenstoff-Rückstreusignal von Faraday-Becher mit dem zellulären Signal überlappt. Dadurch wäre zu erwarten, dass sich die Gesamtladung der biologischen Probe mit der Ladung vom Kohlenstoff des Faraday-Bechers addiert. Im Experiment konnte dies jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 2.3.5.2 B), da Protonen, welche vom Faraday-Becher zurückgestreut werden, die Probe ein zweites Mal vollständig passieren müssen bevor sie in den RBS-Detektor treffen können. Dabei verlieren sie eine ähnliche Energie wie bei der ersten Passage, was sich im RBS-Spektrum in der Breite des Spektrums widerspiegelt. Somit muss das Gesamtspektrum in zwei Einzelspektren aufgetrennt werden und das Kohlenstoff-Signal der vom Faraday-Becher zurückgestreuten Protonen, kann erst hinter dem Kohlenstoff-Signal der Zellprobe beginnen.

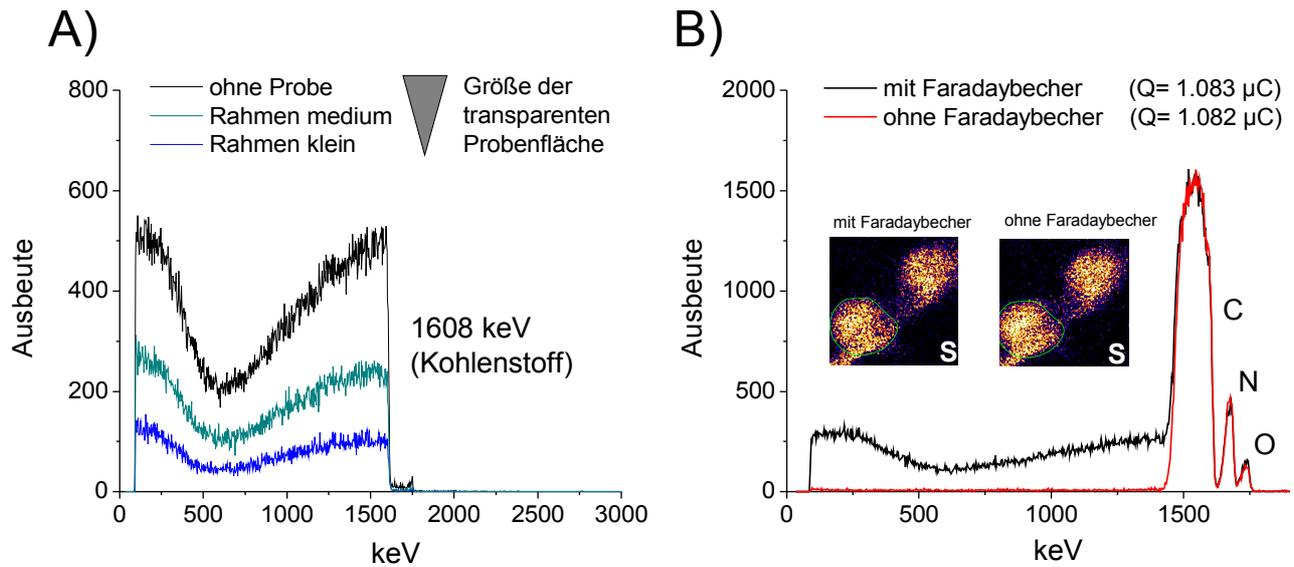


Abb. 2.3.5.2 Von Kohlenstoff zurückgestreute Protonen des Faraday-Behers haben keinen Einfluss auf die Ladungsbestimmung in biologischen Proben mittels Faraday-Behers. **A)** Signalstärke der zurückgestreuten Protonen in Abhängigkeit der transparenten Probenfläche. Der Aluminiumrahmen auf den die Probe aufgebracht wurde zeigt unterschiedliche Größen und absorbiert die Rückstreuereignisse des Faraday-Behers vollständig **B)** Einfluss des Faraday-Behers-Kohlenstoffs auf die Ladungsbestimmung im Zellexperiment. Die Ladung für die entsprechende Zelle (grün markierte ROI) wurde mittels Simulation in SIMNRA in zwei aufeinanderfolgenden Messungen mit (schwarz) und ohne (rot) Faraday-Behers bestimmt. Alle Daten wurden bei identischer Messzeit aufgenommen.

2.3.5.3 Fit des RBS-Spektrums

Daneben kann die Ladung über die Simulation und den Fit des RBS-Spektrums ermittelt werden, wenn der Wirkungsquerschnitt aller in der Probe vorhandenen Elemente bekannt ist. Da die Matrix biologischer Proben aus Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff besteht und die Wirkungsquerschnitte diese Elemente sehr gut charakterisiert sind, ist es bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben möglich, die Ladung der Messung durch den Fit des Rückstreuspektrums zu erlangen.

Der Vorteil, im Vergleich zu den anderen Methoden der Ladungsbestimmung, besteht darin, dass durch den Fit des RBS-Spektrums die Ladung pro Einzelzelle ermittelt werden kann. Dies ist von Bedeutung, da die Proben der Lungenzellen im gesamten Scanfeld keine homogene Dicke aufweisen. Daneben zeigen die anderen Methoden zur Ladungsbestimmung Fehlerquellen, wie z.B. die Streuung oder die Schwankung der Stromstärke, die bei der Ladungsbestimmung durch den Fit des RBS-Spektrums nicht auftreten.

Durch eine Kontrollmessung mit einer 4 µm dicken Polypropylenfolie konnte festgestellt werden,

dass die Ladungsbestimmung hinter der Probe mittels Faraday-Becher und durch die Simulation des RBS-Spektrums ähnliche Werte mit geringer Abweichung ergeben. Somit wurde die Simulation des RBS-Spektrums zur Ladungsbestimmung verwendet.

Bei einer Blendenkonfiguration von 100 μm (Objekt-Blende) und 300 μm (Apertur-Blende) konnten routinemäßig Ströme von 200 – 700 pA beobachtet werden. Eine maximale Schwankung um bis zu 50 % in einem Messzeitraum von 60 Minuten wurde ebenfalls beobachtet, wobei durch den Austausch der Ionenquelle eine Reduzierung dieser Schwankung eintrat. Die zur Bestimmung der zellulären Konzentration erforderliche Ladung betrug ungefähr 0,5 μC und es war eine Messzeit von ca. 20 – 60 Minuten notwendig, um diesen Wert für die zelluläre Ladung zu erreichen.

2.3.6 Totzeitkorrektur

Ein potentielle Fehlerquelle bei der Konzentrationsbestimmung ist die Totzeit. Treffen zwei Photonen sehr kurz hintereinander in den Detektor, so kann es passieren das nach der Detektion des ersten Photons der Detektor bzw. die Meßelektronik für eine gewisse Zeit „blind“ ist und das Zweite Ereignis nicht registriert wird. Die Zeitspanne, die ein Detektorsystem benötigt, um ein zweites Ereignis zu registrieren wird in der Teilchenmesstechnik als Totzeit bezeichnet. Totzeiten können am Lpsilon sowohl bei RBS-, STIM-, als auch bei PIXE-Messungen beobachtet werden. Bei ersteren führt die Totzeit zur Verringerung der detektierten Ladung und bei letzteren zu einer niedrigeren Intensität des spezifischen Röntgenpeaks.

Da biologische Proben aber relativ dünn sind und eine Dichte um 1 g/cm^3 zeigen, konnte bei den oben genannten Strömen keine wesentliche Totzeit ($T_z < 5\%$) für RBS oder PIXE beobachtet werden. Zur Kalibration des Detektorsystems ist es jedoch notwendig näher auf die Totzeit bzw. deren Korrektur einzugehen, da die dafür verwendeten Elementstandards eine hohe Dichte und somit eine hohe Impulsrate aufweisen.

Um die Totzeit des Systems zu bestimmen, wurde im Wintersemester 2011/12 von J. Vogt, R. Wunderlich und N. Klinger ein System zu Bestimmung der Totzeit eingerichtet (Abb. 2.3.6 A). Dieses System basiert im Wesentlichen in der Einspeisung eines artifiziellen Impulses in das Detektionsystem. Der PIXE-Detektor ist dafür eigens mit einem Testeingang ausgestattet, welcher Impulse an den Detektorkristall leitet. Gleichzeitig wurde die identische Impulszahl direkt in den Verstärker von dem Analog-Digital-Umsetzer 2 (ADC 2) eingespeist. Anfangs wurde das künstliche Signal in zeitlich konstanten Abständen generiert. Während der Datenaufnahme bei biologischen Proben erreichen die Signale den Röntgendetektor allerdings in zeitlich variierenden Abständen.

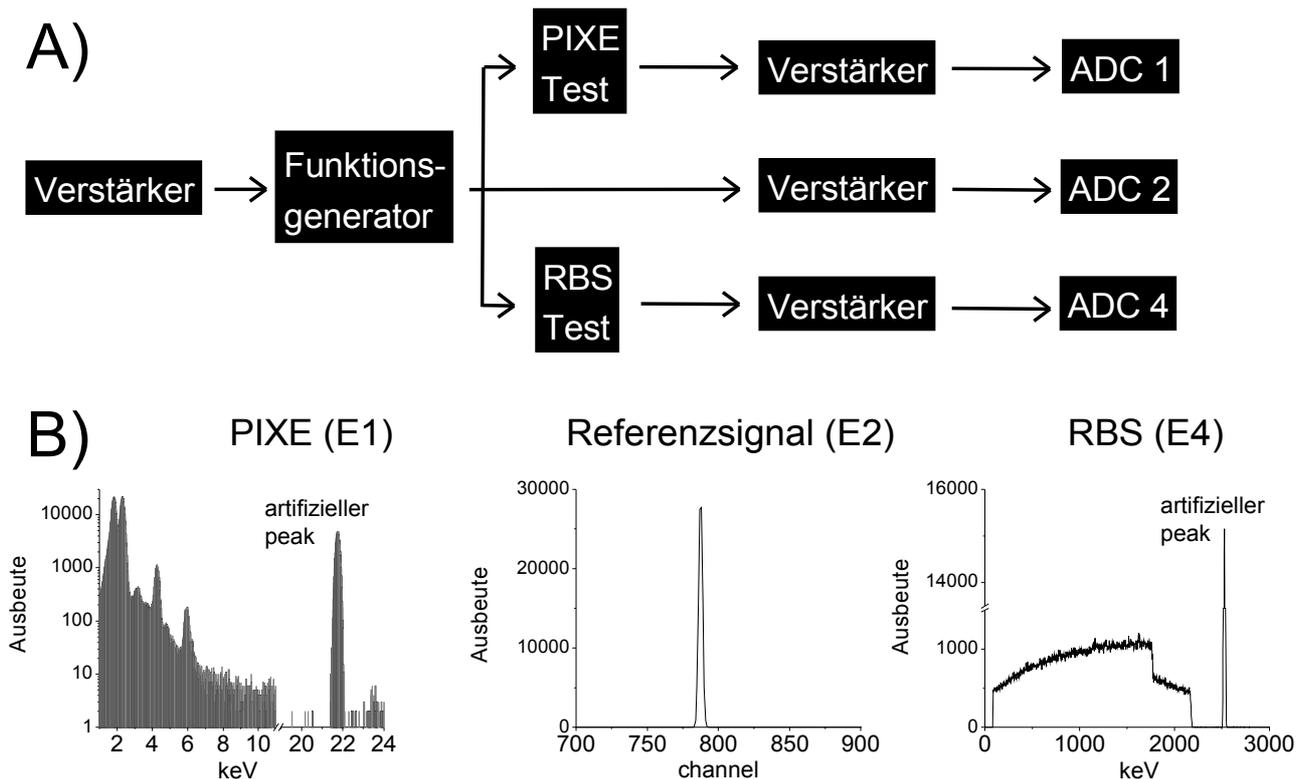


Abb 2.3.6 Funktionsweise der Totzeitbestimmung am Lipsion **A)** Schema zur Produktion und Leitung des Testimpulses¹⁰³. PIXE Test und RBS Test beschreiben jeweils die Testeingänge der beiden Detektoren. **B)** Darstellung des künstlich eingespeisten Peaks in typischen Spektren zur Messung einer Standardprobe (SrSO_4). Energiestation 2 (E2) zeigt das reine Signal, welches durch Vergleich desselben Signals in PIXE (E1) und RBS (E4) zur Ermittlung der Totzeit verwendet wurde.

Um die Totzeit unter Bedingungen zu bestimmen die dem Experiment ähneln, wurde ein Aufbau der Totzeitkorrektur gewählt, bei dem die Ereignisse zeitlich zufällig korrigiert wurden. Dazu wurde an einem Verstärker ein Rauschen im Voltbereich eingestellt. Dieses Rauschen wurde als zeitliches Triggersignal für den Funktionsgenerator verwendet, welcher beim überschreiten des Schwellwerts einen Testimpuls (Frequenz 100 Hz, Amplitude 0.74 V) ausgab (Abb. 2.3.6 A).

Der Testimpuls des Funktionsgenerators wurde gleichzeitig in den Testeingang des RBS- sowie PIXE-Detektors und direkt in den Verstärker vor der ADC 2 des EDV-Systems eingespeist (Abb. 2.3.6 A). Die Testimpulse wurden dabei identisch zu den Impulsen, welche von detektierten Photonen stammen behandelt und digitalisiert. Dadurch sind diese durch symmetrische peaks in den Spektren der Energiestation E1, E2 und E4 zu erkennen (Abb. 2.3.6 B). Energiestation 2 (E2) zeigt dabei die Zähler welche direkt vom Generator kommen (Referenzsignal) und zur Ermittlung der Totzeit mit den Zählern des PIXE- und RBS-Kanals (E1 & E4) verglichen wurden. Die prozentuale Totzeit (T_{tot}) wurde jeweils durch das Verhältnis zwischen detektierten und eingespeisten Impulsen berechnet (Gleichung 2.3.6).

$$T_{tot} = 1 - \frac{Impulse_{detektiert}}{Impulse_{generiert}} \quad (2.3.6)$$

Hierbei ist zu beachten, dass anstelle des Peakmaximums die gesamte Impulszahl der Peakfläche zur Berechnung der Totzeit verwendet wurde.

Bei der Analyse der Standardproben, welche i.d.R. Minerale waren, wurde dabei der Strom über eine entsprechende Blendenkonfiguration so eingestellt, dass die Totzeit für PIXE typischerweise unter 50 % lag. Gleichzeitig wurde die Totzeit für RBS auf einen vernachlässigbaren Bereich deutlich unter 5% eingestellt. Im letzten Schritt wurde der totzeitbedingte Fehler in der Konzentrationsberechnung für jeweilige Messung korrigiert, indem die Gesamtladung der Messung mit dem Quotient aus detektierten und generierten Impulsen multipliziert wurde.

2.4 Angewandte Methodik der Ionenstrahlmikroskopie

2.4.1 Rutherford-Rückstreupektrometrie (RBS)

Bei der Spektrometrie nach Rutherford wird das Verhalten zurückgestreuter Partikel an Atomen untersucht¹⁰⁴. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode vorwiegend zur Bestimmung der Probendicke, Probenkomposition und Ladung eingesetzt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Proton mit einem Atom wechselwirkt hängt im Wesentlichen von der Masse des rückgestreuten Ions (m) des Zielatoms (M) und dem Rückstreuwinkel (Θ) ab. Durch die Erhaltungssätze von Energie und Impuls kann der kinematische Faktor (Gleichung 2.4.1-1) erhalten werden. Dieser ist für jedes Atom spezifisch und lässt somit die Charakterisierung der in der Probe vorkommenden Atome mittels RBS zu. Bei gegebener Inzidenzenergie (E_0) generieren Atome mit großer Masse im Allgemeinen höhere Rückstreuenergien (E) als Atome mit niedrigeren Massen und generell nimmt der Wirkungsquerschnitt mit steigenden Rückstreuwinkel ab.

$$K = \frac{E}{E_0} = \left[\frac{\cos \Theta + \sqrt{\left(\frac{M}{m}\right) - \sin^2 \Theta}}{\frac{M}{m} + 1} \right]^2 \quad (2.4.1-1)$$

Über das Verhältnis der Kantenhöhen im RBS-Spektrum, lässt sich das Verhältnis der elementspezifischen Konzentrationen in der Probe bestimmen. Eine absolute Quantifizierung ist dabei nur indirekt durch den Einsatz eines internen Standards möglich. Ein großer Vorteil der RBS-

Methode ist eine Information über die Tiefenverteilung eines spezifischen Elements zu erhalten. Am Lippson ist der RBS-Detektor (PIPS-Ring Detektor) so installiert, dass sich für die Rückstreuungsspektroskopie ein mittlerer Rückstreuwinkel (Theta) von 174° ergibt.

Als Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass eine Wechselwirkung zwischen einem Inzidenzteilchen und einem Streukörper stattfindet, ist der Wirkungsquerschnitt gebräuchlich (engl. cross section), welcher in der Einheit Barn ($1 \text{ Barn} = 10^{-28} \text{ m}^2 = 100 \text{ fm}^2$) pro Steradian angegeben wird (Abb. 2.4.1-1). In biologischen Proben ist Kohlenstoff das wichtigste Element zur Bestimmung der Ladung durch die Simulation des RBS-Experiments, da er für die meiste Zahl der zurückgestreuten Protonen in biologischen Proben verantwortlich ist (Abb. 2.4.1-2 B). Neben Kohlenstoff sind Stickstoff und Sauerstoff die wesentlichen Atome der Matrix biologischer Proben. Dabei zeigen insbesondere die Wirkungsquerschnitte für Kohlenstoff und Stickstoff einige Extrempunkte, wo der Wirkungsquerschnitt stark ansteigt oder abfällt. Dies kann durch den sogenannten non-Rutherford-Effekt, welcher in einem nachfolgenden Kapitel thematisiert wird, erklärt werden. Es ist wichtig zu verstehen, dass in der Rückstreuungsspektrometrie generell zwei Parameter unabhängig voneinander aus dem Spektrum gewonnen werden können. Da Partikel welche tiefer in die Probe eindringen wesentlich mehr Energie verlieren als Partikel welche an der Oberfläche zurückgestreut werden, kann aus der Breite des Spektrums die Dicke der Probe abgelesen werden.

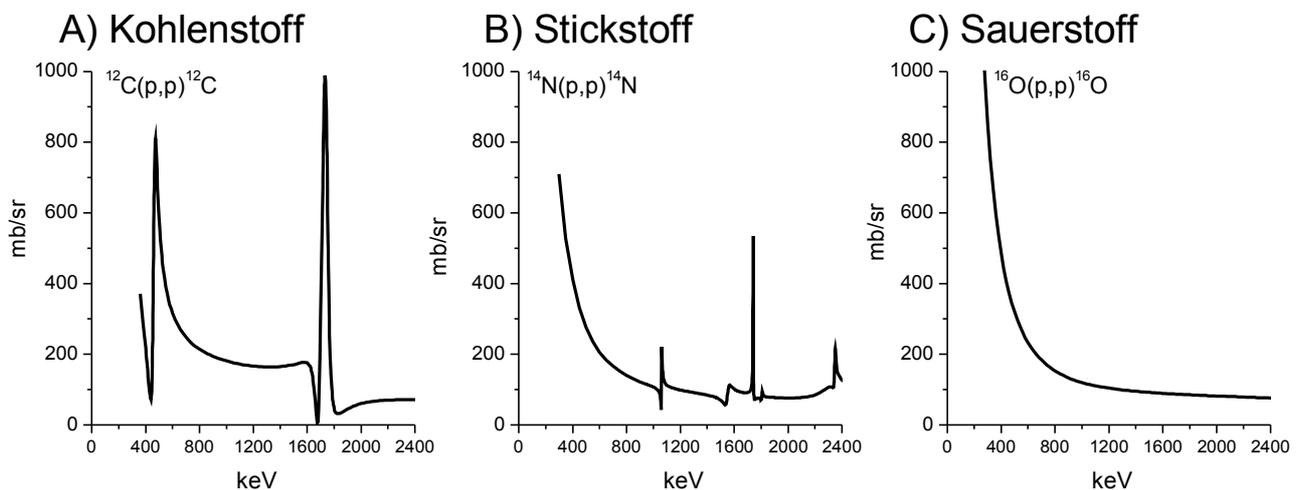


Abb 2.4.1-1 Nicht-Rutherford Wirkungsquerschnitte für die wesentlichen Matrixelemente biologischer Proben (Theta = 174° , Inzidenzteilchen: Protonen, 2250 keV). Quelle der Spektren: IBANDL (Ion Beam Analysis Nuclear Data Library).

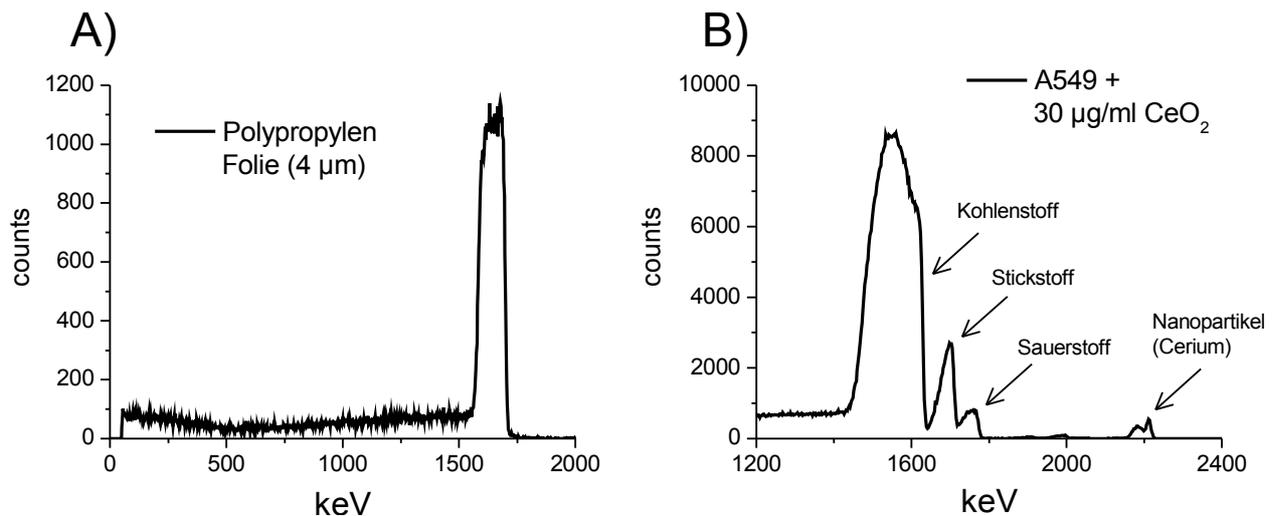


Abb 2.4.1-2 Typisches RBS-Spektrum für kohlenwasserstoffhaltige Proben. **A)** Polypropylenfolie (C₃H₆, 4 µm Dicke) als Modellsystem für biologische Proben **B)** Charakteristisches Einzelzellspektrum für Lungenzellen (A549) welche mit Nanopartikeln exponiert wurden (CeO₂, 48h, 10% FKS)

Im Rückstreupektrum korreliert die Anzahl der Inzidenzteilchen (N) mit dem differentiellen Wirkungsquerschnitt eines Elements ($\sigma(E)$), wodurch die Information über die Gesamtzahl der Teilchen welche während der Messung auf die Probe getroffen sind (Ladung Q), erlangt werden kann (Gleichung 2.4.1-2). Daneben tragen weitere fixe Größen wie z.B. der Raumwinkel des Detektors ($\Delta\Omega$), der Rückstreuwinkel (α) und das Bremsvermögen der Probe (S) zur Ausbeute der Ladung bei.

$$Q = \frac{N \Delta\Omega}{\cos \alpha} \frac{1}{S} \int_{E_1}^{E_0} \sigma(E) dE \quad (2.4.1-2)$$

Die RBS-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit hatten zum Ziel, die elementare Komposition (C, H, N, O) und Dicke der Probe sowie die Ladung zu ermitteln. Wasserstoffatome sind dabei ebenfalls ein wesentlicher Bestandteil der Matrix. Da sie allerdings kein Rückstreupektrum erzeugen, wurde der Wasserstoffgehalt indirekt als Differenz bestimmt.

Wie erstmalig in dieser Arbeit gezeigt, kann bei geeigneter zellulärer Nanopartikel-Konzentration die Rückstreupektrometrie ebenfalls verwendet werden, um die Internalisierung der Partikel zu studieren. Dabei erfahren Inzidenzteilchen die auf die aufgenommenen NP treffen, im Vergleich zu Partikel an der Zelloberfläche, einen zusätzlichen Energieverlust durch die darüberliegende Zellschicht.

Mengenmäßig gering vertretene Atome welche nicht zur Matrix gehören, können ebenfalls mittels

RBS detektiert werden. Dies kann insbesondere im Fall von Natrium, welches am Lysion mittels PIXE nicht nachweisbar ist und in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, hilfreich sein. Allerdings beschränkt sich der Nachweis auf eine qualitative Analyse und ist nur bei einer Auflösung des RBS-Detektors, unterhalb von 20 keV, sinnvoll.

2.4.1.1 Nicht-Rutherford-Effekt

Normalerweise werden die einfallenden Protonen an dem Atomkern der Target-Atome gestreut. Allerdings kommt es bei ausreichend hohen Energien der Inzidenzteilchen und insbesondere durch die niedrige Elektronenzahl bei leichten Atomen zu so geringen Abständen, dass die Coulomb-Barriere des Kerns überwunden wird und der Einfluss der Kernkräfte bei der Rückstreuung berücksichtigt werden muss. Die Coulombbarriere steigt mit der Atomnummer und erfahrungsgemäß ist bei Elementen größer als Kalzium kein nicht-Rutherford-Effekt mehr zu beobachten, wenn Protonen mit 2250 keV als Inzidenzteilchen verwendet werden. Nicht Rutherford-Wirkungsquerschnitte hängen stark von der Inzidenzenergie des Teilchens bzw. des

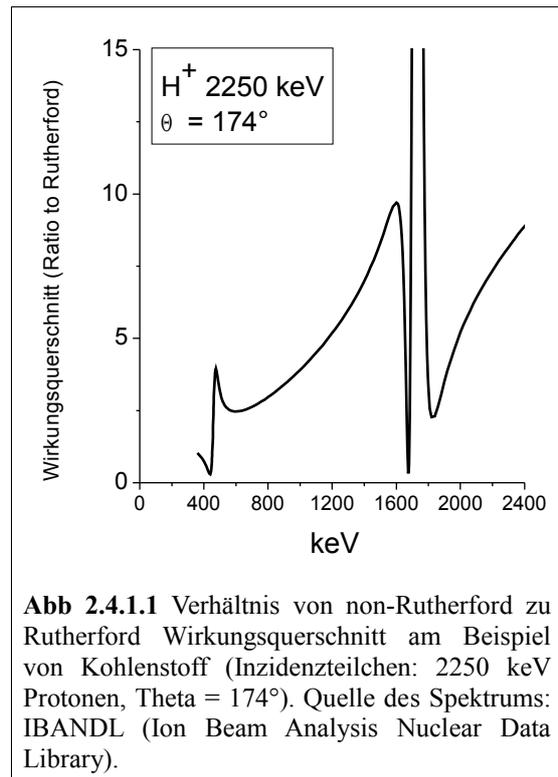


Abb 2.4.1.1 Verhältnis von non-Rutherford zu Rutherford Wirkungsquerschnitt am Beispiel von Kohlenstoff (Inzidenzteilchen: 2250 keV Protonen, Theta = 174°). Quelle des Spektrums: IBANDL (Ion Beam Analysis Nuclear Data Library).

Rückstreuwinkels ab und können gegenüber dem Rutherford-Wirkungsquerschnitt teilweise extrem erhöht sein. Insbesondere bei Kohlenstoff, welcher eine große Rolle bei der Ladungsbestimmung spielt, kann ein nicht-Rutherford-Effekt beobachtet werden. Es ist dabei ersichtlich, dass bei einer Rückstreuenergie unterhalb von 1608 keV der Wirkungsquerschnitt für Kohlenstoff durch den non-Rutherford-Effekt bis um den Faktor 10 erhöht ist (Abb. 2.4.1.1). Wirkungsquerschnitte für die non-Rutherford-Effekt relevante Elemente C, N und O müssen experimentell bestimmt werden. Um die Abweichung zum normalen Rutherford Wirkungsquerschnitt zu berücksichtigen, wurden die Daten für den non-Rutherford-Effekt (Quelle: SigmaCalc) von Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff in das Programm SIMNRA importiert.

2.4.1.2 RBS-Spektrenauswertung

Zur Bearbeitung der RBS-Spektren wurde das Programm SIMNRA 6.0 (Simulation Nuclear Reaction Analysis) verwendet. Um ein einzelnes Element durch die Energie des zurückgestreuten Protons genau identifizieren zu können ist eine Kalibration in keV pro Kanal notwendig. Zu diesem Zweck können verschiedene Standardproben beliebiger Dicke verwendet werden. Dabei ist wichtig, dass die gewählten Elemente einen großen keV-Bereich abdecken. Oft wurden die Elemente Kohlenstoff, Silizium, Gold oder Kupfer zur Kalibration verwendet, da ihre Rückstreueenergien im Spektrum relativ weit voneinander entfernt sind. Die Rückstreueenergien von reinen Elementen unter einem definierten Winkel und einer fixer Energie der Inzidenzteilchen sind tabelliert¹⁰⁵. Trägt man nun den Kanal (peak für Rückstreusignal eines bekannten Elements) gegen den tabellierten Wert auf, kann aus dem Anstieg der Wert für keV/Kanal abgelesen werden. Die Nullstelle beschreibt dabei den Beginn des RBS-Spektrums in keV.

Die Zellexperimente wurden mit Polypropylenfolie als Träger durchgeführt, deren Hauptbestandteil ebenfalls Kohlenstoff ist. Dadurch kommt es zur Überlappung des zellulären Kohlenstoffsignals und des Trägers. Daneben ist die Dicke der Probe über den gesamten Scanbereich inhomogen. Aus diesen Gründen wurde nur das RBS-Spektrum aus der ROI analysiert, indem es mit Hilfe der Software GeoPIXE für diesen Bereich extrahiert wurde.

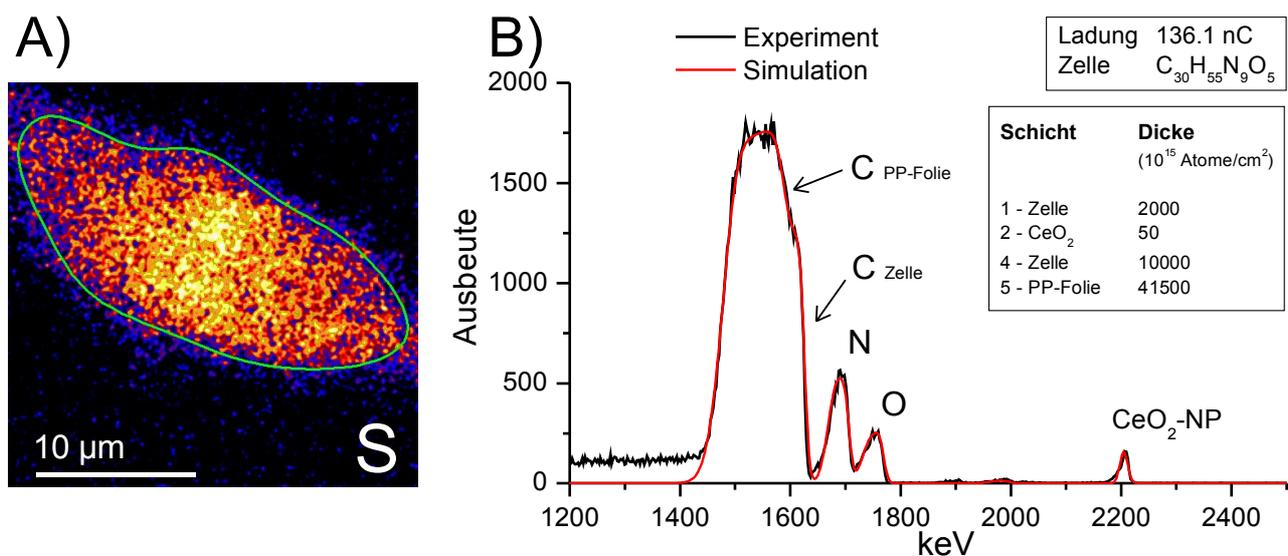


Abb. 2.4.1.2 Extraktion des RBS-Spektrums und Simulation des Experiments. **A)** Nach der Selektion einer ROI (grün) wurde das RBS-Spektrum für diesen Bereich mittels GeoPIXE extrahiert. **B)** Simulation (rot) des RBS-Experiments (schwarz) mittels SIMNRA. Die Schichtdicke ist in der Einheit 10^{15} Atome pro Quadratzentimeter angegeben.

Um die gewünschten Informationen aus dem RBS-Spektrum zu gewinnen, wurde eine Simulation des Experiments durchgeführt. Dabei wurde gemeinsam mit der Ladung die Dicke und Komposition der Zelle variiert, bis sie den experimentellen Daten entsprachen (Abb. 2.4.1.2 B). Die Simulation erfolgte, indem verschiedene Schichten in einem Layer-Modell der Probe erstellt wurden (Abb. 2.4.1.2 B). Polypropylenfolie, Zelle und Nanopartikel wurden dabei als wesentliche Schichten berücksichtigt. In der Regel kann die Zelloberfläche nicht als glatt über den gesamten Scanbereich betrachtet werden. Aus diesem Grund wurde die in SIMNRA integrierte Rauigkeitsfunktion angewendet. Durch eine größere Rauigkeit werden die Protonen stärker gestreut, was sich in einen flacheren Anstieg der linken Flanke im Bereich zwischen 1400 und 1500 keV des RBS-Spektrum widergespiegelt. Als Quelle für den Wirkungsquerschnitt wurde die Datenbank SigmaCalc von der International Atomic Energy Agency (IAEA) verwendet¹⁰⁶. Daneben ist IBANDL¹⁰⁷ (Ion Beam Analysis Nuclear Data Library) ebenfalls eine Quelle hoher Reputation für Daten experimentell ermittelter Wirkungsquerschnitte. Da der Wirkungsquerschnitt von Kohlenstoff einen sehr starken Einfluss auf die Ladungsbestimmung zeigt, wurden die experimentell ermittelten Wirkungsquerschnitte für Kohlenstoff von drei verschiedenen Autoren verglichen. Unter Berücksichtigung dieser Quellen, lag die ermittelte Abweichung der Ladung in einem Kontrollexperiment maximal im Bereich von +/- 5 %.

2.4.2 Proton-induzierte Röntgenemission (PIXE)

PIXE (Proton-Induced-X-ray-Emission) wurde erstmals Anfang der 1970er Jahre in der schwedischen Universität Lund von Sven Johansson etabliert¹⁰⁸. Im wesentlichen basiert die Methode auf der Detektion von Röntgenstrahlung nach dem Beschuss einer Probe mit Ionen. In der Regel werden dabei Protonen einer Energie von 2 – 3 MeV verwendet. Diese zeigen im Vergleich zu Elektronen den Vorteil, dass sie eine größere Probentiefe analysieren können und weniger unelastische Stöße auftreten. Im Vergleich zu Elektronen zeigen Protonen ein deutlich besseres Signal/Rausch-Verhältnis¹⁰⁹. Dadurch wird die Analyse der biologisch relevanten

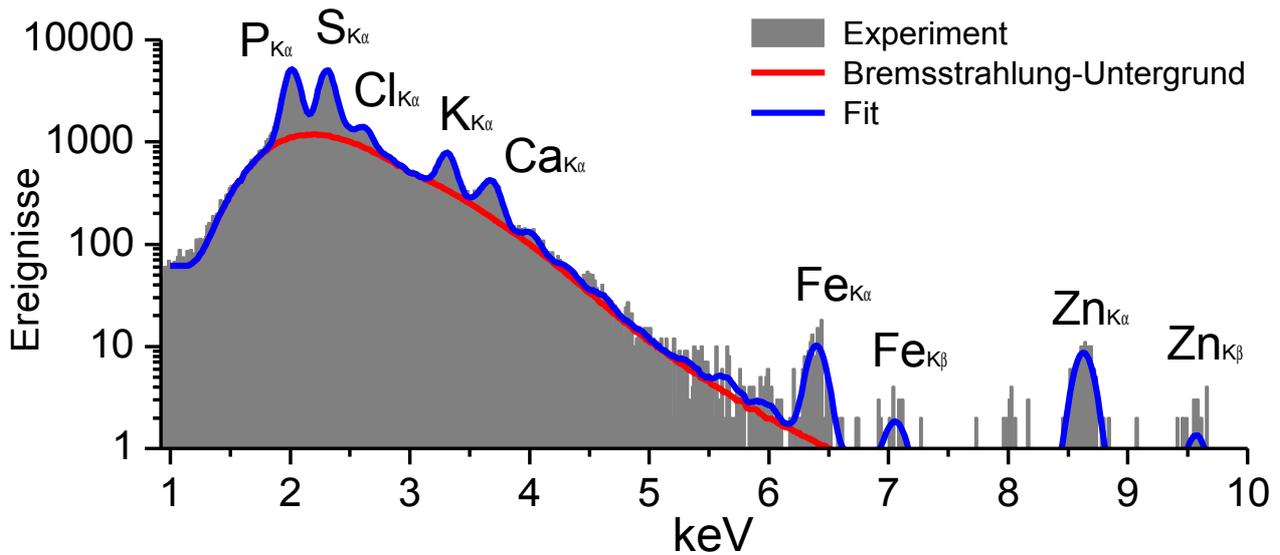


Abb. 2.4.2-1 Typisches PIXE-Spektrum einer biologischen Probe. Gezeigt ist ein Einzelzellspektrum eines Kontroll-experiments einer A549 Zelle ohne Nanopartikel Behandlung.

Spurenelementen Eisen und Zink überhaupt erst möglich und prädestiniert PIXE für die biomedizinische Forschung. Durch den nicht-destruktiven Charakter der Methode konnte sie in verschiedensten Disziplinen, wie z.B. der Kunst, Geologie oder Archäologie), erfolgreich eingesetzt werden^{110 111}.

Ein charakteristisches PIXE-Spektrum zeigt die typischen Röntgenlinien der in der Probe vorhandenen Elemente und einen Bremsstrahlungs-Untergrund (Abb. 2.4.2-1). Dieser entsteht bei der Umwandlung von kinetischer Energie in elektromagnetische Strahlung, wenn die Ionen durch die Wechselwirkung mit der Probe abgebremst werden. Trifft ein Inzidentteilchen auf ein Atom der Probe kommt es zu Stößen zwischen den Inzidentteilchen und den Elektronen. Dabei wird eine innere Schale des Atoms mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ionisiert. Die bei diesem Vorgang entstandene Lücke, wird durch Elektronen höher

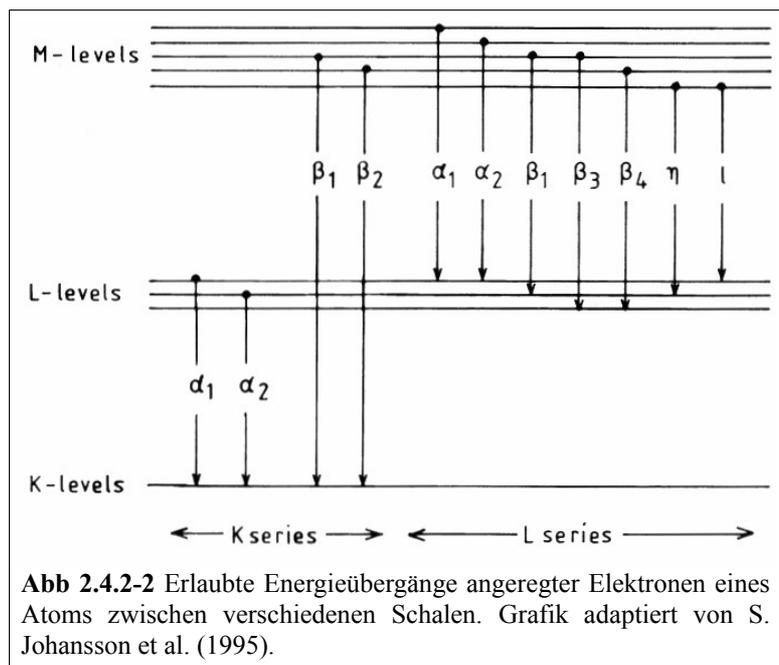


Abb 2.4.2-2 Erlaubte Energieübergänge angeregter Elektronen eines Atoms zwischen verschiedenen Schalen. Grafik adaptiert von S. Johansson et al. (1995).

Energieniveaus der L- oder M-Schale aufgefüllt. Beim Übergang von Elektronen in die energetisch

niedrigere Schale wird eine für jedes Atom charakteristische Röntgenstrahlung, oft im Bereich von 1 – 40 keV, emittiert. Die emittierte Energie entspricht dabei dem Energieunterschied der am Übergang beteiligten Schalen. Der Übergang erfolgt dabei nach bestimmten Auswahlregeln, welche quantenmechanische Parameter wie den Spin und Drehimpuls der Elektronen berücksichtigen (Abb. 2.4.2-2). Zum Nachweis der zellulären Elemente P, S, Cl, K, Ca, Fe und Zn sowie der meisten NP relevanten Elemente (Al & Ti) wurden die K_α und K_β Linie verwendet. Eine Ausnahme stellte CeO_2 dar, da dieses Element im detektorsensitiven Bereich, zwischen 1 und 20 keV, ausschließlich über die L-Linie identifiziert werden konnte.

Die Intensität des Signals der spezifischen Röntgenstrahlung eines Elements ist proportional zu dessen Konzentration. Der Nachweis und insbesondere die Quantifizierung mittels PIXE am Lippion ist auf Elemente welche schwerer als Natrium sind ($K_\alpha = 1.04$ keV) begrenzt. Der Grund dafür ist die geringe Detektoreffizienz unterhalb von 2 keV bei Germanium-Halbleiterdetektoren und der schwächende Einfluss verschiedener Absorber, z.B. Beryllium oder Polyethylenfolie, welche die Photonenenergien leichter Elemente stark absorbieren können. Daneben kann bei leichten Elementen der Auger-Effekt die charakteristische Röntgenstrahlung eines Elements stark abschwächen. Beim Übergang eines Elektrons von einem hohen in ein niedriges Energieniveau muss die freiwerdende Energie nicht zwangsläufig als Röntgenquant emittiert werden. Sie kann auch auf ein Elektron übertragen werden, welches dadurch strahlungsfrei das Atom verlässt. Somit kann der Auger-Effekt alternativ zur Röntgenemission stattfinden.

Für die biologisch relevante Elemente P, S, Cl, K, Ca, Fe und Zn, sowie für die NP-relevanten Elemente Al, Ti und Ce, liegt die Nachweisempfindlichkeit im einstelligen ppm-Bereich. Die typische Messzeit pro Probe lag dabei zwischen 30 Minuten und 2 Stunden.

Die peak-Fläche eines in Abb. 2.4.2-1 dargestellten Elements ist proportional zu dessen Konzentration. Die exakte Berechnung der Konzentration erfolgte dabei unter Verwendung der im Folgenden dargestellten Gleichung (2.4.2)¹¹². Der Wert für die Anzahl der Inzidentteilchen (N_I) ist dabei durch die akkumulierte Ladung repräsentiert, welche zuvor aus dem RBS-Spektrum gewonnen wurde. Außerdem wurden die Werte für die Komposition und Dicke der Probe aus dem RBS-Spektrum ermittelt und zur Berechnung der zellulären Konzentration in die GeoPIXE Software eingetragen.

$$Y_x = \frac{N_A \omega_Z b_X \epsilon N_I c_z}{A_Z} \int_{E_0}^{E_i} \frac{\sigma_Z(E) T_Z(E)}{S(E)} dE \quad (2.4.2)$$

Y_x	Ausbeute einer charakteristischen Röntgenlinie
N_A	Avogadro Konstante
ω_Z	Fluoreszenzausbeute der ionisierten Schale
b_x	Intensitätsanteil der Line X an der Linienserie
ϵ	Detektoreffizienz
N_I	Anzahl der Inzidenzteilchen
c_Z	Massenkonzentration des Elements
A_Z	Massenzahl des Elements
E_0	Inzidenzenergie der Protonen
E_t	Energie der Protonen nach vollständiger Passage der Probe
σ_Z	Ionisationsquerschnitt
$S(E)$	Bremsvermögen
$T_Z(E)$	Transmissionsterm

Unter Berücksichtigung des Ionisationsquerschnitts σ_Z kommt es mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zur Ionisation der Elektronenschale. Dabei beschreibt die Fluoreszenzausbeute ω_Z die Wahrscheinlichkeit mit der es zur Emission von Photonen kommt. Überschreitet die Dicke der Probe ein gewisses Maß, ist der Röntgenabsorption innerhalb der Probe Rechnung zu tragen. Dies geschieht durch den Transmissionsterm $T_Z(E)$. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben handelte es sich um wasserfreies biologisches Material mit einer Dichte um 1 g/cm^3 und einer Dicke deutlich unter $100 \text{ }\mu\text{m}$. Aus diesen Gründen sind die untersuchten Proben in Zusammenhang mit der PIXE-Analyse als sehr dünne Proben mit geringer Absorptionsfähigkeit zu klassifizieren. Dies wurde indirekt durch entsprechende STIM-Messungen bestätigt, bei denen der Energieverlust von Protonen durch die Probe minimal war.

2.4.2.1 Spektrenauswertung mittels GeoPIXE II

Die Auswertung der PIXE-Spektren erfolgte unter der Verwendung des Programms GeoPIXE II¹¹³. Ursprünglich von Chris Ryan an der Universität Melbourne für die Elementanalyse geologischer Proben konzipiert, hat sich das Programm ebenfalls für die Auswertung biologischer Proben als geeignet erwiesen. Besonders charakteristisch für das Programm ist die sogenannte „Dynamic Analysis“ (DA) Methode¹¹⁴. Diese erlaubt die konzentrationsabhängige, orts aufgelöste und grafische Darstellung der analysierten Elemente aus den einzelnen peaks des PIXE-Spektrums.

Daneben erlaubt u.a. die DA-Methode die Auswertung der experimentellen Daten während des Experiments. Eine weitere Stärke ist die gleichzeitige Kombination von Parametern wie Bremsstrahlungs-Untergrund, pile-up, peak-tailing mit sogenannten nicht-linearen-Parametern, wie die Absorber-Stärke und die Detektor-Effizienz.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass durch die DA-Methode die Konzentrationsbestimmung auf Einzelzellebene überhaupt erst möglich ist. Dies ist durch die in der DA-Methode angewandte Matrix zu begründen, welche aus jedem Pixel im Scanfeld ein PIXE-, RBS- oder STIM-Spektrum ausliest. Mittels GeoPIXE wurde das Spektrum, für die Region im Scanfeld in der sich die Zelle befindet, extrahiert und ausgewertet. Eine Analyse des gesamten Scanbereichs würde naturgemäß zu einem wesentlichen Fehler bezüglich der Probendicke und der Ladung führen, da die Zelle meist nicht im gesamten Scanbereich präsent war und das Kohlenstoffsignal der Polypropylenfolie ebenfalls zur Ladung und Dicke der Probe beiträgt.

Das Prinzip der DA-Methode ist nicht auf das PIXE-Signal beschränkt. So wurde mittels der Cut-Funktion in GeoPIXE analog die orts aufgelöste Elementverteilung für Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff dargestellt. Hierbei wurde eine Korrelation mit zellulären Strukturelementen Schwefel und Phosphor beobachtet. Daneben konnte mittels CUT-Funktion der orts aufgelöste Energieverlust eines Teilchens grafisch dargestellt. Dies kann hilfreich sein, um die zelluläre Position der Nanopartikel zu erkennen, da diese eine deutliche höhere Dichte als die Zelle aufweisen können und STIM eine höhere Auflösung als PIXE ermöglicht.

2.4.3 Scanning Transmission Spectroscopy (STIM)

Im Gegensatz zu PIXE und RBS ist die Transmissionsionenmikroskopie eine Niedrigstrom-Technik. Sie nutzt den Energieverlust der Inzidenzteilchen nach der vollständigen Passage durch die Probe um diese zu charakterisieren¹¹⁵. Dadurch stellt die Dicke der Probe ein gewisses Limit für diese Methode dar. Es wurde allerdings beobachtet, dass im Experiment von Kulturzellen auf Polypropylenfolie immer eine STIM-Analyse möglich war, da die maximale Dicke beider Schichten bei ca. 20 μm liegt.

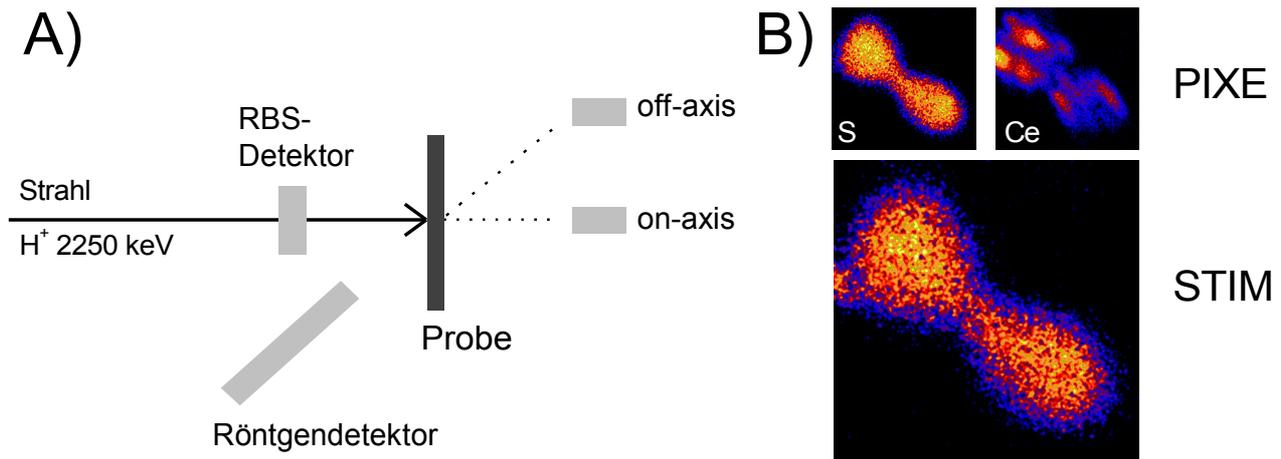


Abb 2.4.3 Übersicht des STIM-Setups am Lipsion, welches zur Untersuchung biologischer Proben verwendet wurde. **A)** Übersicht der Detektor-Konfiguration der Nanosonde. Beim On-axis-setup befindet sich der STIM-Detektor direkt hinter der Probe in Strahlachse. Im off-axis-setup betrug der Winkel zur Strahlachse ungefähr 45° . Darstellung nicht maßstabsgetreu **B)** Ortsaufgelöste Darstellung des Energieverlustes der Inzidenzteilechen (STIM) durch A549-Zellen nach NP-Behandlung (CeO_2 , 48h)

Generell unterscheidet man, je nach der Detektorposition, zwischen on-axis-STIM und off-axis-STIM (Abb. 2.4.3). Bei on-axis-STIM befindet sich der Detektor genau in Strahlachse und Ströme unter 1 fA sind geeignet um ein ortsaufgelöstes Profil der Massenflächendichte einer Probe zu erstellen. Die entsprechende Einstellung des Stroms wurde durch den Einsatz sehr kleiner Blendengrößen bei der Objekt- und Apertur-Blende realisiert. Der verwendete Winkel für off-axis-STIM betrug in dieser Arbeit in der Regel 45° . Off-axis-STIM kann parallel zur PIXE- und RBS-Analyse durchgeführt werden. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein transmittierter Partikel in den Detektor trifft stark von dessen Winkel zur Strahlachse und der Probenstruktur abhängig. Das off-axis-setup wurde in dieser Arbeit ergänzend verwendet um die Position der Zelle im Scanfeld rasch einzustellen und um ggf. die Kolokalisation der NP mit der Zelle in einer etwas höheren Auflösung als PIXE darzustellen. Ähnlich wie beim Prinzip der Immunogold-Markierung⁶⁷, in der Transmissionselektronenmikroskopie, können MetalloxidNP durch ihre vergleichbar hohe Dichte ein deutlich kontrastreicheres Signal zeigen.

Bezüglich der Analyse biologischer Proben hat sich STIM als hilfreich erwiesen. Ortega et al. konnte zeigen, dass sich die Methode eignet, um die subzelluläre Verteilung der Massenflächendichte (g/cm^2) hochauflösend darzustellen¹¹⁶. Allerdings wurden dabei Heliumionen als Inzidenzteilechen verwendet, welche bedingt durch ihre Masse einen deutlich höheren Kontrast als Protonen liefern. STIM kann somit alternativ zu RBS eingesetzt werden um die Dicke (g/cm^2) des Zell-Materials zu bestimmen. Allerdings ist in diesem Fall eine vorherige Kalibration mit

einem Material ähnlicher Dichte und Komposition Voraussetzung. Im Falle von biologischen Proben hat sich dabei Mylar-Folie als geeignet erwiesen.

2.4.3.1 STIM-Kalibration

STIM wurde eingesetzt, um die Dicke der Polyethylen-Folie zu bestimmen, welche als Absorber für niedrige Photonenenergien wirkt und vor dem Röntgendetektor installiert ist. Dort schützt sie den Detektor vor zurückgestreuten Protonen. Um aus den aufgenommenen STIM-Daten einen Wert für die geometrische Dicke zu extrahieren, ist eine vorherige Energie/Kanal-Kalibration des Systems erforderlich. Dafür wurden verschiedene Dicken von bekannten Standardmaterial untersucht. Dabei zeigte sich Mylarfolie mit der Komposition $C_{10}H_8O_4$ und einer Dichte von $1,38 \text{ g/cm}^3$ als besonders geeignet, da dieses Material laut Herstellerangaben die höchste Homogenität (Abweichung von $\pm 5\%$ bei einer Dicke von $6 \mu\text{m}$) bezüglich der Dicke, im Vergleich zu Polypropylenfolie, aufwies. Erwartungsgemäß zeigten beide Materialien eine lineare Abhängigkeit des Energieverlustes (Abb. 2.4.3.1). Das Bremsvermögen einer Probe hängt von der Dicke und elementaren Zusammensetzung ab. Das Bremsvermögen für isolierte Elemente wurde in den Arbeiten von Ziegler, Biersack und Littmark dargestellt und in der Software SRIM (Stopping and Range of Ions in Matter) zur Anwendung gebracht¹¹⁷. Mit Hilfe dieser Software kann der Energieverlust eines komplexen Materials relativ genau approximiert werden.

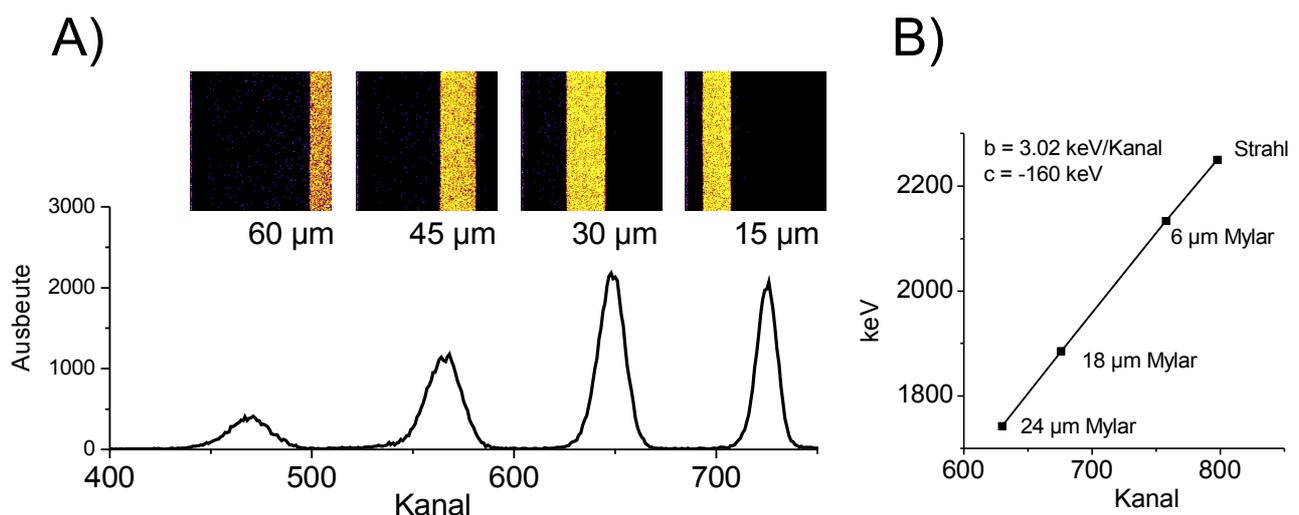


Abb 2.4.3.1 Typische STIM-Analyse (on-axis) von Materialien unterschiedlicher Dicke **A)** Linearer Energieverlust durch Polyethylenfolie mit je $15 \mu\text{m}$ Schichtdicke **B)** Energie/Kanal-Kalibrierung des STIM-setups unter Verwendung verschiedener Lagen Polyethylenfolie.

Der Energieverlust für verschiedene Dicken des Absorbers Polyethylenfolie wurden mit Hilfe der Software SRIM ermittelt und anschließend mit dem experimentellen Wert verglichen. Im letzten Schritt wurde der Wert für die Dicke der Polyethylenfolie aus dem Punkt abgelesen, wo der SRIM-Wert dem experimentellen Wert entsprach. Dadurch konnte eine Dicke von $54,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ für vier Lagen Polyethylen-Folie ermittelt werden.

2.4.4 Aufbau und Kalibration des Röntgendetektors

Generell sind bei der Röntgenfluoreszenzanalyse Detektorkristalle aus Germanium oder Silizium üblich. Detektoren mit Germaniumkristall bieten den Vorteil bei gleicher Energieauflösung (150 eV FWHM bei 5,9 keV) eine größere aktive Fläche des Kristalls zu ermöglichen. Daneben sind Germaniumdetektoren durch ein sehr gutes Signal-zu-Untergrund-Verhältnis gekennzeichnet. Die aktive Fläche des am Lipsion eingesetzten Germaniumkristalls beträgt 95 mm^2 (Abb. 2.3.6.1 A). Um die Elektronen abzuleiten, ist auf der Oberfläche des Detektorkristalls ein Frontkontakt aus Gold unbekannter Dicke aufgebracht.

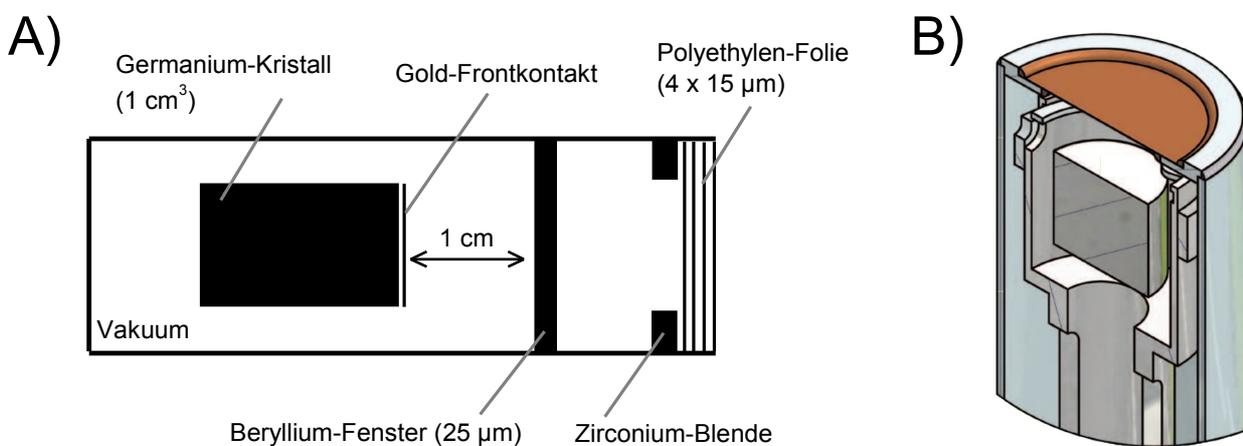


Abb. 2.4.4.1 Prinzipieller Aufbau des Röntgendetektors **A)** Schematische Konfiguration des Lipsion-Setups **B)** Darstellung ohne Frontkontakt, Zirkonium-Blende und Polyethylen-Folie des verwendeten Germaniumdetektors der Firma CANBERRA¹¹⁸. An der Spitze befindet sich braun dargestellt das Beryllium Fenster., welches eine Dicke von $25 \mu\text{m}$ aufweist.

Zum Abschluss des Vakuums sowie zum Schutz des Detektors vor zurückgestoßenen Protonen, sind ein Berylliumfenster ($25 \mu\text{m}$ Dicke) und 4 Lagen Polyethylen-Folie ($60 \mu\text{m}$ Dicke) am Eingang des Detektors installiert. Eine Zirkoniumblende verkleinert die aktive Fläche des Detektors und verhindert eine potentielle Röntgenfluoreszenz durch die Eisenwand des Detektorrohrs.

Um eine Aussage über die absolute zelluläre Konzentration eines Elements treffen zu können, war

eine Kalibration des Röntgendetektors erforderlich. Dazu wurde eine multi-Mineral-Standardprobe der Firma Astimex verwendet, welche für jedes Element in der jeweiligen Verbindung eine zertifizierte Konzentration angibt (Abb. 2.4.4.1 A). In dem die Dicke der verschiedener Absorber Polyethylenfolie, Beryllium und Gold charakterisiert wurde, konnte unter Verwendung bekannter Parameter, wie Z.B. Form/aktive Fläche des Germanium-Kristalls, Auflösung des Röntgendetektor, mit Hilfe der Software GeoPIXE der Transmissions- und Effizienzterm des Detektors beschrieben werden (Abb. 2.4.4.2 B & C). Der Transmissionsterm beschreibt die Absorption von Photonen durch eine Polyethylenfolie, welche vor dem Detektor installiert ist, um diesen vor zurückgestreuten Protonen zu schützen. Im Effizienzterm spiegelt sich im vorderen einstelligen Energiebereich das Absorptionsvermögen des Beryllium-Fensters und insbesondere bei 2,3 keV die Absorptionskante des Gold-Fontkontaktes wieder.

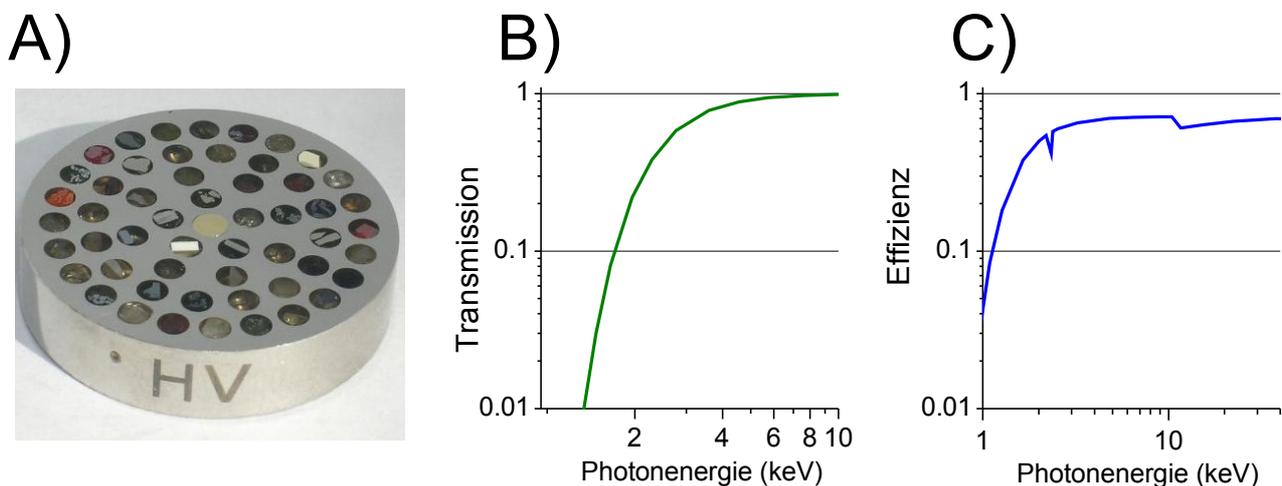


Abb. 2.4.4.2 Bestimmung wichtiger Detektorparameter zur Kalibration des Röntgendetektors mittels Multi-Mineral-Standard **A)** Standardprobe der Firma Astimex, welche Mineralien enthält die auf synthetischer Basis oder aus seltenen Erden gewonnen wurden. **B)** Transmissions-Term des Röntgendetektors, welcher die Schwächung der Photonenenergie durch den Absorber Polyethylenfolie beschreibt. **C)** Effizienzkurve des Röntgendetektors welche Parameter wie Auflösung oder aktive Fläche des Kristalls sowie direkte Absorber wie das Beryllium-Fenster oder den Gold-Fontkontakt berücksichtigt.

Da im Gegensatz zum RBS-Detektor der Abstand zwischen Röntgendetektor und Probe variiert werden kann, erfolgte die Kalibration des Röntgendetektors bei verschiedenen Probenabständen. Dabei wurden Elemente verwendet, deren charakteristische Röntgenstrahlung größer als ungefähr 12 keV ist, da diese nicht von den Absorbern beeinträchtigt wurde.

Der Abstand zwischen Probe und Röntgendetektor wird über den Raumwinkel im Effizienzterm des Röntgendetektors berücksichtigt und ist deshalb ein wichtiger Parameter zur Berechnung der Konzentration. Der Probenabstand wurde ermittelt, indem dieser im Effizienzterm so lange variiert

wurde bis die gemessene Konzentration eines Standardelements mit der zertifizierte Konzentration übereinstimmte. Bei biologischen Proben wurde der geringstmögliche Abstand zwischen Probe und Röntgendetektor bei 30,3 mm beobachtet.

2.5 Biophysikalische Methoden

2.5.1 Massenspektrometrische (ICP-MS) Elementquantifizierung von Zinkionen

Ergänzend zu Ionenstrahlmikroskopie wurde die Methode der Massenspektrometrie angewendet, da erstere es nicht erlaubt die Konzentrationsbestimmung von Zinkionen in wässriger Lösung vorzunehmen. Ein großer Vorteil der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasma (Abb. 2.5.1) ist, die meisten Elemente des Periodensystems über einen sehr großen Bereich, von Gramm bis Nanogramm, quantifizieren zu können.

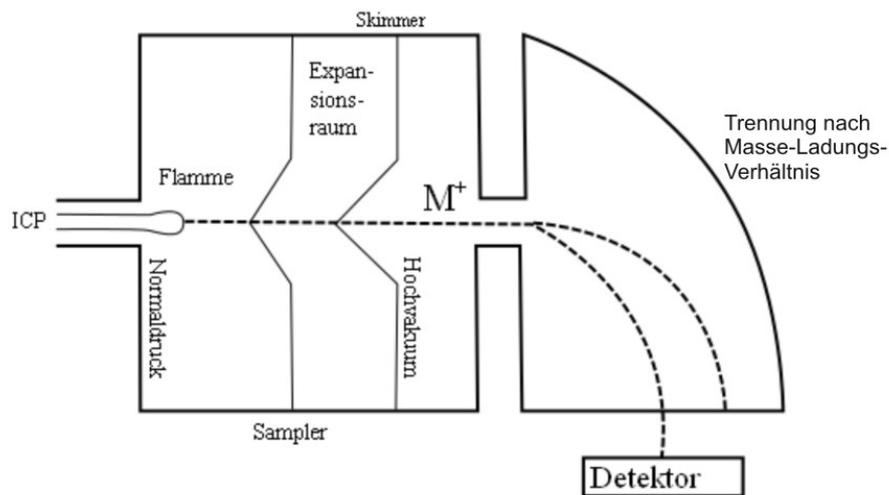


Abb. 2.5.1 Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers mit induktiv-gekoppeltem-Plasma (ICP-MS)¹¹⁹.

In der vorliegenden Arbeit kam, in Kooperation mit Prof. C. Gao, die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma zum Einsatz (ICP-MS, X Series - Thermo Scientific), welche den Analyt bei Temperaturen zwischen 5000 – 10000 °C ionisiert, wodurch ein Plasma entsteht. Anschließend werden die Ionen durch ein statisches elektrisches Feld mobilisiert und beispw. durch einen elektrischen Quadrupol nach dem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/q) aufgetrennt. Das Wechselfeld der Stabelektroden können nur Ionen mit einem bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnis

passieren, während andere mit den Stabelektroden kollidieren. Anschließend werden die Ionen bezüglich ihrer Geschwindigkeit bzw. Richtung vom Detektor (bspw. Sekundärelektronenvervielfacher) registriert und mit Hilfe einer Kalibrationskurve kann die Konzentration des Analyten in der Probe ermittelt werden.

Zur Durchführung wurden ZnO-NP entsprechend Kap. 2.1.1 präpariert und in einer Konzentration von 30 µg/ml in Puffer oder Kulturmedium verdünnt. Zur vollständigen Einstellung des Gleichgewichts zwischen Zinkionen und ZnO-NP wurde die Lösung jeweils 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Trennung zwischen Zinkionen und ZnO-NP durch Zentrifugation (30 Minuten) gemäß Gleichung 2.5.1. Vom Überstand wurden jeweils 100 µl für die Probenpräparation zur massenspektrometrischen Analyse verwendet.

$$t = \frac{9 \eta h}{2 r_{\text{ZnO}}^2 \left(2 \pi \frac{\text{rpm}}{60}\right)^2 r_{\text{Zentrifuge}} (\rho_{\text{ZnO}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}})} \quad (2.5.1)$$

t	Zeit in Stunden
r_{ZnO}	Radius ZnO Nanopartikel
$r_{\text{Zentrifuge}}$	Radius Zentrifuge
rpm	Umdrehungen pro Minute
h	Höhe des Gefäßes
η	Viskosität
ρ_{ZnO}	Dichte ZnO Nanopartikel
$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$	Dichte Wasser

Um die Probe vollständig aufzulösen und um Inhomogenitäten zu vermeiden, wurde vor der Analyse die Probe mit Säure (Mischung aus HCl und HNO₃ im Verhältnis von 3:1) behandelt. Es wurden jeweils 100 µl Probe mit 100 µl Säure für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 900 µl Wasser vermischt und 10 Minuten bei 600 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 100 µl Probe entnommen und mittels ICP-MS analysiert. Zur Quantifizierung der Zinkionen wurde eine Kalibrationskurve mittels ZnCl₂ erstellt, welche parallel analysiert wurde.

2.5.2 Bestimmung des zellulären Volumens

Um die Konzentration aufgenommener NP pro einzelner Zelle zu bestimmen, ist es notwendig das zelluläre Volumen zu ermitteln. Dies ist theoretisch mittels STIM möglich, da diese Methode die Dicke einer adhärenen Zelle mit einer Ungenauigkeit im zweistelligen Nanometerbereich bestimmen kann. Durch RBS-Untersuchungen ist bekannt, dass adhärenente Zellen der A549-Zelllinie eine ungefähre Dicke im Bereich zwischen 5 – 15 μm zeigen (Annahme Dichte 1 g/cm^3). Allerdings kann die Dicke dort durch die Rauigkeit einer denaturierten Zelle stark schwanken. Daneben stellt eine adhärenente Zelle eine komplexe geometrische Funktion dar, welche bestenfalls als halber Ellipsoid mit lokal starken Dickeschwankungen beschrieben werden kann. Aus diesen Gründen wurde ein Mittelwert des zellulären Volumens, von in Suspension befindlichen A459-Zellen, welche als Kugel betrachtet werden können, gebildet. Da A549-Zellen zur Klasse der Epithelzellen gehören zeigen sie die starke Tendenz auf der Oberfläche zu adhärieren. Somit bietet es sich an das Volumen nach vorheriger Trypsinierung der Zellen zu bestimmen. Dies kann jedoch zu einen großen Fehler führen, da sich durch die Trypsinbehandlung das zelluläre Volumen ändern kann¹²⁰. Aus diesem Grund wurden die Zellen nach der Trypsinierung für 24 Stunden auf dem hydrophoben Material Polypropylenfolie kultiviert, was deren Adhärenz stark verminderte. Der zelluläre Durchmesser wurde mittels eines konfokalen Mikroskops unter Verwendung eines UV-Lasers von 488 nm bestimmt (Abb. 2.5.2). Zur Berechnung des intrazellulären Volumens wurde die Gleichung zur Berechnung des Volumens einer Kugel verwendet ($V = 1/6 \pi d^3$).

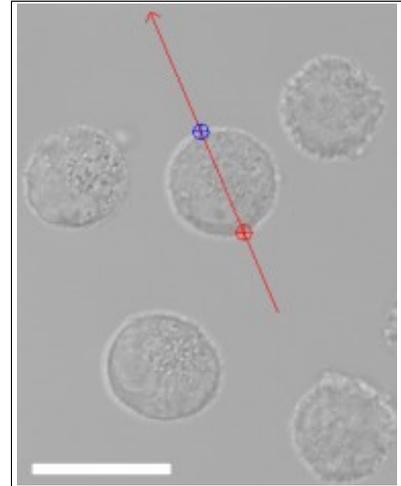


Abb. 2.5.2 Bestimmung des zellulären Durchmessers von in Suspension gewachsenen A549 Zellen mittels konfokaler Mikroskopie. Weißer Balken entspricht 20 μm .

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Kultivierung von Lungenzellen (A549)

In dieser Arbeit wurden für die Zellkulturexperimente humane Lungenepithelzellen (A549)¹²¹ verwendet, welche ein *in-vitro*-Modell für Typ-II-Pneumozyten darstellen. Die Kultivierung erfolgte mit RPMI 1640 (supplementiert mit Streptomycin, Penicillin und ggf. 10 % FKS) in Flaschen (75 cm^2), Mikrotiterplatten oder den für die Ionenstrahlanalyse konzipierten

Probenhaltern, deren Boden mit Polypropylenfolie beschichtet war, statt. Das Inkubieren der Zellen fand unter 37°C bei 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank statt.

2.6.2 Einfrieren und Auftauen von kultivierten Zellen

Um Zellen einzufrieren, wurden Zellsedimente in 800 µl sterilem FKS resuspendiert, 200 µl steriles DMSO (Endkonzentration 20 %) hinzugegeben und bei – 80 °C in einem Kryoröhrchen eingefroren. Zum Auftauen wurde dieses Kryoröhrchen im Wasserbad (37°) gelagert, bis der flüssige Zustand erreicht war. Um das Gefriermedium zu entfernen, wurde die Lösung zentrifugiert (300 g, 5 min) und anschließend in 1 ml Kulturmedium (RPMI 1640, 10% FKS) zur weiteren Verwendung resuspendiert.

2.6.3 Passagieren von A549 Zellen

Bevor die Zellen passagiert wurden musste unter dem Mikroskop überprüft werden, ob sie sich im konfluenten Stadium befinden. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und durch 5 ml sterile PBS-Lösung ersetzt. Nach einer Waschphase von einer Minute wurde PBS abgesaugt und 5 ml Trypsin-Lösung (auf 37 °C vorgewärmt) hinzupipettiert. Während der Inkubationszeit (ca. 5 Minuten) wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst haben (Beim Nichtlösen wurde leicht seitlich an den Flaschenboden geklopft).

Zur Inaktivierung von Trypsin wurde 5 ml RPMI 1640 Medium in die Flasche pipettiert und der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Dabei ist Trypsin durch den Überschuss an Protein nicht mehr in der Lage zelluläres Protein signifikant zu verdauen. Um restliche Zellen aus der Zellkulturflasche in das Zentrifugenröhrchen zu überführen, wurde die Flasche mit 5 ml PBS gespült und diese Lösung ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 300 g für 5 Minuten. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml RPMI 1640 (supplementiert mit Streptomycin, Penicillin, 10 % FKS) resuspendiert. Durch Zugabe von 9 ml des gleichen Mediums erfolgte eine Verringerung der Zellkonzentration. Von dieser Lösung wurden 10 ml in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm²) überführt.

2.6.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurden diese vor der Zählung mit Trypanblau (0,8 %) versetzt (50 µl Zellsuspension + 50 Trypanblau-Lösung, Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur). Nur tote Zellen können diesen blauen Farbstoff in das Zytosol aufnehmen, da ihre Zellmembran zerstört ist.

Zur Zählung wurde das Pelett einer konfluenten mittleren Zellkulturflasche (75 cm²) in 5 ml PBS resuspendiert und 1:10 mit PBS verdünnt. Auf jede Seite der Zählkammer wurden 20 µl dieser Konzentration aufgetragen und vier Großquadrate ausgezählt. Unter Berücksichtigung des Kammerfaktors (10⁴) wurde die Zellzahl mit Hilfe von Gleichung 2.6.4 berechnet.

$$\text{Zellzahl Pellet} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times 5 \times 10 \times 10^4 \quad (2.6.4)$$

Nach erneuter Zentrifugation (300 g, 5 Minuten) wurde das Pellet in einem entsprechenden Volumen resuspendiert, so dass die Konzentration der Zellsuspension 1 Million Zellen/ml betrug.

2.6.5 Toxizitätsnachweis

2.6.5.1 MTT-Test

Beim MTT-Test handelt es sich um einen etablierten und weit verbreiteten Schnelltest zur semiquantitativen Bestimmung von Überleben bzw. Zelltod von Kulturzellen¹²². Das Prinzip basiert auf der Ringspaltung des wasserlöslichen gelben Tetrazoliumsalses MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch aktive mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen zum wasserunlöslichen dunkelblauen Formazan (Abb. 2.6.5.1).

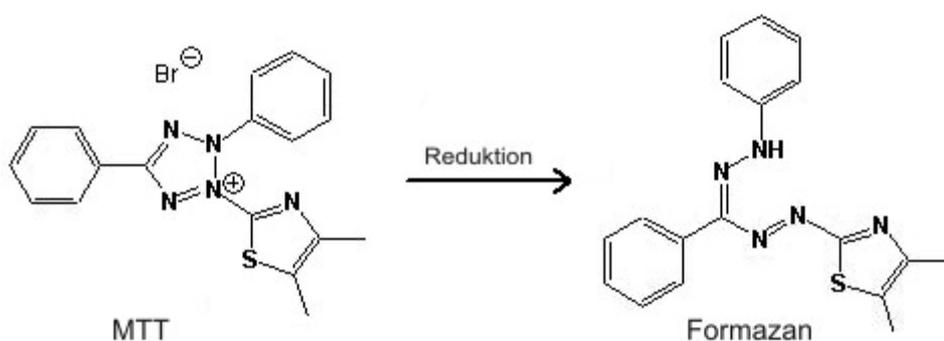


Abb 2.6.5.1 Zytotoxizitätstest durch Reduktion von MTT zu Formazan

Im Gegensatz zur früher vorherrschenden Meinung wird MTT nicht ausschließlich von der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase reduziert sondern größtenteils von NADH- und NADPH abhängigen Oxidoreduktasen, welche extramitochondrial lokalisiert sind^{123 124}. Der MTT-Test ist somit kein direktes Maß für die Zellatmung sondern für die gesamte zelluläre proliferative, zytostatische oder zytotoxische Aktivität.

Zur Durchführung wurden A549-Zellen (ca. 1000 Zellen/Kavität in 80 µl), wie bereits beschrieben, in 96er-Mikrotiterplatten eingesät und für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Im Anschluss daran wurde das Kulturmedium gegen Medium (80 µl/Kavität) getauscht, welches das entsprechende Agens (in der Regel NP) in der gewünschten Verdünnung enthielt. Nach der Inkubationszeit wurden zu den 80 µl Reaktionsvolumen jeweils 8,8 µl einer steril filtrierten MTT-Lösung (5 mg/ml) gegeben und für weitere 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Volumen abgesaugt und die Formazankristalle in DMSO (200 µl) gelöst. Dabei erfolgte ein Farbumschlag ins blau-gräuliche. Da die exakte Messung der Extinktion durch Zellfragmente oder NP beeinflusst werden kann, wurde jeweils 150 µl der DMSO-Lösung in Eppendorf-Tubes überführt und für 5 Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert. 80 µl dieses Überstandes wurden in eine neue 96er-Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurde mittels ELISA-Reader die Extinktion bei einer Wellenlänge von 550 nm, sowie einer Referenzwellenlänge 630 nm, ermittelt.

2.6.5.2 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Eine weitere Möglichkeit die Toxizität von NP zu bewerten, ist der Nachweis von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS). Moleküle dieser Art enthalten oft Sauerstoff, sind äußerst reaktiv und können mit einer sehr großen Anzahl von Reaktionspartnern wechselwirken.

Die von Fluorescein abgeleitete Verbindung 2',7-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (DCFH-DA) dient als Indikator, denn durch Sauerstoffradikale wird diese Verbindung zu 2',7-Dichlorofluorescein umgewandelt (Abb. 2.6.5.2).

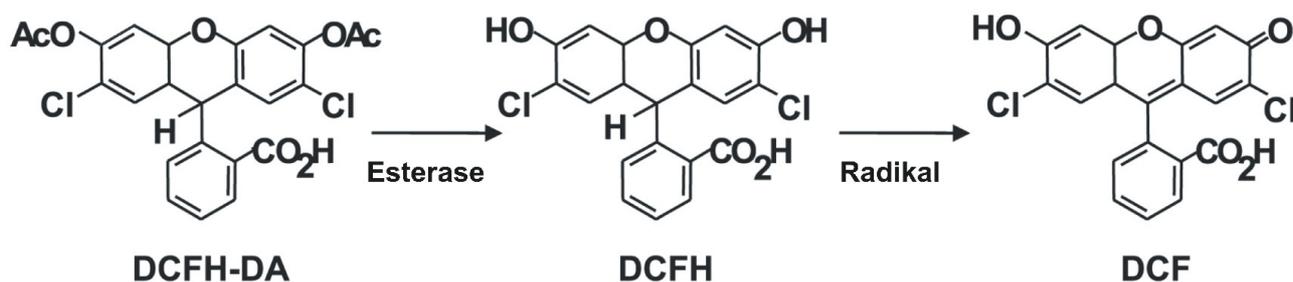


Abb. 2.6.5.2 Umsetzung der auf Fluorescein basierten Verbindung DCFH-DA zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies. Grafik adaptiert von D. G. Harrison et al.¹²⁵.

Dieses Endprodukt zeigt ein Extinktionsmaximum bei 495 nm und ein Emissionsmaximum bei 629 nm, wodurch die ROS-Bildung quantifiziert werden kann.

Es wurden 150000 Zellen pro Kavität in eine 6-Well Platte eingesät und für 24 h kultiviert. Nach der NP-Inkubation wurden die Zellen mit 10 μM DCFH-DA (in RPMI 1640, 10% FKS) für 30 Minuten bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünf mal mit PBS (ohne Kalzium) gewaschen und trypsinisiert, um sie mittels Durchflußzytometrie (BD FACS Calibur) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm zu analysieren. Für jedes Experiment wurden dabei mindestens 10000 Ereignisse gesammelt.

2.6.5.3 Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH)

Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym der Glykolyse (Gleichung 2.6.5.3.1), das in fast in jedem Zelltyp im Zytosol vorkommt. Durch einen zytotoxischen Effekt kann die Zellmembran beschädigt werden, was die Freisetzung von LDH zur Folge hat. Durch die Oxidation von Pyruvat entsteht NAD^+ , welches im Gegensatz zu NADH ein Extinktionsmaximum bei 340 nm zeigt. Dadurch kann das Ausmaß der zellulären LDH-Freisetzung photometrisch quantifiziert werden. Dabei ist zu beachten, dass beispielsweise durch den Serumgehalt im Kulturmedium stets eine Basis-Aktivität von LDH besteht, welche vom Messwert zu subtrahieren ist.



Zur Durchführung wurden 5000 Zellen pro Kavität in eine 96-Well Platte eingesät und für 24 h kultiviert. Nach der NP-Inkubation wurden die Zellen mit 100 μl CytoTox-ONE (Produkt G7890) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μl Stop-Lösung beendet. Im nächsten Schritt wurden jeweils 50 μl der Reaktionslösung in eine neue Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten überführt, und das Ausmaß der LDH-Produktion photometrisch durch die Extinktion bei 490 nm bestimmt. Um die maximal mögliche LDH Freisetzung zu bestimmen wurde eine Positivkontrolle angefertigt, indem die Zellen vor der Behandlung mit CytoTox-ONE mit einer Lyse-Lösung, für 15 Minuten bei Raumtemperatur, behandelt wurden. Im letzten Schritt wurde die prozentuale Toxizität nach Gleichung 2.6.5.3.2 berechnet.

$$\text{proz. Toxizität} = \frac{\text{exp. Messwert} - \text{Kulturmedium Hintergrund}}{\text{maximale LDH Freisetzung} - \text{Kulturmedium Background}} \quad (2.6.5.3.2)$$

2.7 Statistische Auswertung

Die Daten sind jeweils, soweit möglich und nicht anders angegeben, als arithmetischen Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Bei den Experimenten mit Kulturzellen wurde die Konzentrationsbestimmung in einer Einzelzelle ($n = 1$) als unabhängige Messung betrachtet. Bei der Konzentrationsbestimmung in Lungengewebe wurde die Analyse von jeweils einem Tier ($n = 1$) als unabhängige Messung verwendet. Für die statistische Auswertung wurde das Programm Origin (Version 8.0) und die Statistiksoftware Prism (Version 5.0) verwendet.

Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft und anschließend entweder mit dem Student's T-Test (normalverteilte Daten) oder mit dem Mann-Whitney-U-Test (keine Normalverteilung) auf signifikante Unterschiede getestet.

Zum Vergleich von mehr als zwei Versuchsgruppen wurde ein ANOVA durchgeführt. Unterlagen die Messdaten keiner Normalverteilung, wurde ein einfaktorielles ANOVA nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Als Post-hoc-Test wurde der Dunnett-Test eingesetzt. Die Signifikanzschwelle wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ angegeben.

Um zu überprüfen, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen zwei Größen bestand, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Tiefenprofilanalyse (Z-Achse) der zellulären Nanopartikelaufnahme anhand des Protonen-Rückstreusignals

3.1.1 Rutherford-Rückstreu-Analyse von biologischen Proben

Eine Stärke der Ionenstrahlmikroskopie ist, im Vergleich zur Elektronenstrahlmikroanalyse, durch das Rückstreusignal eine Tiefeninformation der NP-Verteilung zu liefern.

Die RBS-Daten wurden für jede einzelne Zelle durch eine Simulation mit Hilfe des Programms SIMNRA gefittet und dadurch die Parameter, mittlere Dicke der Einzelzelle, Komposition und Ladung, dem Experiment bestimmt (Abb. 3.1.1.1). Werden diese Parameter mit der Ausbeute der charakteristischen Röntgenstrahlung kombiniert, ermöglicht dies die Konzentration des jeweiligen Elements in der Probe zu berechnen.

Bei der Ionenstrahlanalyse biologischer Proben stehen generell zwei verschiedene Trägermaterialien zur Verfügung, auf Polymeren basierende Folien oder Siliziumnitrid-Membranen. Beide Varianten generierten im RBS-Spektrum ein sehr starkes Signal, welches mit den zellulären Signalen von Kohlenstoff oder Stickstoff überlappt. Im Vergleich zwischen Polypropylenfolie und Si_3N_4 -Fenster konnten im Mittel ähnliche Werte für die mittlere Dicke der Einzelzellen und die zelluläre Komposition bei NP-unbehandelten Kulturzellen ermittelt werden. Letztendlich wurde Polypropylenfolie anstelle von Si_3N_4 als Träger gewählt, da dieses Material einfacher zu handhaben und deutlich preiswerter ist. Si_3N_4 -Fenster neigen bedingt durch eine Dicke um 200 nm zum Bruch und haben mit 450 Eur/cm² einen deutlich höheren Preis im Vergleich zur Polypropylenfolie, welche mit 43 Eur/cm² deutlich weniger kostet.

Bei der Einzelzellanalyse auf Polypropylenfolie konnte eine Überlappung zwischen dem Kohlenstoffsignal des Träger- und Zellmaterials beobachtet werden (Abb. 3.1.1.1 B). Allerdings ist es durch die konstante Dicke der Polypropylenfolie möglich, die Dicke der Zelle zu bestimmen. Durch den Vergleich mit dem Trägermaterial Si_3N_4 , konnte der Wert für die mittlere Dicke der Einzelzellen und der Wert für die Kohlenstoffkonzentration bestätigt werden.

Im Fall der Gewebeanalyse kam DePeX oder Limonen, welche beide ein auf Kohlenwasserstoff basierendes Trägermaterial für die Mikroskopie darstellen, zum Einsatz. Bei der Gewebeanalyse konnte durch den unterschiedlichen Kohlenstoffgehalt von Präparat und Trägermaterial (Abb. 3.1.1.1 A) die Dicke des Gewebeschnitts ermittelt werden. Im Vergleich zu Kulturzellen zeigt das

Gewebepräparat durch die Einbettung mit dem Trägermaterial eine deutlich größere Dicke. Dies birgt die Gefahr, dass sich die Probe während der Messung auflädt und führt zu mehr Rückstreueignissen im niederenergetischen Bereich unterhalb von 1000 keV durch multiple Stoßereignisse in tieferen Schichten der Probe.

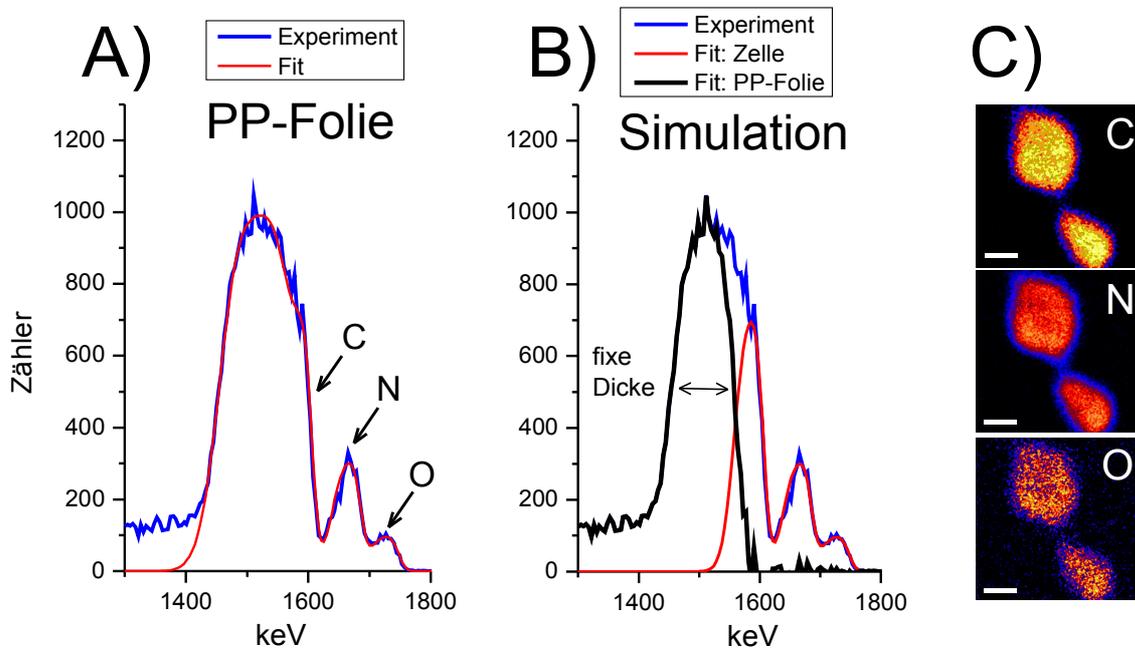


Abb 3.1.1.1 Analyse des Rückstreusignals von A549-Zellen auf Einzelzellebene. **A)** Gesamtsimulation des RBS-Experiments (Zelle mit Polypropylenfolie als Träger) **B)** Aufteilung der Gesamtsimulation in den Anteil des zellulären Materials (rot) und das Material des Trägers (schwarz). **C)** Ortsaufgelöste Darstellung der zellulären Matrixelemente. Der weiße Balken repräsentiert jeweils 5 Mikrometer.

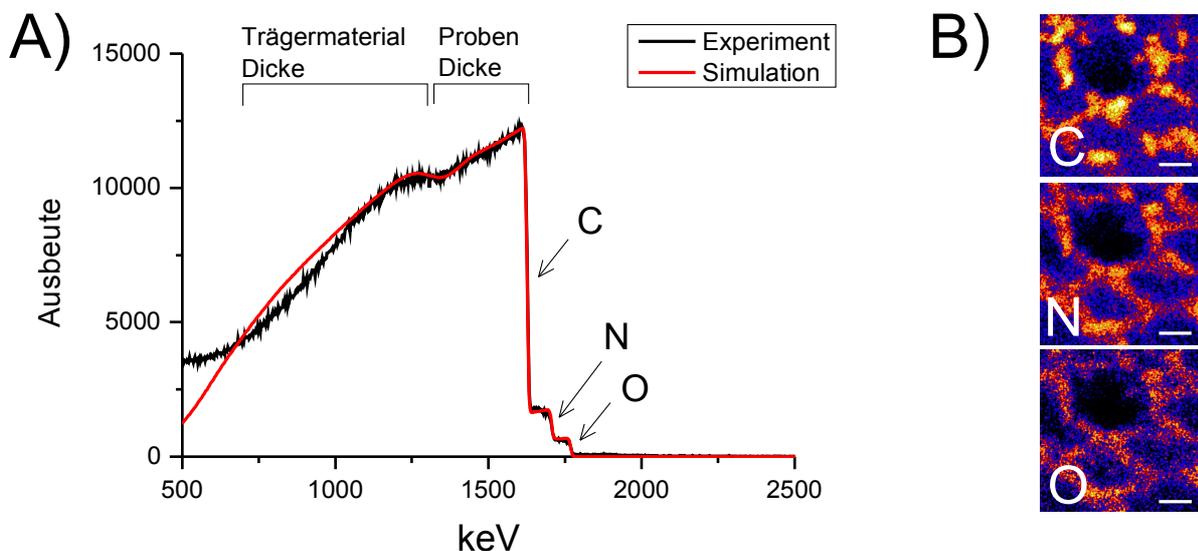


Abb. 3.1.1.2 RBS-Analyse einzelner Alveolen **A)** Rückstreuspektrum von Präparat und Trägermaterial **B)** Ortsaufgelöste Darstellung der Matrixelemente. Der weiße Balken entspricht jeweils 50 μm .

Unter Anwendung der CUT-Funktion des Programms GeoPIXE konnte eine orts aufgelöste Darstellung der mittels RBS analysierten Matrixelemente Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff erreicht werden (Abb 3.1.1.1 C, Abb. 3.1.1.2 B).

Das Ziel der RBS-Analyse ist die Komposition und Dicke der jeweiligen Zelle zu ermitteln, und die absolute Anzahl der Protonen (Ladung) zu bestimmen, welche mit der Zelle über den gesamten Zeitraum der Messung in Wechselwirkung getreten sind. Ein typisches Ergebnis dieser Parameter ist für alle analysierten biologischen Proben in Tabelle 3.1.1 dargestellt. Die Proben umfassten primäre Typ-II-Pneumozyten, die A549-Zelllinie, und Lungengewebe der Maus.

In Abhängigkeit des biologischen Materials konnte eine weitestgehend gleichbleibende Zusammensetzung der Matrixelemente beobachtet werden, welche im Mittel der Summenformel $C_{7.3}H_{10}N_{1.1}O_{0.7}$ entsprach. Bei allen Lungenzelltypen schwankte die Dicke zwischen ca. 4000 und 90000 10^{15} Atome/cm². Bei einer theoretischen mittleren Zelldichte von 1 g/cm³ entspricht dies etwa einer geometrischen Dicke von 0,4 bis 9 Mikrometern. Polypropylenfolie mit der Komposition C_3H_6 und einer Dichte von 0.92 g/cm³, hat bei einer Dicke von 40000 10^{15} Atome/cm² eine geometrische Dicke von 4 μ m.

Die zellulären Elemente P, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn zeigten im Vergleich zu den Matrixelementen C, H, N und O eine deutlich geringere Signalausbeute und unterlagen größeren Konzentrationsschwankungen bei der RBS-Analyse. Die genannten zellulären Elemente liegen im RBS-Spektrum teilweise relativ nah beieinander (bspw. Phosphor: 1978 keV, Schwefel: 1987 keV). Bedingt durch deren geringe Konzentration und einer Auflösung des RBS-Detektors von 10 – 20 keV, ist eine Separierung dieser Elemente nicht immer vollständig möglich.

Tabelle 3.1.1 Typische zelluläre (Komposition und Dicke) und experimentelle (Ladung) Parameter, welche durch die RBS-Analyse für unterschiedliche Lungenzelltypen ermittelt wurden. Es sind jeweils Zellen oder Gewebe ohne NP-Behandlung gezeigt. Die Komposition der wesentlichen Matricelemente (C, H, N, O) ist jeweils in Prozent dargestellt.

Komposition	A459-Zellen	AT-II Zellen	Lungengewebe
	Zellline	Ratte	Maus
	%	%	%
C	31.00	33.00	32.00
H	56.30	55.85	63.45
N	8.50	7.30	2.00
O	3.50	2.50	2.00
Na	0.20	0.70	0.30
Cl	0.02	0.10	0.15
P	0.25	0.30	0.05
S	0.20	0.20	0.05
K	0.03	0.05	0.05
Ca	0.00	0.00	0.00
Dicke (10^{15} Atome/cm²)	14000	4800	90000
Ladung (μC)	0.573	0.579	0.384

3.1.2 RBS-Analyse im zellulären Kontext

Die zelluläre Aufnahme der NP konnte durch das Rückstreusignal untersucht werden, da internalisierte Partikel von zellulärem Material bedeckt sind, wodurch sie bei einem Rückstreueignis zusätzlich Energie verlieren. Die resultierende Verschiebung erlaubte zwischen internalisierten und an der Oberfläche adsorbierten Partikeln zu unterscheiden. Die Analyse des Rückstreusignals erfolgte unter Verwendung eines Layermodells, wobei die Zelle und der Träger Polypropylenfolie den größten Massenanteil bilden. Innerhalb der Zelle wurde zwischen weiteren Layern unterschieden, wobei beispielsweise den aufgenommenen Nanopartikeln ein eigener Layer zugewiesen wurde. Mit Hilfe des Layermodells wurden die experimentellen Daten gefittet. Dadurch war es möglich zu unterscheiden, ob sich der NP an der Zelloberfläche befindet oder internalisiert wurde.

Durch die Aufnahme des NP wurde eine typische Verschiebung des Protonen-Rückstreusignals von 30 keV beobachtet. Das entspricht einer Lokalisation der NP in ca. 1,2 μm Tiefe. Das Auflösungsvermögen (Halbwertsbreite) des RBS-Detektors beträgt etwa 10 keV. Das entspricht

einer Z-Achsen-Auflösung von 400 nm.

Durch die Ladungsmessung konnte beobachtet werden, dass nur ein geringer Anteil der Protonen von den Zellen und der Polypropylenfolie absorbiert wurden. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass in jeder zellulären Z-Achsen-Position ein Rückstreueignis detektiert werden kann. Um diese Annahme zu überprüfen wurde unter Einsatz des bekannten Bremsvermögens für die einzelnen Matrixelemente und unter Verwendung der Software SRIM¹²⁶ (Stopping and Range of Ions in Matter) das Absorptionsvermögen einer biologischen Probe bestimmt. Abb. 3.1.2 A) zeigt in diesem Zusammenhang eine simulierte Tiefenprofil-Analyse von Polypropylenfolie mit der Komposition C_3H_6 und einer Dichte von $0,92 \text{ g/cm}^3$. In diesem Material ist eine maximale Penetrationstiefe von 2250 keV Protonen von ca. $80 \text{ }\mu\text{m}$ gegeben. Da mittels konfokaler Mikroskopie ein mittlerer Durchmesser von $16,0 \pm 1,6 \text{ }\mu\text{m}$ für in Suspension befindliche A549-Zellen (kugelförmig, nicht adhärent) ermittelt werden konnte, ist die Analyse des Rückstreusignals von NP somit in jeder zellulären Schichttiefe zugänglich.

Für die Elemente der Metalloxid-NP ist, auf Grund ihrer Atommasse, eine unterschiedliche Ausbeute des Rückstreusignals zu erwarten. Deshalb wurde die Lage und Intensität des Rückstreusignals der NP Al_2O_3 , CeO_2 , Fe_2O_3 , TiO_2 und ZnO in einer Kontrollmessung bestimmt (Abb. 3.1.2 B). Dazu wurde jeweils eine Probe mit einer sehr dünnen NP-Schicht angefertigt, indem eine NP-Wasser-Suspension tröpfchenweise luftgetrocknet und großflächig analysiert wurde. Dabei konnte eine starke Variation der Signalintensität zwischen den verschiedenen NP-Elementen festgestellt werden, welche durch den Wirkungsquerschnitt begründet werden kann. Die NP Al_2O_3 , CeO_2 und ZnO sind zum Studium des zellulären RBS-Signals am besten geeignet, da sie in einer relativ hohen Konzentration aufgenommen werden und das Rückstreusignal eine relativ hohe Ausbeute zeigt. Die zelluläre RBS-Analyse von Fe_2O_3 und TiO_2 ist durch die relativ geringe Signalintensität des Rückstreusignals nur begrenzt möglich und hängt stark von der aufgenommenen NP-Menge ab.

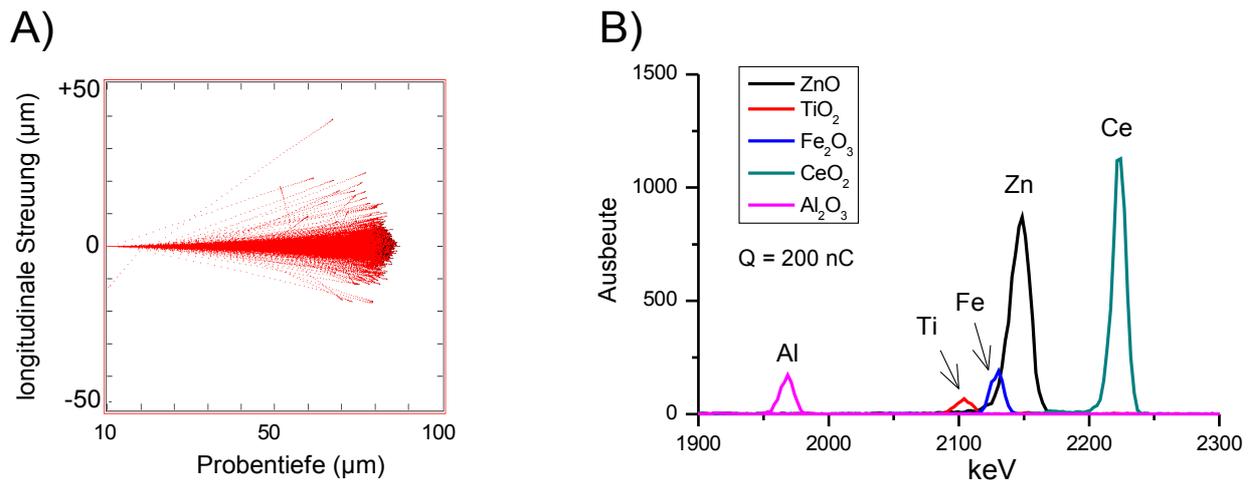


Abb 3.1.2 Tiefenprofilanalyse kohlenwasserstoffhaltigen Materials und RBS-Oberflächensignale NP relevanter Elemente **A)** Protonen (2250 keV) können das Material Polypropylenfolie bis zu einer Tiefe von ca. 80 μm penetrieren. Die Simulation des Experiments erfolgte mit Hilfe der Daten des Bremsvermögens von J. F. Ziegler und J. P. Biersack sowie der Software SRIM **B)** Verhältnis der Signalausbeute von Oberflächensignalen (RBS) einzelner Metalloxid-NP. Nach der Präparation und Lösung in Millipore-Wasser wurden die NP zu jeweils in einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ auf Polypropylenfolie getropft und luftgetrocknet. Alle Experimente wurden nach einer fixen Ladungsmenge beendet (200 nC) und somit auf die Anzahl der auf die Probe getroffenen Protonen normalisiert.

Nachdem diese Kontrollmessung des Oberflächensignals gefittet wurde, erfolgte der Vergleich mit dem zellulären Rückstreusignal. Dabei wurde die Dicke der Zellschicht welche den NP bedeckt so lange angepasst, bis die Simulation des NP-Rückstreusignals mit dem zellulären NP-Rückstreusignal übereinstimmte.

Die Partikel wurden als aufgenommen gewertet, wenn sie von einer Schicht von Zellmaterial bedeckt waren, die mindestens 10 % der gesamten Zelldicke entsprach. Bei einer typischen Zelldicke von 14000×10^{15} Atomen/ cm^2 für A549-Zellen, entspricht das ungefähr 150 nm.

Bei den Partikeln ZnO, CeO₂ und Al₂O₃ konnte durch die starke Signalintensität des Rückstreusignals die zelluläre Z-Achsen-Position der Partikel ermittelt werden. Dazu wurden drei verschiedene Modelle zur Klassifizierung der Position verwendet:

- Oberfläche - Die Partikel befinden sich vollständig auf der Zelloberfläche und das zelluläre Signal zeigt eine identische Position im Vergleich zum Referenzsignal
- internalisiert & Oberfläche - Die Partikel wurden in die Zelle aufgenommen, wobei sich gleichzeitig ein Teil der Partikel auf der Oberfläche befindet.
- internalisiert - Die Partikel wurden vollständig in die Zelle aufgenommen.

3.1.2.1 Al₂O₃

Al₂O₃-NP sind im Vergleich zu den anderen Metalloxid-NP durch eine geringe Dichte gekennzeichnet, welche einen Einfluss auf das Sedimentationsverhalten und somit auf die Aufnahme der NP haben kann. Durch die relativ geringe Atommasse von Aluminium sind Al₂O₃-NP besonders sensitiv für den Nicht-Rutherford-Effekt und es ist eine Rückstreuenergie zu erwarten, welche sich in der Nähe von zellulären Elementen befindet.

Im Fall von Aluminiumoxid-NP war die zelluläre Aufnahme der Partikel durch eine Energieverschiebung des Aluminium-RBS-Signals von ungefähr 50 bis 60 keV detektierbar. Abb. 3.1.2.1 A) zeigt ein typisches Beispiel für vollständig internalisierte Aluminiumoxid-NP sowie für die Kategorie „internalisiert & Oberfläche“. Die Darstellung erfolgte, indem das Signal der zellulären Elemente mit der höchsten Konzentration (Phosphor & Schwefel) auf 1 normiert wurde. Dadurch ist erkennbar, dass das zelluläre Aluminium-Signal eine deutliche stärkere Ausbeute im Vergleich zu den zellulären Elementen (P, S, Cl, K und Ca) zeigt. Durch die Verschiebung des Al-Signals besteht eine potentielle Interferenz bzw. Verwechslungsgefahr mit dem zellulären Na-Signal. Allerdings korreliert die Signalstärke von Natrium mit denen anderer zellulärer Elemente wie z.B. Phosphor und Schwefel sowie insbesondere Chlor, weshalb aufgrund der deutlich stärkeren Ausprägung des Al-Signals eine Verwechslung auszuschließen ist. Etwa 30 % der Zellen konnten statistisch nicht berücksichtigt werden, da sie zu wenig Aluminium aufgenommen hatten, um ein Rückstreusignal zu liefern. Insgesamt konnten die meisten Zellen der Kategorie „internalisiert“ sowie „internalisiert & Oberfläche“ zugeordnet werden. In der Kategorie „internalisiert & Oberfläche“ zeigt sich die Tendenz, dass Al₂O₃-NP bei der Mehrzahl der Zellen auch an der Zelloberfläche lokalisiert sind, wenn sie keine Proteinkorona (FKS 0%) tragen.

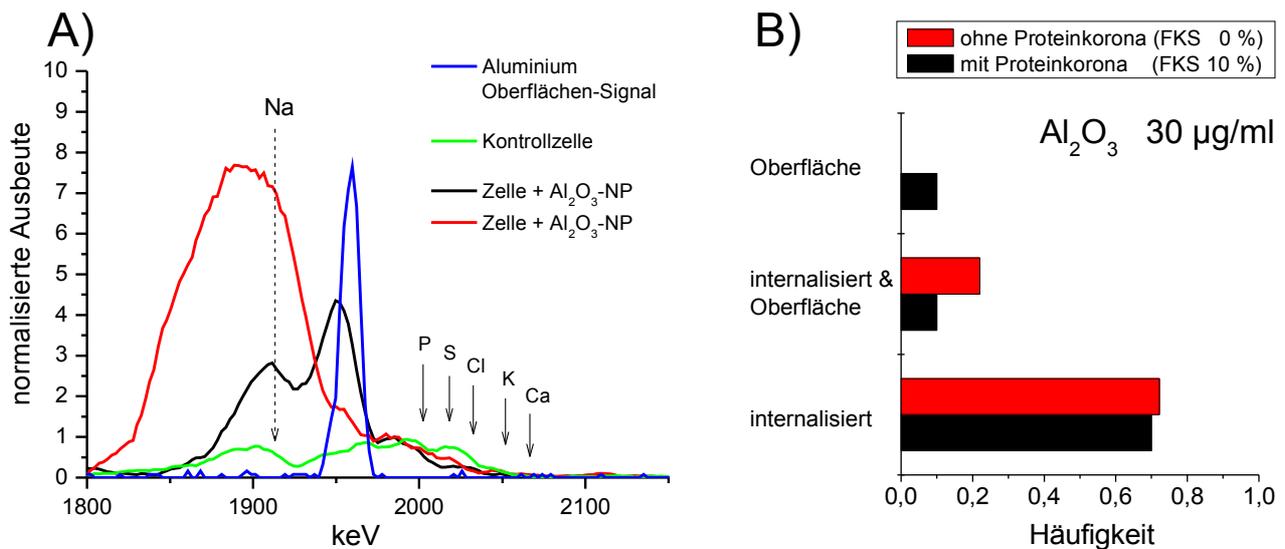


Abb. 3.1.2.1 A549-Zellen inkorporieren Aluminium **A)** Typische RBS-Spektren Aluminiumoxid behandelter A549-Zellen (48h, 30 µg/ml, FKS 10%). Exemplarisch wurden 2 Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Als Oberflächen-Signal wurde das Rückstreusignal von reinen auf Polypropylenfolie aufgetragenen Aluminiumoxid-NP als Referenz verwendet. Die schwarzen Pfeile markieren jeweils die tabellierte Position der Rückstreusignale zellulärer Elemente. Die Darstellung der Signalintensität ist nicht normalisiert **B)** Verteilung des zellulären Aluminium-Rückstreusignals. Es ist die Wahrscheinlichkeit angegeben mit der das Rückstreusignal einer einzelnen Zelle in der jeweiligen Kategorie anzutreffen ist. Für NP mit oder ohne Proteinkorona wurden jeweils mindestens $n = 10$ Einzelzellen analysiert.

3.1.2.2 CeO₂

Da Cerium u.a. durch seine Dichte von 6,69 g/cm³ ein Schwermetall ist, liefert es im Vergleich zu Aluminium ein Rückstreusignal bei höheren Energien (Oberflächensignal 2215,5 keV), welches deutlich außerhalb des Bereiches zellulärer Elemente liegt (Abb. 3.1.2.2.1). Es konnte nicht beobachtet werden, dass durch die Verschiebung der CeO₂-Signalposition (typische Verschiebung 20 – 80 keV) eine Überlagerung mit zellulären Elementen eintrat. Das zelluläre RBS-Signal konnte über einen applizierten Konzentrationsbereich von 3 – 100 µg/ml und bei einer Expositionszeit von 48 Stunden nachgewiesen und ausgewertet werden. Die typische Verschiebung des Protonen-Rückstreusignals, welche durch die Bedeckung der CeO₂-NP mit Zellmaterial entstand, lag zwischen 20 – 50 keV.

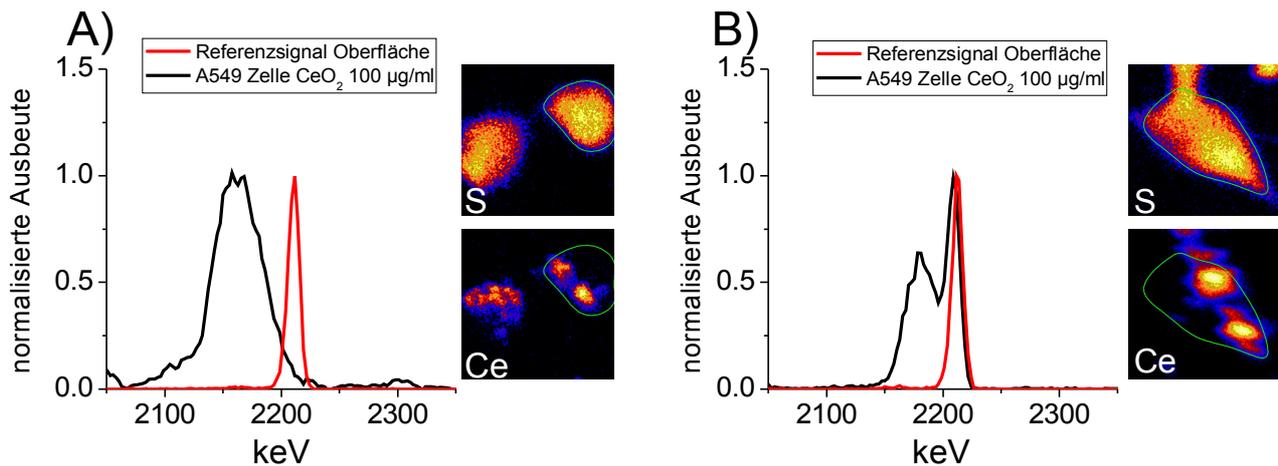


Abb 3.1.2.2.1 Repräsentative Rückstreusignale zellulärer CeO₂-NP. A549-Zellen wurden für 48 Stunden mit CeO₂-NP einer Konzentration von 100 µg/ml ausgesetzt. Als Referenz (Oberflächensignal) kam mit CeO₂-NP (30 µg/ml) beschichtete Polypropylenfolie zum Einsatz. **A)** Nachweis der vollständigen Aufnahme durch typische Verschiebung des zellulären CeO₂-RBS-peaks um ca. 50 keV **B)** Typisches Beispiel für die teilweise Aufnahme von CeO₂. Das zelluläre CeO₂-Rückstreusignal korreliert mit dem Oberflächensignal und zeigt gleichzeitig eine Verschiebung um ca. 42 keV.

Eine statistische Darstellung der zellulären CeO₂-Position ist in Abb. 3.1.2.2.2 dargestellt, indem die jeweilige Art des Rückstreusignals in die zuvor aufgeführten Kategorien eingeordnet wurde. Die ausschließliche Verteilung auf der Oberfläche konnte nur in Ausnahmefällen beobachtet werden. Die beiden wichtigsten Kategorien waren die vollständige bzw. partielle zelluläre Internalisierung der Partikel. Im Allgemeinen konnte ein deutlicher Einfluss der Proteinkorona auf die zellulären Z-Achsen-Position der CeO₂-NP beobachtet werden. In Anwesenheit einer Proteinkorona wurde ein höher Prozentsatz von Zellen vorgefunden, welche die Partikel vollständig aufnahmen bzw. weniger Partikel an der Zelloberfläche zeigten.

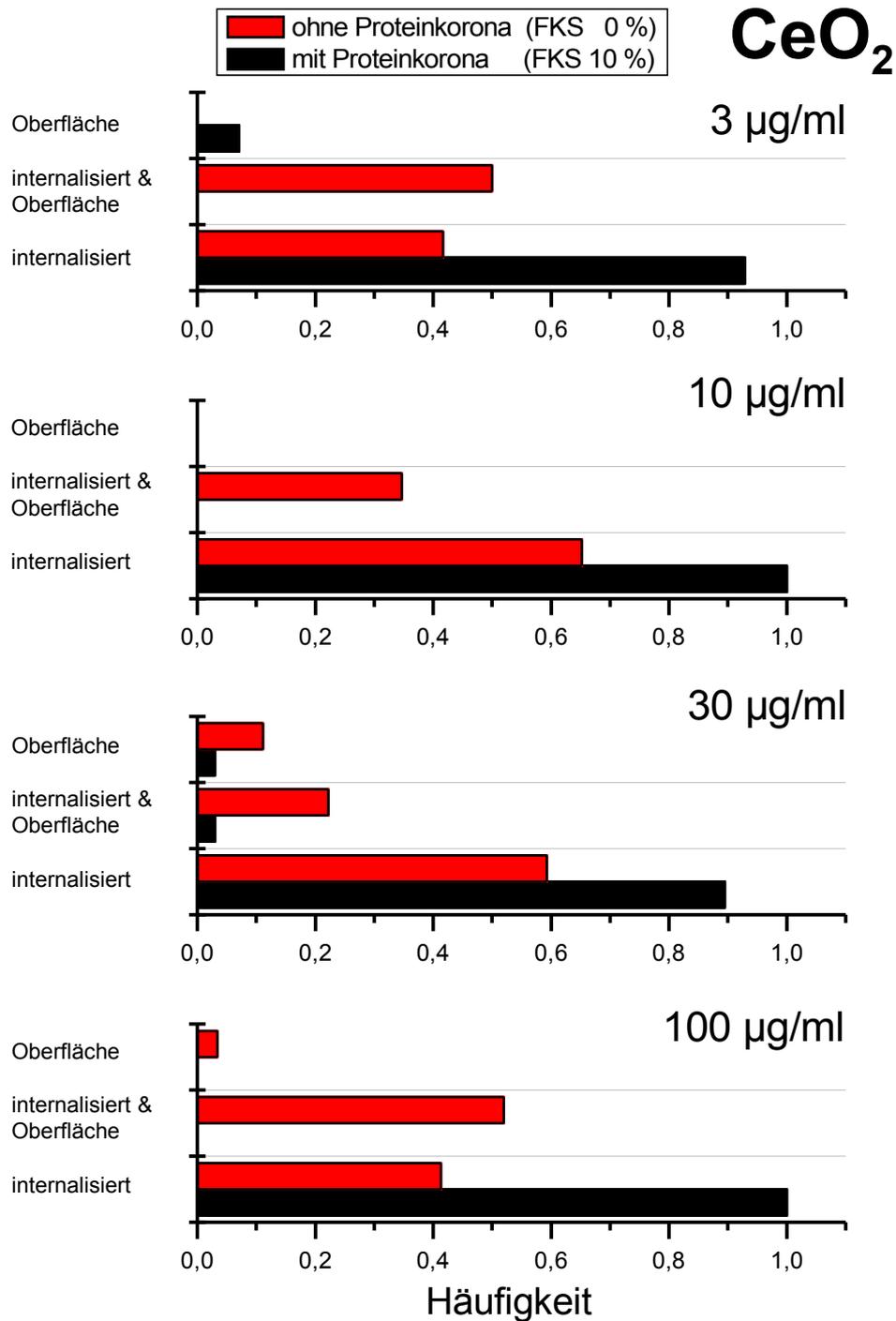


Abb 3.1.2.2.2 Statistische Darstellung zellulärer Aufnahmeszenarien von CeO₂-NP. A549-Zellen wurden für 48 Stunden mit CeO₂-NP einer Konzentration von 3 - 100 µg/ml ausgesetzt. Es ist die Wahrscheinlichkeit angegeben mit der das Rückstreusignal einer einzelnen Zelle in der jeweiligen Kategorie anzutreffen ist. Bei jeder Dosis wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit der Proteinkorona jeweils mindestens n = 11 Einzelzellen analysiert.

3.1.2.3 ZnO

Bei der RBS-Analyse ZnO behandelter A549-Zellen konnte, wie im Fall von Al_2O_3 und CeO_2 , eine zelluläre Aufnahme der Partikel durch die Verschiebung des Zn-Rückstreusignals zu niedrigeren Energien beobachtet werden (Abb. 3.1.2.3.1 A). Unter besonderen Umständen, z.B. bei einer sehr dicken Zellschicht, ist eine Überlagerung zwischen zellulären Elementen (Ca, Cl) und Zink möglich, was allerdings nur in Ausnahmefällen beobachtet wurde. Durch die orts aufgelöste Elementanalyse mittels PIXE konnte ergänzend die Kolokalisation von Zink und Kalzium beobachtet werden (Abb. 3.1.2.3.1 B). Kontrollzellen zeigten, bedingt durch die sehr niedrige zellulären Kalzium- und Zink-Konzentrationen kein Rückstreusignal für diese Elemente. Es ist anzumerken, dass die RBS-Analyse nicht zwischen nanopartikulären oder freien Zinkionen unterscheiden kann.

In Abb. 3.1.2.3.1A) ist exemplarisch eine Zelle dargestellt, bei der ZnO-NP internalisiert wurden und gleichzeitig an der Zelloberfläche adsorbiert sind. Dabei ist im Vergleich zum Oberflächensignal, ist das zelluläre Zink bei niedrigeren Energien im Bereich zwischen 2100 und 2150 keV zu erkennen.

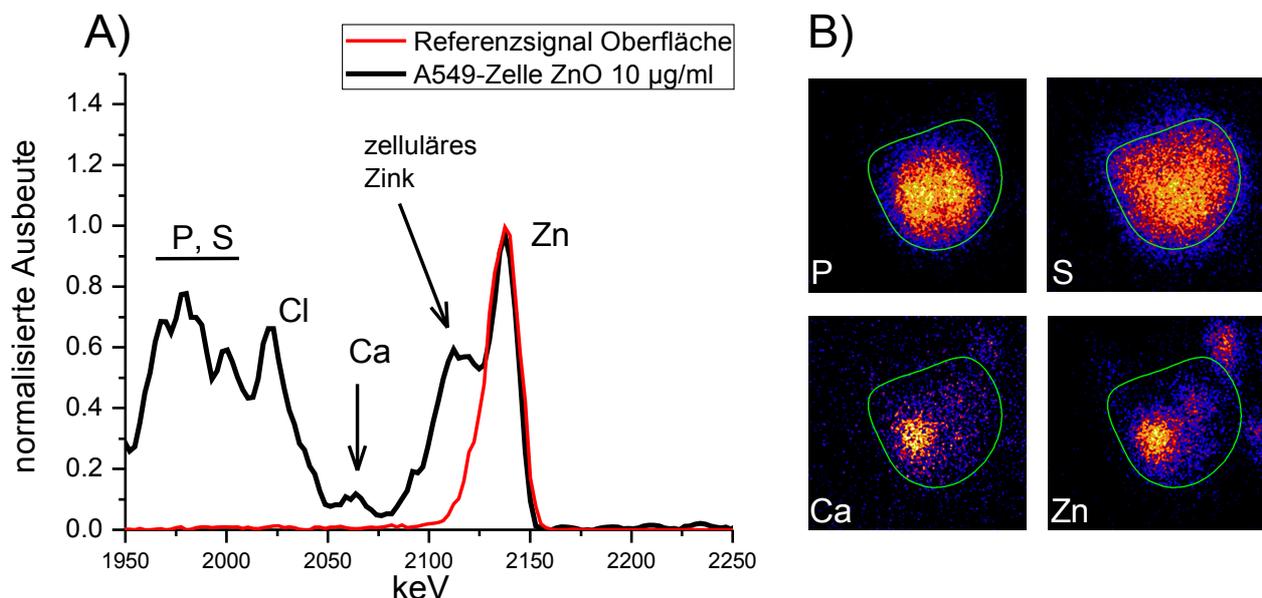


Abb. 3.1.2.3.1 Repräsentatives Rückstreusignal zellulärer ZnO-NP. A549-Zellen wurden für 48 Stunden mit ZnO (10 µg/ml) inkubiert. **A)** Nachweis der partiellen Aufnahme durch typische Verschiebung des zellulären ZnO-RBS-peaks um ca. 25 keV. Als Referenz (Oberflächensignal rot dargestellt) kam mit ZnO-NP (30 µg/ml) beschichtete Polypropylenfolie zum Einsatz. **B)** Kolokalisation von Zn und Ca, dargestellt durch orts aufgelöste Elementkonzentration. Die Größe der element-maps beträgt jeweils 25 x 25 µm.

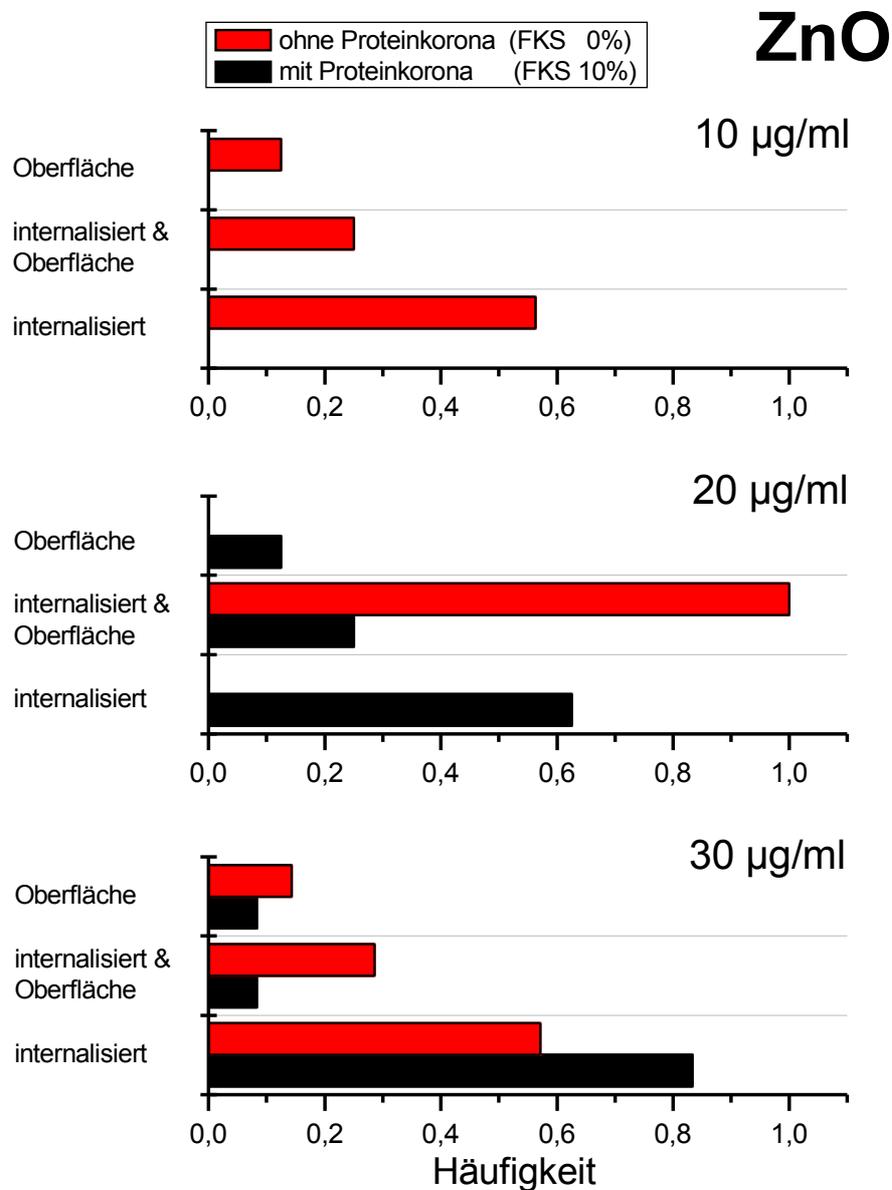


Abb. 3.1.2.3.2 Statistische Darstellung zellulärer Aufnahmeszenarien von ZnO-NP. A549-Zellen wurden für 48 Stunden mit ZnO-NP einer Konzentration von 10 - 30 µg/ml ausgesetzt. Es ist die Wahrscheinlichkeit angegeben mit der das Rückstreusignal einer einzelnen Zelle in der jeweiligen Kategorie anzutreffen ist. Bei jeder Dosis wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit der Proteinkorona jeweils mindestens n = 7 Einzelzellen analysiert.

Die Aufnahme von ZnO-NP wurde bei einer Dosis von 10, 20, 30 µg/ml und einer Inkubationszeit von 48 Stunden studiert. Das Rückstreusignal bei einer Applikationsdosis von 10 µg/ml konnte nur in Abwesenheit von Serum ausgewertet werden, da sonst durch die niedrige zelluläre ZnO-Aufnahme kein Zink-Rückstreusignal detektierbar war. Bei höheren Konzentrationen von 20 und 30

$\mu\text{g/ml}$ ist bei einer höheren Zahl von Zellen eine Internalisierung der ZnO-NP detektierbar, wenn sie von einer Protein-Korona (FKS 10 %) umgeben waren (Abb. 3.1.2.3.2). Generell wurde bei ZnO-Nanopartikeln ohne Proteinkorona niemals eine vollständige Internalisierung bei allen untersuchten Zellen beobachtet. Stets führte die Abwesenheit von Serum dazu, dass ZnO-NP an der Zellaußenseite adsorbieren.

Die Kategorie Oberfläche konnte, ähnlich wie im Fall von Al_2O_3 und CeO_2 , nur vereinzelt beobachtet werden.

3.2 Quantitative Elementanalyse mittels PIXE

3.2.1 Optimierung des Elementnachweises

Bei einer Inzidenzenergie von 2250 keV weisen viele biologische Elemente, wie z.B. P, S, Cl, K und Ca eine charakteristische Röntgenstrahlung zwischen 2,0 und 4,0 keV auf. Durch die am Detektor installierten Absorber Polyethylen-Folie und Beryllium ist eine Schwächung der Photonenenergien in diesem Bereich zu erwarten. Um Elemente mit einer charakteristischen Röntgenstrahlung zwischen 2,0 und 4,0 keV quantifizieren zu können, ist es deshalb notwendig die genaue Dicke dieser Absorber zu bestimmen. Zusätzlich zeigt der Gold-Frontkontakt des Röntgendetektors eine Absorptionsbande bei 2,3 keV, welche exakt der Emissionsenergie von Schwefel entspricht. Schwefel stellt ein wichtiges zelluläres Strukturelement dar, welches als intrazellulärer Standardelement verwendet werden kann, da dieses Element weder Bestandteil der eingesetzten NP ist, noch im Waschpuffer vorkommt.

Am Lippion lässt sich der Abstand zwischen Röntgendetektor und Probe variabel einstellen. Der Experimentator ist dabei bestrebt, den Abstand zwischen Probe und Röntgendetektor möglichst klein zu halten, da der Raumwinkel quadratisch vom Abstand abhängt ($\Omega = A/r^2$) und so bei geringen Abständen deutlich kleinere Messzeiten nötig sind. Allerdings ergibt sich durch die Geometrie der Probenkammer, dass bei sehr geringen Abständen, der Röntgendetektor die aktive Fläche des RBS-Detektors verringert. Aus den aufgeführten Gründen ist es notwendig den Raumwinkel in Abhängigkeit des Probenabstandes zu kalibrieren, um die optimale Position des Röntgendetektors für die Quantifizierung biologischer Elemente zu ermitteln.

3.2.1.1 Charakterisierung der Absorber

Das Gesamtabsorptionsvermögen der vor dem Detektorkristall platzierten Absorber wird durch einen Transmissionsterm bei der Berechnung der Detektoreffizienz berücksichtigt. Die Effizienzkurve wurde dabei, unter Berücksichtigung der fixen Detektorparameter aktive Fläche, Durchmesser, Dicke, Form und Auflösung mit dem Programm GeoPIXE berechnet (Abb. 3.2.1.1 A).

Mittels STIM-Analyse wurde eine Gesamtdicke für den Polyethylen-Absorber von $54,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ermittelt. Zur Kalibration wurden Proben unterschiedlicher Dicke, bestehend aus $6 \mu\text{m}$ dicker Mylarfolie, eingesetzt. Diese zeigte laut Herstellerangabe, im Vergleich zu Polyethylen-Folie (20 %), deutlich kleinere Schwankungen in der Dicke (5 %). Erwartungsgemäß ergab sich eine lineare Abhängigkeit des Energieverlustes mit einem Anstieg von $3,02 \text{ keV/Kanal}$. Der untersuchte Polyethylen-Absorber rief einen Energieverlust von $995,3 \text{ keV}$ ($329,2 \text{ Kanäle}$) der 2250 keV Inzidenzteilchen hervor. Im Programm SRIM sind die experimentellen Daten für das Bremsvermögen prominenter Atome tabelliert. Unter Berücksichtigung der bekannten Werte für Dichte und Komposition, konnte mit SRIM eine Dicke von $54,5 \mu\text{m}$, durch Simulation des Experimentes, dem Energieverlust von $995,3 \pm 3,2 \text{ keV}$ zugeordnet werden.

Die STIM-Analyse eignet sich ebenfalls um Inhomogenitäten bezüglich der Dicke des Materials zu identifizieren. Dies ist von Relevanz, da die Dicke der Polyethylen-Folie laut Herstellerangaben um 20 % schwanken kann¹²⁷. Zur Analyse wurde ein großflächiger Scan auf einer Fläche von $2,56 \text{ mm}^2$ durchgeführt und das STIM-Spektrum von drei verschiedenen Regionen analysiert. Die Schwankung (ΔkeV) des Energieverlustes der Protonen betrug $3,2 \text{ keV}$, was umgerechnet einer Abweichung von $0,1 \mu\text{m}$ entspricht.

Die Dicke der Polyethylen-Folie wurde durch eine RBS-Analyse verifiziert. Dabei wurde eine ähnliche Dicke von $54,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ermittelt.

Im nächsten Schritt wurde die Dicke des Gold-Frontkontakts charakterisiert. Gold verursacht in der Effizienzkurve eine scharfe Absorptionsbande bei $2,3 \text{ keV}$, was ebenfalls der charakteristischen Röntgenstrahlung von Schwefel entspricht. Es kamen drei verschiedene Schwefel Standards (Celestit, Sphalerit, CaSO_4) zum Einsatz und die Dicke der Goldschicht wurde durch die gemessene Schwefelkonzentration angepasst. Dadurch wurde eine Dicke von 35 nm ermittelt, was im Erwartungsbereich von $200 - 480 \text{ Angström}$ liegt^{128 129}.

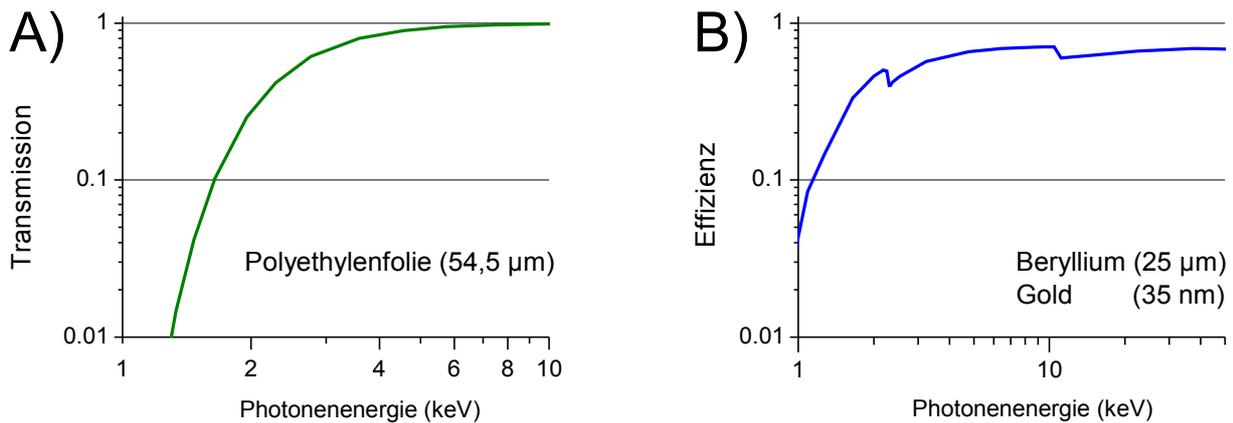


Abb. 3.2.1.1 Charakterisierung der Absorber des Röntgendetektors. Transmissions- und Effizienzkurve wurden nach Ermittlung der Absorberdicken mit der Software GeoPIXE errechnet. **A)** Polyethylen-Folie schützt den Detektor vor zurückgestoßenen Protonen und absorbiert besonders stark charakteristische Röntgenstrahlung unterhalb von 4 keV. **B)** Bedingt durch das Beryllium-Fenster (25 µm) sinkt die Effizienz des Detektors unterhalb von 2 keV stark ab und Gold zeigt eine charakteristische Absorptionsbande bei 2,3 keV. Die charakteristische Bande bei 11,05 keV kann Germanium zugeschrieben werden

3.2.1.2 Optimierung der Messanordnung des Röntgendetektors

Eine wichtige Größe um den Abstand des Detektors zu beschreiben ist der Raumwinkel ($\Omega = A/r^2$), weil dieser Wert gleichzeitig die aktive Fläche (A) des Detektors berücksichtigt. Um die benötigte Messzeit zu minimieren, ist der Experimentator bestrebt den Abstand zwischen Probe und Detektor so gering wie möglich zu halten. Dies trifft, bedingt durch die niedrige Dichte, bei biologischen Proben zu, kann jedoch bei Experimenten in den Materialwissenschaften zu Problemen durch sehr hohe Totzeiten führen. Aus diesen Gründen erfolgte die Kalibrierung des Detektors in verschiedenen Abständen zur Probe. Die Lage des Röntgendetektors lässt sich am Lipsion außerhalb der Probenkammer durch eine Messschiene einstellen. Die Skalierung erfolgt von 0 mm bis 282 mm, wobei die Position 282 mm den geringsten Abstand zur Probe darstellt.

Abb. 3.2.1.2 zeigt eine exponentielle Abhängigkeit des Raumwinkels vom Probenabstand. Vereinfacht betrachtet, ist der Raumwinkel, bei konstanten Strom, indirekt proportional zur Messzeit. Aus diesem Grund kann beispielsweise in Position 276, im Vergleich zu Position 259, die gleiche Signalausbeute in ungefähr der Hälfte der Zeit produziert werden. Es wurden 4 unterschiedliche Abstände kalibriert und Position 276 zur routinemäßigen Analyse biologischer Proben verwendet. Bei Position 276 beträgt der Abstand zwischen Probe und Röntgendetektor 30,3 mm und der Raumwinkel hat einen Wert von 103,8 Milliradian.

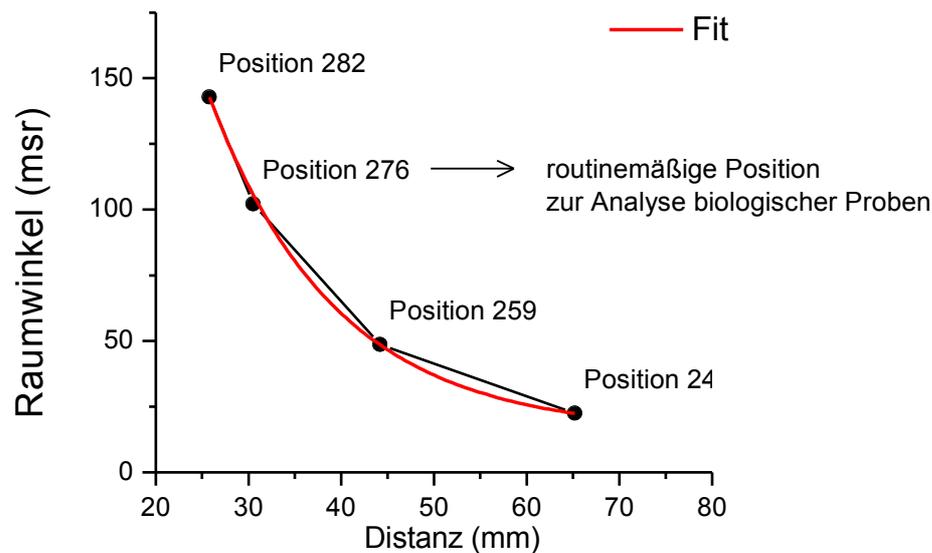


Abb 3.2.1.2 Abstandsbestimmung zwischen Röntgendetektor und Probe. Kalibrierung des Röntgendetektors erfolgte für verschiedene Abstände von der Probe unter Verwendung von Standard-Proben. Die Konfiguration mit dem geringsten Abstand (Position 282) wurde in einem Setup der RBS-Detektor-Konfiguration durchgeführt, wo der Abschirmungseffekt durch den PIXE-Detektor durch einen Rückstreuwinkel von 45° ausgeschlossen ist.

3.2.1.3 Präzision der Elementanalyse

Die Schwankung bei der Elementquantifizierung wurde an Standardmaterial der Firma Astimex verifiziert. Die dabei verwendeten Elemente stammen aus mineralischen Verbindungen, deren Konzentration bekannt und zertifiziert ist. Im Allgemeinen wurden die Elemente grob in zwei Gruppen eingeteilt. Photonenenergien welche kleiner als ca. 11 keV sind unterliegen Einflüssen von Absorbern wie Polyethylenfolie, Gold-Frontkontakt oder Beryllium. Härtere Strahlung unterliegt nicht dieser Absorption, weshalb Elemente, deren charakteristische Röntgenstrahlung oberhalb von ungefähr 11 keV liegt, geeignet sind, den Abstand des Röntgendetektors zu kalibrieren. Die Präzision der Quantifizierung biologischer Elemente mittels Röntgenfluoreszenz-Analyse ist in Abb. 3.2.1.3 dargestellt. Um den Fehler der Ionenstrahlmikroskopie bei der Elementquantifizierung zu ermitteln, wurde nach jedem Experiment die gemessene Konzentration eines Elements durch die zertifizierte Konzentration des Elementstandards geteilt ($K_{\text{gemessen}} / K_{\text{zertifiziert}}$). Der Fehlerbalken in Abb. 3.2.1.3 bezieht sich auf die Standardabweichung innerhalb dieser Quotienten.

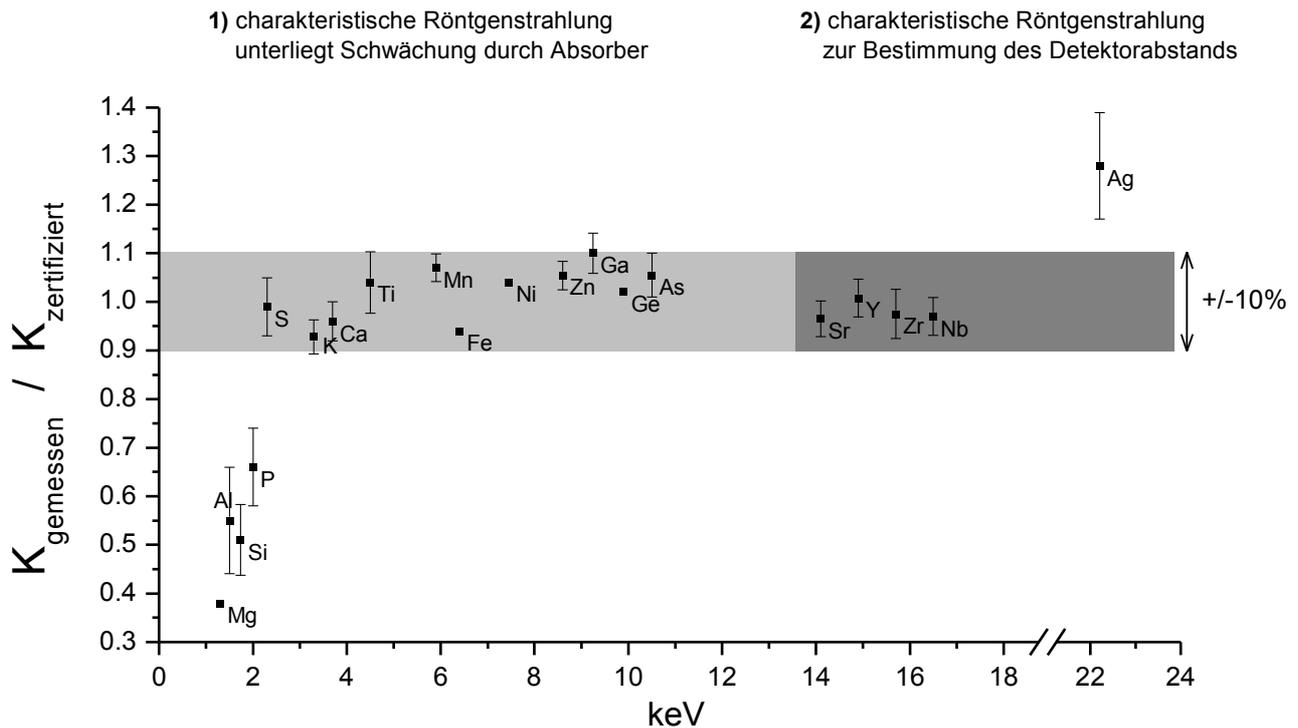


Abb. 3.2.1.3 Präzision der Elementquantifizierung am Lipsion. Die Variation der Elementquantifizierung mittels Röntgenfluoreszenzanalyse wurde ermittelt, indem die gemessene Konzentration (K_{gemessen}) eines Elementstandards durch dessen zertifizierte Konzentration ($K_{\text{zertifiziert}}$) dividiert wurde. Es ist jeweils die erste K_{α} -Linie des Elements auf der X-Achse dargestellt. K_{β} - und L-Linien wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgelassen. Elemente ohne Fehlerbalken wurden einmal gemessen. Elemente mit Fehlerbalken repräsentieren mindestens 3 unabhängige Experimente.

Die Mehrzahl der Elemente unterlag einer Schwankung im Bereich von $\pm 10\%$. Erwartungsgemäß zeigten Elemente bei 2 keV bzw. unterhalb von 2 keV eine große Abweichung, was durch die stark abnehmende Detektoreffizienz in diesem Bereich begründet werden kann. Eine Korrektur der Konzentration durch Anpassung der Ladung kam bei den abweichenden Elementen nicht in Betracht, da diese Vorgehensweise die Konzentration aller Elemente gleichermaßen verändern würde. Folglich wurde für die Elemente Al, Si, und P ein Korrekturfaktor gebildet, um die Konzentration durch Multiplikation mit diesem zu korrigieren. Eine Schwankung im Bereich von $\pm 10\%$ liegt im zu erwartenden Bereich, da in anderen Untersuchungen unter vergleichbaren Bedingungen ähnliche Abweichungen ermittelt wurden¹³⁰.

Da das Studium der zellulären Aufnahme von mit Silber markierten Graphen-Partikel bzw. Silber-NP die Quantifizierung über die K-Linie von Silber (K_{α} 22.2 keV, K_{β} 24.9 keV) erforderte, wurde metallisches Silber als Elementstandard eingesetzt. Da die Detektoreffizienz erfahrungsgemäß im Bereich oberhalb von 20 keV ebenfalls abnimmt, wurde für die Quantifizierung von Silber ein Korrekturfaktor von 0,782 verwendet.

3.2.2 Optimierung des Trägermaterials zur Analyse von Lungengewebe

Als Einbettmittel für die Mikroskopie kommen üblicherweise Materialien auf Kohlenwasserstoffbasis mit einem Brechungsindex zwischen 1,4 und 1,6 zum Einsatz. Ein etabliertes Einbettmaterial ist DePeX, da bei diesem Material die Bildung von Luftblasen und die Schrumpfung minimal ist. Es besteht hauptsächlich aus Polystyrol, Xylol und einem Weichmacher auf Phthalatbasis. Dies erlaubt die wasserfreie Einbettung der Probe für die Ionenstrahlmikroskopie. Da DePeX eine Verunreinigung mit Zink aufweist (Abb. 3.2.2), wurde Limonen als alternatives Material verwendet. Die inhomogene Zink-Kontamination entsteht höchstwahrscheinlich bei der Herstellung von Xylol, da dieses durch Methylierung von Toluol hergestellt wird und dabei Zink als Katalysator verwendet wird¹³¹.

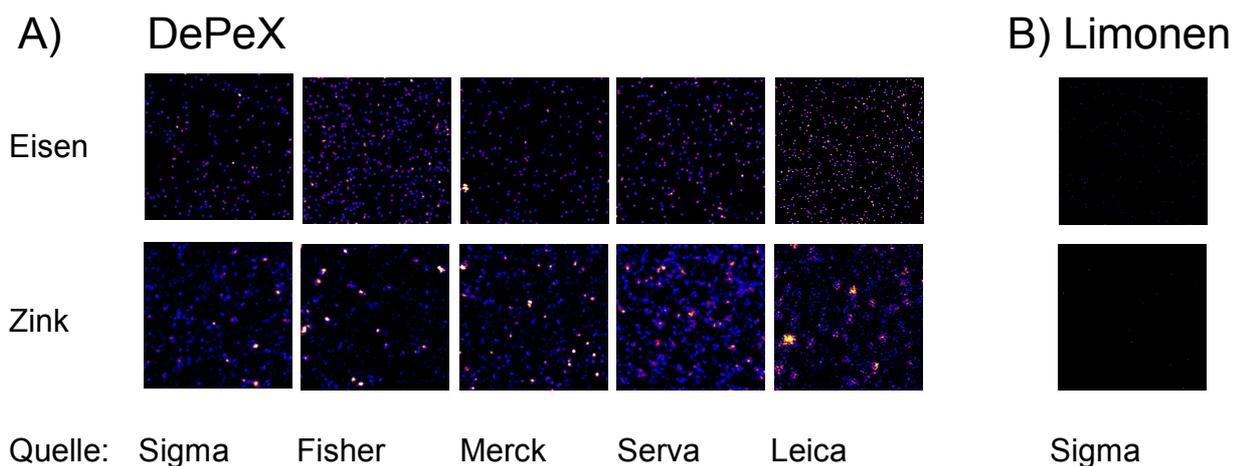


Abb 3.2.2 Verunreinigung des Träger- und Einbettmaterials mit Eisen und Zink. **A)** DePeX **B)** Limonen. Dargestellt ist jeweils Scanfeldgröße von 200 x 200 µm (Ausnahme: Probe von Leica 100 x 100 µm).

Limonen ist ein Naturstoff (Terpen), welcher hauptsächlich durch Extraktion oder Wasserdampfdestillation aus Zitrusfrüchten gewonnen wird. Der Brechungsindex von Limonen beträgt 1,47 (Vgl. DePeX 1,52) und das Schwindverhalten ist mit DePeX vergleichbar. Für die Ionenstrahlanalyse wurde Limonen im Gemisch mit Campher als Weichmacher eingesetzt, da Limonen alleine zu hart wird, um es auf den Probenhalter aufzuziehen.

DePeX ist generell frei von wesentlichen biologischen Elementen wie P, S, Cl, K und Ca. Limonen zeigt eine sehr geringe Verunreinigung mit Kalzium im einstelligen ppm-Bereich. Unabhängig vom Hersteller zeigt DePeX eine Verunreinigung mit den NP-relevanten Elementen Zink und Eisen (Abb 3.2.2). Im Vergleich zu Eisen, ist Zink in deutlich höherer Konzentration von bis zu 78 ppm präsent (Tabelle 3.2.2). Zusätzlich ist Zink in jedem untersuchten Präparat inhomogen verteilt, was als

Nachteil bei der Einzelzellanalyse angesehen werden kann.

Mit Ausnahme der DePeX Probe von Merck ist Eisen bei einer durchschnittlichen Konzentration von 2,0 ppm homogen verteilt. Die durchschnittliche Eisenkonzentration NP-unbehandelter A549-Lungen-Epithelzellen liegt bei 59 ppm. Somit spielt der Eisengehalt von DePeX bei der Analyse einzelner Alveolen eine untergeordnete Rolle. Im Vergleich zu DePeX erweist sich Limonen als zinkfrei, da nach einer Messzeit, die vergleichbar zur Einzelzellanalyse ist, der Zinkgehalt unterhalb der Nachweisgrenze lag (Tabelle 3.2.2). Bezüglich Eisen zeigt Limonen ebenfalls eine geringe Verunreinigung und ist, ebenfalls wie bei DePeX, homogen verteilt.

Tabelle 3.2.2 Quantifizierung des Eisen- und Zinkgehalts in den Trägermaterialien DePeX und Limonen.

Hersteller	Depex		Limonen	
	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)
Sigma	59	1,5	<0,5	0,9
Fisher	26	1,6		
Merck	64	2,2		
Serva	74	2,7		
Leica	78	1,4		

3.2.3 Einfluss des Puffers auf den zellulären Elementgehalt

Den Chemikalien, welche zur Probenpräparation verwendet werden, kommt eine wichtige Bedeutung bei der Ermittlung des zellulären Elementgehaltes zu. Es ist nicht auszuschließen, dass einige Komponenten u.U. an die extrazelluläre Matrix binden und dadurch die Elementkonzentration der Zelle verfälschen können.

In diesem Zusammenhang ist die Konzentration zellulärer Elemente im PBS-Puffer entscheidend, da dieser Puffer zum Abwaschen von, möglicherweise extrazellulär assoziiertem, Nanomaterial verwendet wird. PBS enthält viele zelluläre Elemente in millimolarer Konzentration: Phosphat (12 mM), Na (157 mM), K (4,7 mM), Cl (140 mM). Um den Einfluss von PBS auf den Elementgehalt zu untersuchen, wurde eine ionenfreie und isoosmotische PEG(Polyethylenglykol)-Lösung (21 Gew.-%) eingesetzt. Um den isoosmotischen Punkt der PEG-Lösung zu ermitteln wurde isotonische Kochsalzlösung mit einer Konzentration von 0,154 M als Referenz verwendet. Der osmotische

Druck (Π) für Kochsalzlösung wurde unter der Berücksichtigung eines empirischen Korrekturfaktors (k) von 1,8 mit Hilfe des Van-'t-Hoff'schen Gesetzes berechnet (Gleichung 3.2.3).

$$\Pi = k c R T \quad (3.2.3)$$

Der so ermittelte Wert von 7,14 bar für isotonische Kochsalzlösung wurde mit empirisch ermittelten Daten für der osmotischen Druck einer PEG-8000-Lösung abgeglichen¹³², um so deren isoosmotische Konzentration zu von ca. 21,0 Gewichtsprozent zu ermitteln.

Abb 3.2.3.1 zeigt den zellulären Elementgehalt in Abhängigkeit der eingesetzten Waschlösungen.

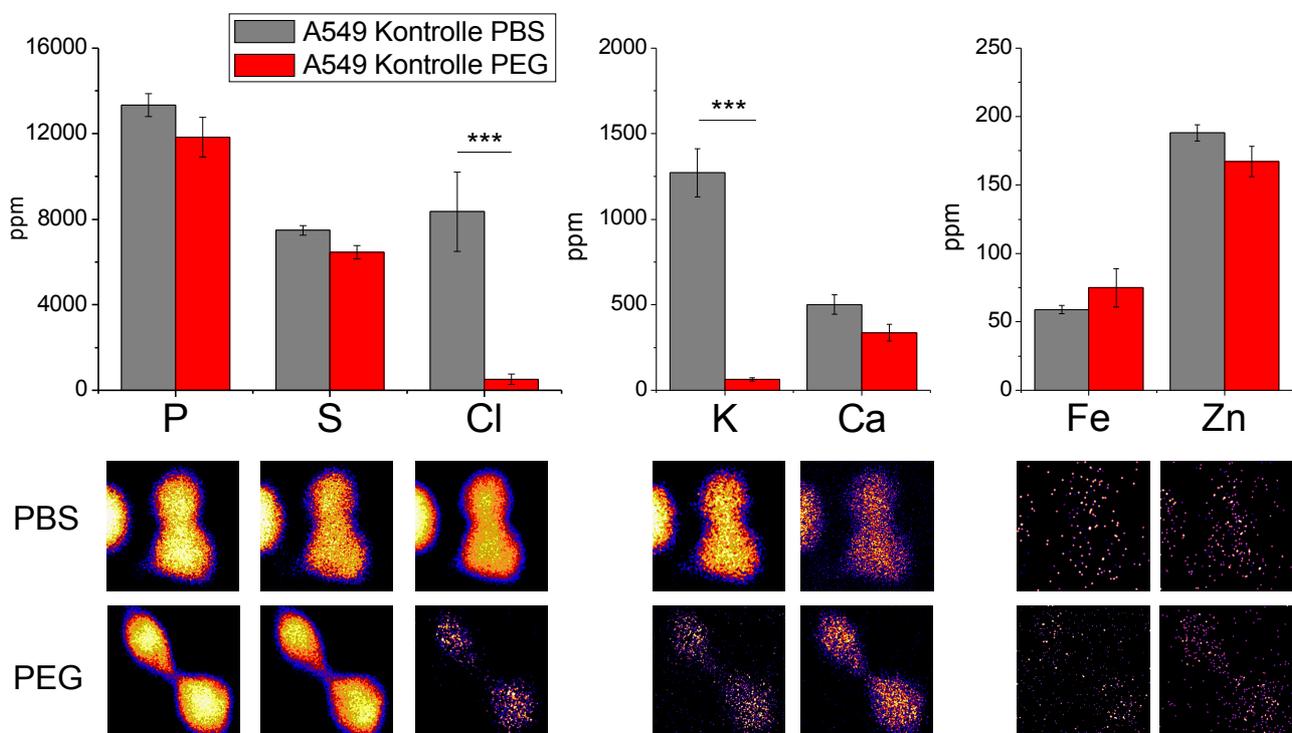


Abb. 3.2.3.1 Einfluss extrazellulärer Ionen auf den zellulären Elementgehalt. A549-Zellen wurden nach 24 Stunden Kultivierung entweder mit PBS oder ionenfreier isoosmotischer PEG-8000-Lösung fünf mal gewaschen. Alle Werte sind in $\mu\text{g/g}$ (ppm) dargestellt und repräsentieren mindestens drei unabhängige Experimente; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Beim Strukturelement Schwefel konnte nach beiden Waschprozeduren nahezu die gleiche Konzentration beobachtet werden, in PBS: 7520 ppm, in PEG: 6450 ppm. Dies liegt im Erwartungsbereich, da PBS-Puffer frei von schwefelhaltigen Verbindungen ist. Die zelluläre Phosphorkonzentration blieb nahezu gleich und zeigte keine signifikante Erhöhung durch die Behandlung mit PBS. Eine sehr starke Veränderung des zellulären Elementgehalts trat im Fall von Chlor auf, da nach der Behandlung mit PEG-8000 der Chlorgehalt ungefähr um den Faktor 15

verringert wurde (PBS: 12500 ppm, PEG: 584 ppm). Dies ist zu erwarten, da Chlor mit 140 mM, eine relativ hohe Konzentration im PBS-Puffer aufweist. Der Chlorgehalt in PBS behandelten Zellen unterlag einer relativ großen Schwankung. Durch mehrmaliges Waschen mit Methanol, konnten ähnliche Effekte auf den zellulären Elementgehalt, im Vergleich zur Behandlung mit PEG-8000, festgestellt werden.

Ein ähnlicher Effekt vergleichbarer Ausprägung konnte im Fall von Kalium beobachtet werden. (PBS: 1602 ppm, PEG: 72 ppm). Dies liegt im Erwartungsbereich, da Kalium ebenfalls ein wesentlicher Bestandteil von PBS-Puffer ist. Kalzium, zeigte bei der Behandlung mit PBS im Vergleich zu PEG-8000 eine leichte aber nicht signifikante Erhöhung.

Die Konzentrationen zellulärer Spurenelemente wie Eisen oder Zink wurden durch PBS oder PEG-8000 nicht beeinflusst. Folglich eignen sich beide Aufbereitungswege, um die zelluläre Aufnahme von beispielsweise Eisen- oder Zinkoxid NP zu studieren.

Vergleichbare Untersuchungen von Ortega et al. führten an, dass bei Nierenzellen (PC12) eine kurze Behandlung, von einigen Sekunden, mit gereinigtem deionisierten Wasser (millipore H₂O) geeignet sei, um Pufferionen wie Chlor von der Zelloberfläche zu entfernen¹³⁰. Diese Herangehensweise war nicht auf A459-Zellen übertragbar, da schon nach 1 - 2 Sekunden das Zytosol freigesetzt wurde.

Neben Chlor ist auch Natrium in relativ hoher Konzentration von 157 mM im PBS-Puffer vertreten. Natrium ist ein wesentliches physiologisches Element. Ein Na-Signal im PIXE-Spektrum war nicht zu erkennen, was bei einer Photonenenergie von 1,1 keV durch die niedrige Detektoreffizienz unterhalb von 2 keV begründet werden kann. Allerdings konnte ein Na-Signal im RBS-Spektrum zwischen 1900 und 1950 keV beobachtet werden (Abb. 3.2.3.2 A), welches eine qualitative Analyse erlaubt und nach der Behandlung mit PEG-8000 fast vollständig verschwand. Die Rückstreusignale oberhalb von 1950 keV sind den dicht beieinander liegenden physiologischen Elementen P, S, Cl und K zuzuordnen.

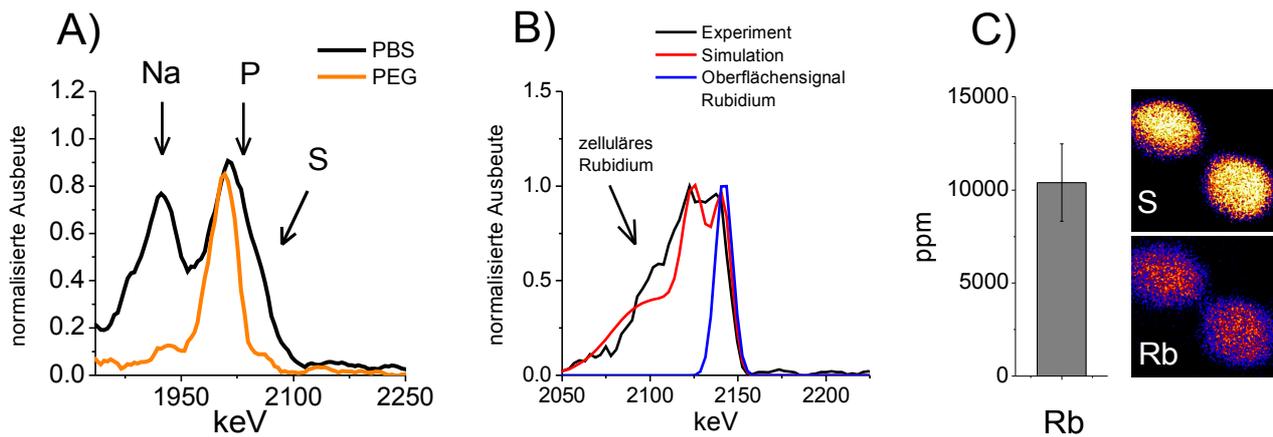


Abb. 3.2.3.2 Qualitative und quantitative Analyse extrazellulär assoziierter Ionen **A)** RBS-Studie zellulär assoziierten Natriums, welches vom PBS-Puffer stammt und durch die Röntgenfluoreszenzanalyse nur schlecht erfassbar ist **B)** Darstellung der Tiefenverteilung zellulär assoziierten Rubidiums durch Simulation des RBS-Spektrums. Zum Vergleich wurde das Oberflächensignal von Rubidium (blau) durch ein separates Experiment ohne Zelle dargestellt **C)** Quantifizierung und zweidimensionale Verteilung der zellulär assoziierten Rb-Ionen mittels Röntgenfluoreszenz-Analyse (PIXE). Die Scanfeldgröße beträgt $25 \times 25 \mu\text{m}$ und es ist der Mittelwert und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Um die mögliche Assoziation extrazellulärer Elemente aus der Waschlösung näher zu charakterisieren, wurde Rubidium als Marker-Element verwendet. Dabei ist es möglich, dass zelluläres Natrium oder Kalium durch Rubidium ersetzt wird¹³³.

Das Rückstreusignal zwischen 2100 und 2200 keV konnte eindeutig Rubidium zugeordnet werden, da oberhalb von 2100 keV keine Rückstreuung von biologischen Elementen vorhanden ist (Abb. 3.2.3.2 B). Um das zelluläre Rubidium-Signal mit dem isolierten Rubidium-Oberflächensignal im RBS-Spektrum zu vergleichen wurde eine separat präparierte RbCl_2 -Folie als Referenz untersucht (Abb. 3.2.3.2 B). Dazu wurde eine RbCl_2 -Lösung geringer Konzentration tropfenweise auf Polypropylenfolie aufgebracht und luftgetrocknet. Durch den Vergleich mit dem Oberflächensignal konnte festgestellt werden, dass sich das Rubidium sowohl an der Zelloberfläche als auch innerhalb der Zelle befindet (Abb. 3.2.3.2 C).

Die zelluläre Konzentration von Rubidium betrug ungefähr 10000 ppm. Diese Konzentration liegt nah am Wert des assoziierten Chlors (8800 ppm) sowie im Konzentrationsbereich der zellulären Strukturelemente Phosphor (12000 ppm) und Schwefel (7000 ppm).

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass lösliche Elemente durch die Waschprozedur stark beeinflusst werden können. In der Ionenstrahlmikroskopie werden nur gebundene Ionen, wie z.B. Gegenionen, quantifiziert, Ionen welche durch die Präparation aus der Zelle gewaschen werden sind nicht erfassbar.

3.3 Zellulärer Elementgehalt von Lungenepithelzellen

3.3.1 Allgemeiner Nachweis der Elementverteilung

Die Aufnahme und Quantifizierung von Metalloxid-Nanopartikeln wurde unter Verwendung von Lungenzellen unterschiedlicher Herkunft durchgeführt. Zur routinemäßigen Untersuchung isolierter Einzelzellen kamen A549-Zellen zum Einsatz. Um den natürlichen Bedingungen bei der Aufnahme von NP in Lungenepithelzellen Rechnung zu tragen wurden in Kooperation mit Prof. H. Wirtz und Dr. H. Kuhn der Abteilung für Pneumologie (Universität Leipzig) gedehnte primäre AT-II-Zellen der Ratte eingesetzt. Zur Untersuchung der NP-Aufnahme in Lungengewebe kam in Kooperation mit Dr. Søren T. Larsen vom National Research Centre for the Working Environment in Kopenhagen, Lungengewebe der Maus zum Einsatz, welches mit TiO_2 - bzw. ZnO -Aerosol exponiert wurde.

Die Berechnung der zellulären Konzentration erfolgte, indem die Daten der Proton-induzierten Röntgenemission (PIXE) mit den Daten der Rückstreuanalyse (RBS) kombiniert wurden. Im PIXE-Spektrum ist die Signalintensität des jeweiligen Elements proportional zu dessen Konzentration und die Rückstreuanalyse liefert die Informationen bezüglich der zellulären Dicke, Komposition und Ladung.

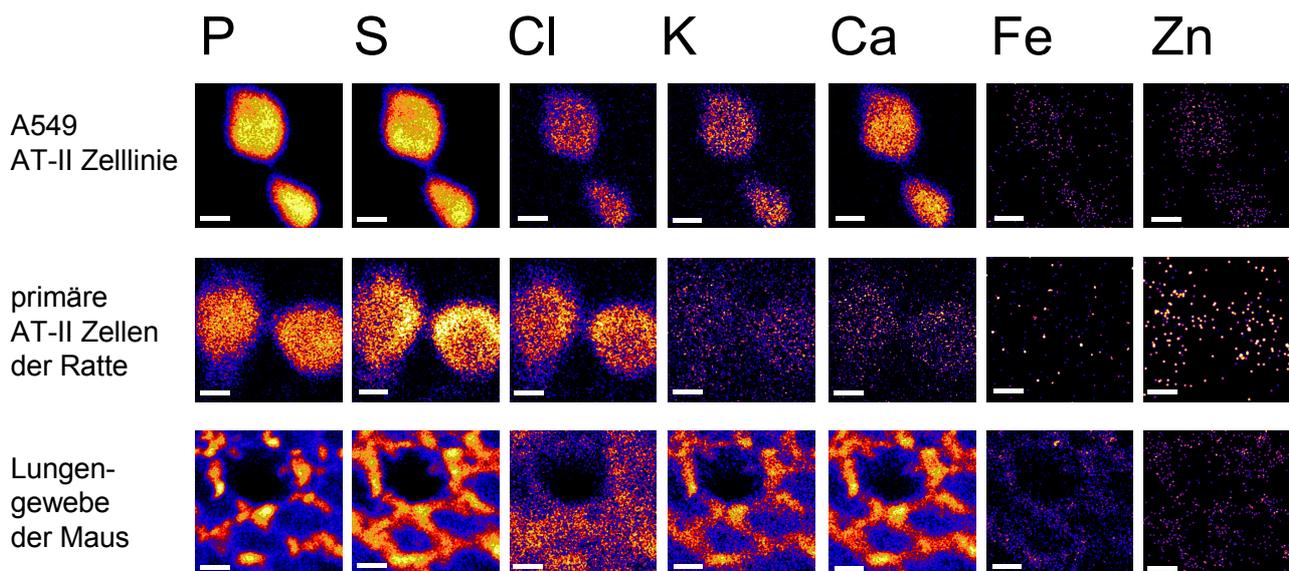


Abb 3.3.1 Ortsaufgelöster Nachweis physiologisch relevanter Elemente in Lungenzellen- und Gewebe. Der Balken repräsentiert jeweils 5 μm für A549- und Rattenzellen sowie 10 μm für das Lungengewebe.

Abb. 3.3.1 zeigt die orts aufgelöste Einzelzellanalyse von P, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn in drei verschiedenen Lungenzelltypen: primäre AT-II Zellen der Ratte, A549-Zelllinie und Lungengewebe der Maus. In allen Zelltypen konnten Schwefel und Phosphor als die Elemente mit der höchsten Konzentration identifiziert werden (Abb. 3.3.1). Dies ist zu erwarten, da sie wesentliche strukturgebende Funktionen innerhalb der Zelle erfüllen. Phosphor kommt in DNA und sowie Phospholipiden vor und Schwefel befindet sich in den Proteine des Zytoskeletts. Auf Grund dieser Eigenschaften ist z.B. Schwefel prädestiniert, als interner zellulärer Standard eingesetzt zu werden⁴⁵.

Im Fall von Lungengewebe konnte generell eine erhöhte Schwefelkonzentration an der Grenzschicht zur Luft in der terminalen Bronchiole beobachtet werden. Dies ist auf den Mukus in der Lunge zurückzuführen. Dieser besteht hauptsächlich aus Proteinen die zur Gruppe der Mucine gehören und Sialyl- bzw. Sulfatgruppen tragen.

3.3.2 Elementgehalt von primären AT-II-Zellen in Abhängigkeit der Dehnung

Während der Atmung dehnen sich die Lungenzellen, was bei jedem Atemzyklus die Oberfläche der Zelle vergrößert. Zusätzlich werden AT-II-Zellen durch mechanische Dehnung dazu stimuliert stimuliert, Surfactant freizusetzen¹³⁴.

Um die Atmung nachzustellen werden Apparaturen eingesetzt, welche die Dehnung des Substrates zyklisch steuern können. Aus diesem Grund erfolgte, in Zusammenarbeit mit Prof. Wirtz, Dr. Kuhn und Markus Buschner von der Abteilung für Pneumologie, die Kultivierung der Lungenzellen in einer speziellen Apparatur zur Dehnung des Substratbodens. Abb. 3.3.2 zeigt den zellulären Elementgehalt unbehandelter primärer AT-II-Zellen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dehnungsstufen.

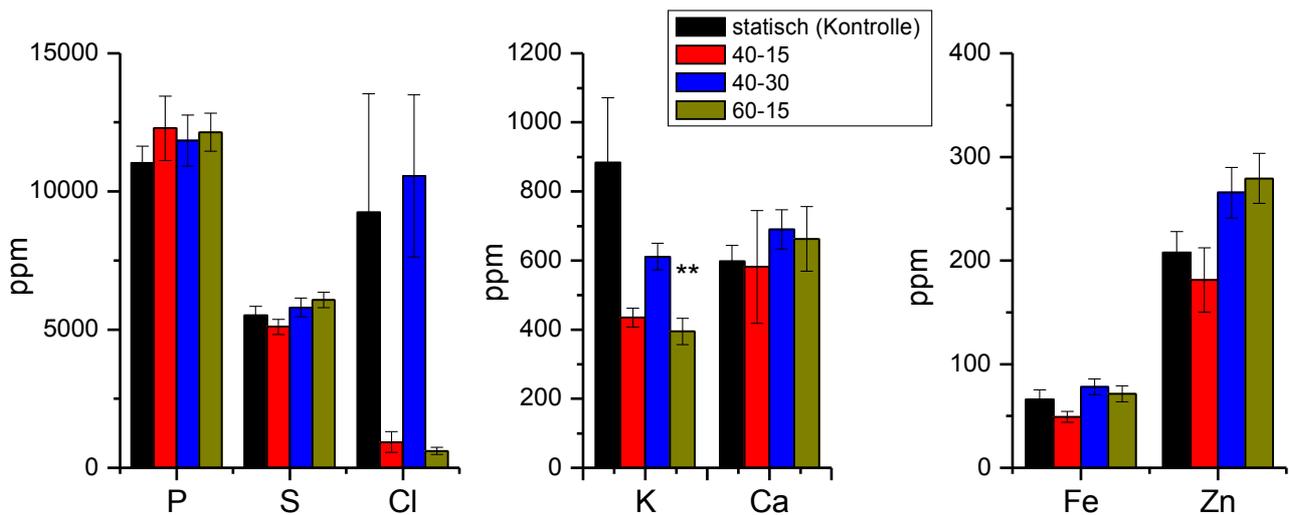


Abb. 3.3.2 Elementgehalte von primären AT-II-Zellen nach Einfluss eines mechanische Stimulus (Dehnung). Die Zellen wurden auf einer Dehnfolie auf Siliziumbasis kultiviert und für 24 Stunden einer Dehnprozedur mit zwei unterschiedlichen Frequenzen (40 bzw. 60 min^{-1}) unterzogen. Die Angabe -15 oder -30 bezieht sich dabei auf die prozentuale Oberflächenänderung der Kulturfläche. Dargestellt sind $n > 3$ Experimente (Ratten); * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$;

Im Experiment erfolgte die Dehnung der Zellen mit Hilfe von Fibronectin beschichteter Dehnfolie auf Siliziumbasis. Es stellte sich heraus, dass die Einzelzellanalyse direkt auf der Dehnfolie mittels Ionenstahlanalyse nicht möglich war. Der Grund hierfür ist die Aufladung der Probe, welche oft nach wenigen Minuten Messzeit eintrat. Bei einer Aufladung treten die Inzidenzteilchen zusätzlich mit in der Probe deponierten Protonen in Wechselwirkung und verfälschen so den Messwert für die Ladung, welcher für die exakte Konzentrationsbestimmung essentiell ist. Deshalb wurden die Zellen vor der Messung, durch Trypsinierung, auf Polypropylenfolie übertragen.

Hinsichtlich der Strukturelemente Phosphor und Schwefel konnte beobachtet werden, dass die Dehnung keinen Einfluss auf deren Konzentration zeigt (Abb. 3.3.2). Die Phosphorkonzentration befindet sich auf einem Niveau von 12000 ppm und die Schwefelkonzentration liegt in einem Bereich von 5500 ppm. Bezüglich der mengenmäßig gering vertretenen Spurenelemente Eisen und Zink, konnte im Fall von Zink eine Tendenz zu erhöhten Werten bei höheren Atmungsfrequenzen (60-15) sowie tieferer Atmung (40-30) festgestellt werden. Gleichzeitig wurde von M. Buschner gezeigt, dass bei den intensiveren Dehnungsmodi 40-30 und 60-15 der Anteil von apoptotischen Zellen zunimmt. Der Kalzium- und Eisengehalt blieb durch die Dehnung auf einem Niveau von 600 bzw. 70 ppm und zeigte keine signifikante Veränderung im Vergleich zu statisch kultivierten Kontrollzellen. Da die Elemente Kalium und Chlor im Waschpuffer vorhanden sind kann, wie bereits gezeigt, deren zelluläre Konzentration durch die Probenpräparation stark schwanken.

3.3.3 Nanopartikel im biologischen Milieu

Die Eigenschaften und somit die Toxizität von NP sind wesentlich durch deren Oberflächenstruktur definiert. Durch Kontakt mit einer biologischen Umgebung können die physikochemischen Eigenschaften der Partikeloberfläche so modifiziert werden, dass die zelluläre Aufnahme der Partikel beschleunigt oder verlangsamt werden kann. Ionen können durch Adsorption eine Hülle auf dem NP formen und so die Gesamtladung des Partikels modifizieren. Dieser Effekt ist durch das Zeta-Potential quantifizierbar. Das Ausmaß, mit dem Liganden auf die Partikeloberfläche adsorbieren, kann die Aggregation und somit die Größe der applizierten Partikel bestimmen. Im biologischen Milieu spielen vor allem Proteine und Peptide eine wichtige Rolle bei der Modifizierung der NP-Oberfläche. Als wichtiges Molekül ist hier Albumin zu nennen. Es wird diskutiert, dass die Adsorption von Albumin auf die Nanopartikel Oberfläche die endozytotische Aufnahme beschleunigen kann¹³⁵.

Die Metalloxid-NP ZnO, CeO₂, TiO₂, Fe₂O₃ und Al₂O₃ wurden mit der Ionenstrahlmikroskopie bezüglich der Kollokalisierung mit Elementen des Kulturmediums beim Austrocknen untersucht. Als Kontrolle wurden die angegebenen Partikel in Millipore-Wasser analysiert. Im Kulturmedium und unabhängig von der Anwesenheit der Proteinkorona waren ZnO- und CeO₂-NP mit den Elementen Phosphor und Kalzium kollokalisiert (Abb. 3.3.3.1). Das gleiche Phänomen konnte, bei einer deutlich niedrigeren Kalziumkonzentration, in Gegenwart von PBS-Puffer beobachtet werden. Bei zellulär internalisierten ZnO-NP konnte ebenfalls eine zelluläre Kollokalisierung von ZnO-NP mit Phosphor und Kalzium beobachtet werden. Im Falle von TiO₂, Fe₃O₄, CeO₂, oder Al₂O₃ konnte keine Kollokalisierung mit Phosphor und Kalzium oder anderen Elementen beobachtet werden. Zur näheren Analyse der Kollokalisierung wurde die Intensität der Signalausbeute in einer region-of-interest (grün) in einem Koordinatensystem dargestellt (Abb. Abb. 3.3.3.1).

Die quantitative Auswertung der NP und ihrer assoziierten Elemente ist in Abhängigkeit der Proteinkorona in Abb 3.3.3.2 dargestellt. Zur Auswertung wurden die Konzentrationen der assoziierten Elemente Kalzium und Phosphor auf die Konzentration von Zink bzw. Cerium normiert. In unmittelbarer Nähe von ZnO-NP ist der Elementgehalt von P und Ca unabhängig von der Proteinkorona bis um den Faktor 2,5 größer. Bei CeO₂-NP zeigt die Konzentration der kollokalisierten Elemente eine schwache Abhängigkeit von der Proteinkorona. In Anwesenheit dieser zeigt sich die Tendenz zu einer höheren Konzentration von Phosphor und in Abwesenheit der Proteinkorona ist eine geringere Kalziumkonzentration als in Anwesenheit zu beobachten.

Wie auch in anderen Untersuchungen gezeigt wurde^{136 137,138}

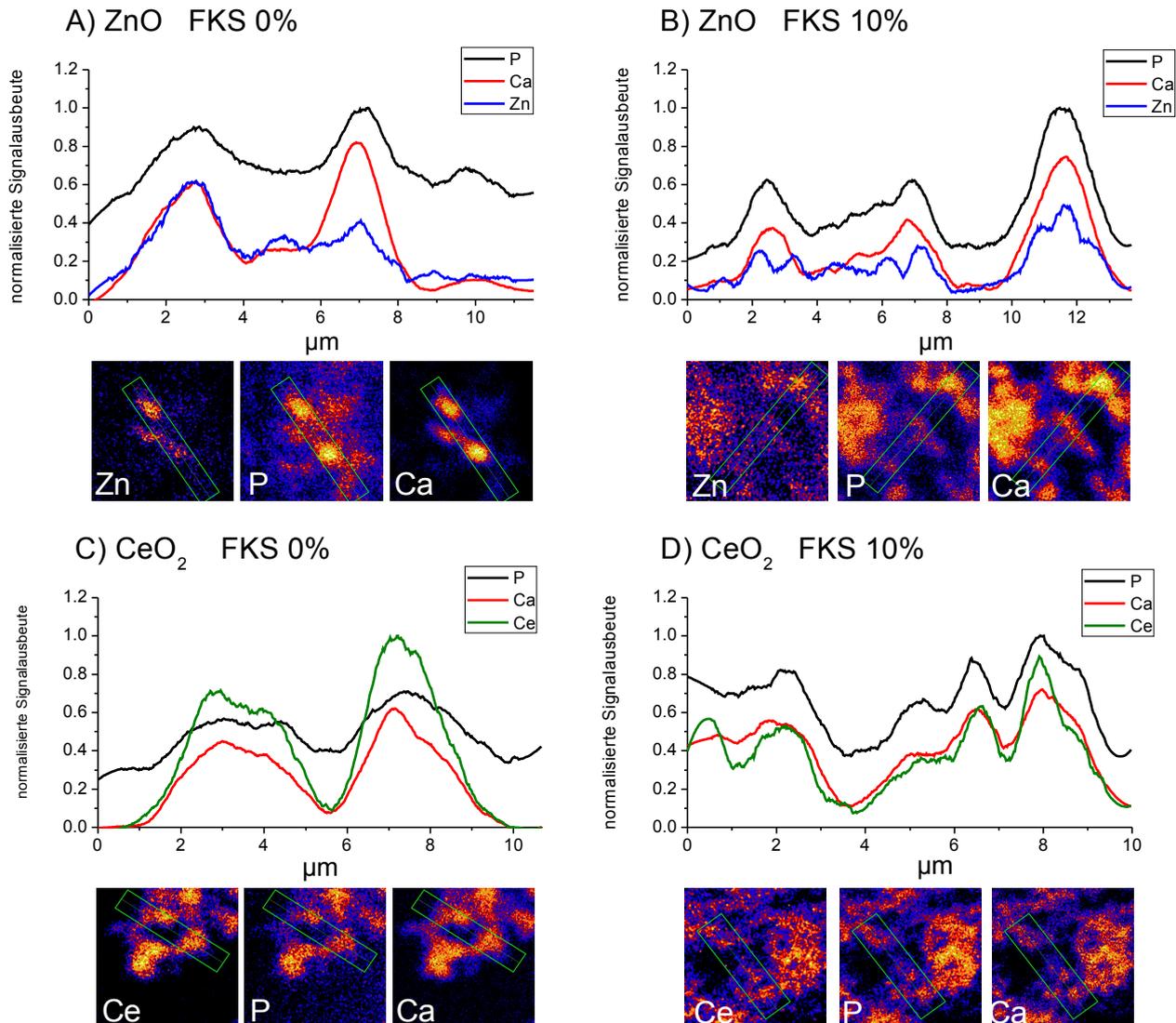


Abb. 3.3.3.1 In biologischen Medien sind die Nanopartikel ZnO (A & B) und CeO₂ (C & D) mit Phosphor und Kalzium vergesellschaftet. Die Nanopartikel wurden jeweils bei 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 24 h in Kulturmedium (RPMI 1640) in Gegenwart (FKS 10%) oder Abwesenheit einer Proteinkorona (0% FKS) bei 37° inkubiert. Dargestellt sind jeweils die PIXE-Element-Maps bei einer Scanfeldgröße von je 12,5 x 12,5 μm . Der grüne Bereich (ROI) ist im Koordinatensystem als Konzentrationsprofil über den PIXE-Abbildungen dargestellt, und repräsentiert die ortsauflöste Intensitätsverteilung des jeweiligen Elements in der ROI.

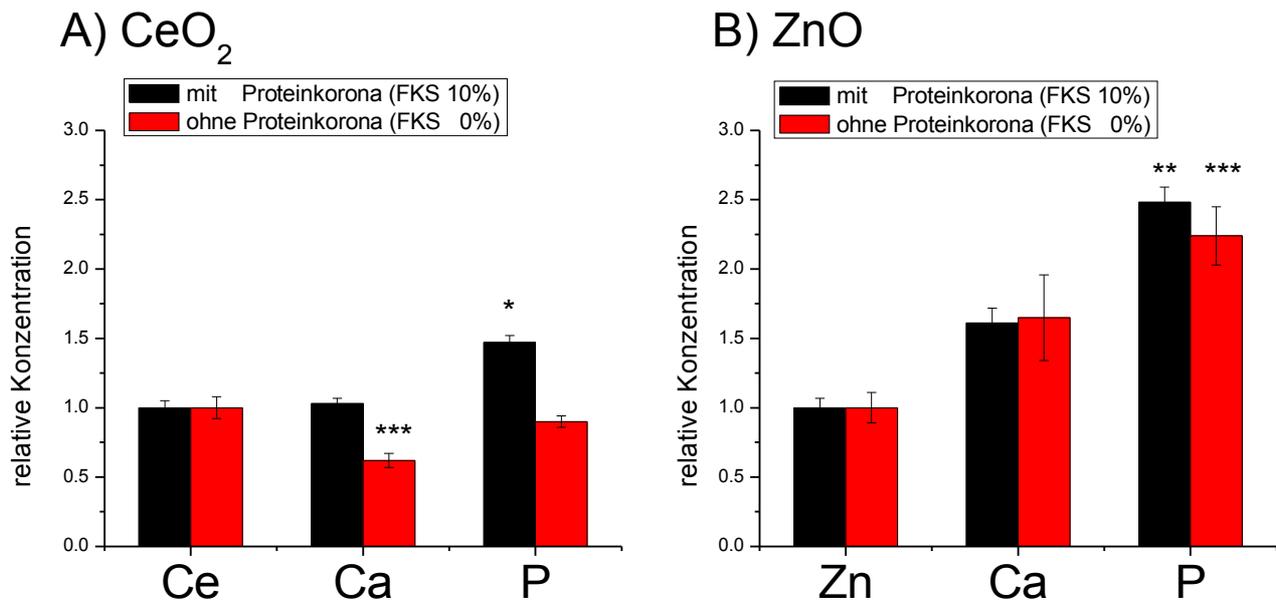


Abb. 3.3.3.2 Quantitative Beziehung zwischen den Nanopartikeln CeO₂ und ZnO und den mit diesen NP kolokalisierten Elementen Kalzium und Phosphor. Die Konzentrationen von Kalzium und Phosphor wurden jeweils auf die Konzentration des NP (CeO₂ oder ZnO) normalisiert und Abhängigkeit der Proteinkorona dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert und Standardfehler von mindestens 5 unterschiedlichen ROI einer Messung.

3.4 Quantifizierung und Aufnahme von NP in Lungenzellen

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Aufnahme von Al₂O₃, TiO₂, CeO₂, Fe₂O₃, und ZnO quantifiziert. Aus verschiedenen Gründen wurde dabei die Aufnahme von CeO₂- und ZnO-NP näher untersucht. CeO₂-NP sind für Lungenzellen in geringem Maße toxisch¹⁸ und werden in relativ großer Menge sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit einer Protein-Korona von A549-Zellen aufgenommen. Aus diesen Gründen eignen sich CeO₂-NP sehr gut, den Aufnahmemechanismus von NP näher zu studieren. In diesem Zusammenhang ist die Endozytose wohl die bekannteste Art der zellulären NP-Aufnahme^{139 140}. Daneben ist denkbar, dass durch eine außerordentlich hohe extrazelluläre Konzentration bedingt, kleine NP durch die Zellmembran diffundieren können¹⁴¹.

Ähnlich wie CeO₂ ist ZnO ein NP von großen Interesse, da ZnO-NP von Lungen-Epithelzellen ebenfalls stark aufgenommen wurden. Daneben wird ZnO in ähnlich kommerziellen Maßstab mit breiten Anwendungsspektrum eingesetzt wie TiO₂ und zeigte, von allen in dieser Arbeit untersuchten Partikeln, den stärksten toxischen Effekt. Die ionenstrahlanalytische Untersuchung nach ZnO-Exposition bietet den Vorteil gleichzeitig den Elementgehalt anderer physiologisch wichtiger Elemente zu bestimmen zu können. Diese Herangehensweise kann einen Beitrag leisten, die von ZnO vermittelte Toxizität besser zu verstehen, da dieser Mechanismus bisher nicht komplett

verstanden ist¹⁴². Besonders der Schwefelgehalt kann hier eine zentrale Rolle spielen, da der zelluläre Zink-Stoffwechsel eng mit Sulfhydrylgruppen in Verbindung steht^{143 144}.

3.4.1 Ortsaufgelöste Quantifizierung von Metalloxid-NP in A549-Zellen

Abb. 3.4.1.1 zeigt, dass die charakteristische Röntgenstrahlung für alle zellulären Elemente und Metalloxid-Nanopartikel in einem Bereich zwischen 1 und 10 keV detektiert werden konnte. Mit Ausnahme von Cerium, welches durch einen Peak-Komplex bestehend aus $L\alpha$, $L\beta$ und $L\gamma$ gekennzeichnet war, wurden alle Elemente über die $K\alpha$ - und $K\beta$ -Linie identifiziert. Die Fläche unter der roten Linie repräsentiert den Bremsstrahlungsuntergrund, welcher die elektromagnetische Strahlung repräsentiert, die entsteht wenn ein geladenes Teilchen in Materie abgebremst wird. Die Peak-Fläche oberhalb der roten Linie ist für jedes Element spezifisch und proportional zu dessen Konzentration in der Probe.

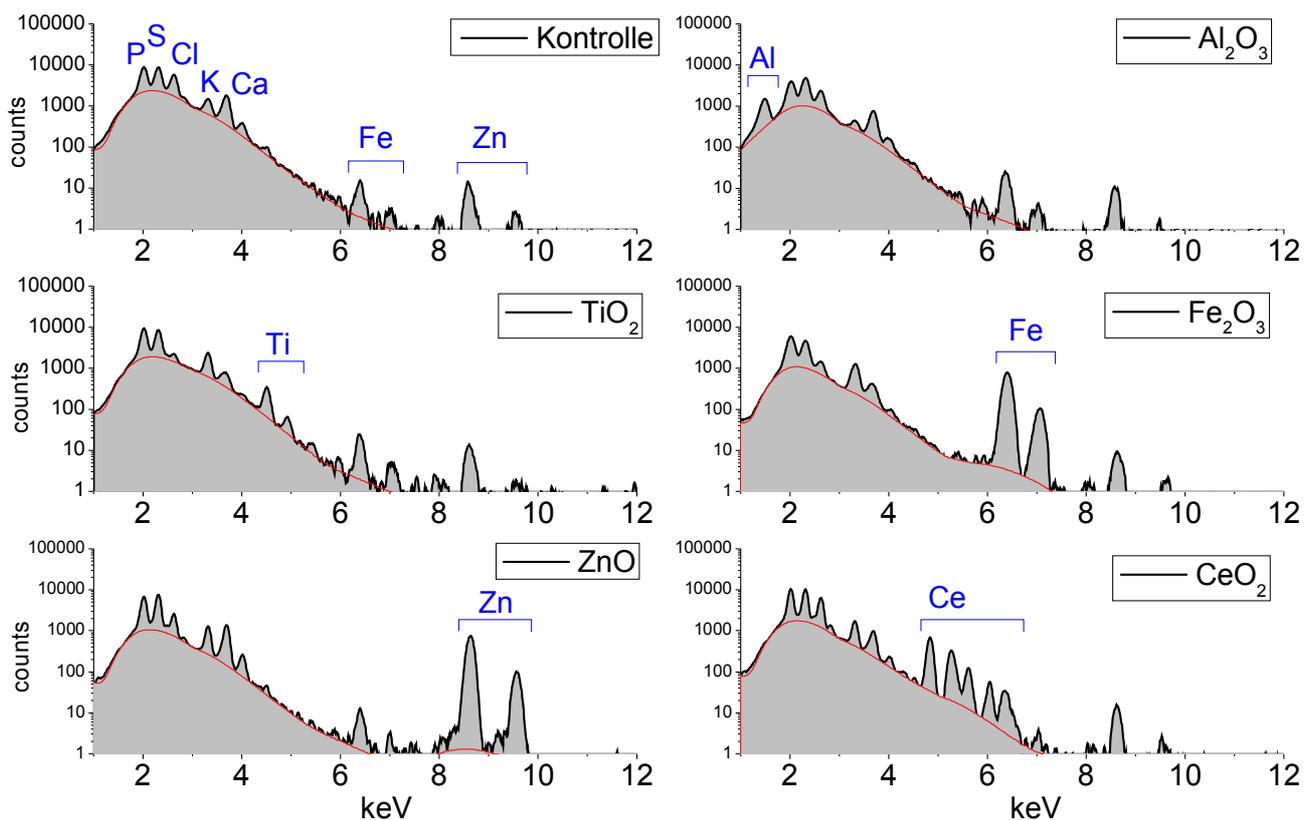


Abb 3.4.1.1 Typische PIXE-Spektren zur zellulären Quantifizierung der Metalloxid-NP Al_2O_3 , TiO_2 , Fe_2O_3 , ZnO und CeO_2 in Lungenzellen. Die NP-Exposition erfolgte in A549-Zellen für jeweils 48 h bei $30 \mu g/ml$ in Gegenwart von 10% bzw. 0% FKS. Die Fläche unterhalb der roten Linie repräsentiert den durch verlangsamte Protonen verursachten Bremsstrahlungs-Untergrund.

Bei den zellulären Elementen ist eine Überlappung zwischen Kalium $K\beta$ und Calcium $K\alpha$ zu beobachten. Eine Signalüberlappung von zellulären Elementen und NP ist auch bei TiO_2 und CeO_2 zu beobachten. Beispielsweise überlappt die L-Linie von Cerium mit der $K\alpha$ -Linie von Eisen. Allerdings ist $K\beta$ -Linie von Eisen als isoliertes Signal detektierbar, weshalb die Ermittlung der zellulären Eisen-Konzentration nicht durch die CeO_2 -Aufnahme beeinträchtigt wird. Ähnliches gilt für die $K\alpha$ -Linie von Titan und die $K\beta$ -Linie des zellulären Kalziums.

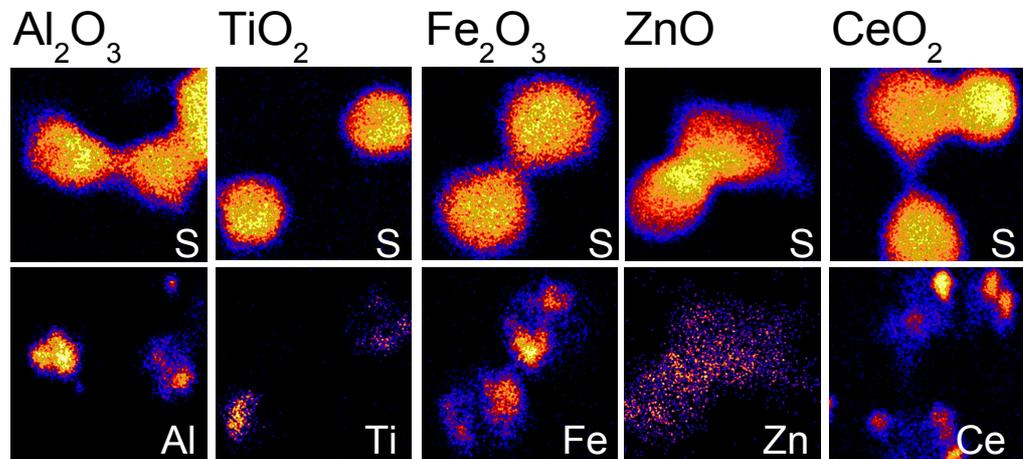
Beim Nachweis des Aluminium-Signals war eine Asymmetrie des peaks zu beobachten. Die Ursache hierfür, ist die geringe Detektoreffizienz unterhalb von 2 keV.

Proton-induzierte Röntgenemission (PIXE) und die Rutherford Rückstreu-Spektroskopie (RBS) wurden in Kombination eingesetzt, um die orts aufgelöste Elementverteilung- und Konzentration Metalloxid-NP behandelter Lungen-Epithelzellen darzustellen. Abb. 3.4.1.2 zeigt PIXE-element-maps von Zellen die mit den Metalloxid-NP Al_2O_3 , TiO_2 , Fe_2O_3 , ZnO , und CeO_2 bei einer einheitlichen Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ für 48 Stunden ausgesetzt waren. Die obere Reihe zeigt die Schwefelverteilung, da Schwefel neben Phosphor als Strukturelement verwendet werden kann, um eine einzelne Zelle zu identifizieren. Im Allgemeinen überlappt die Position der Zelle mit der Position des NP, wobei die intrazelluläre Verteilung letzterer zwischen einzelnen Zellen stark variieren kann. In der darunterliegenden Tabelle sind die Mittelwerte der zellulären NP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Da die Elemente Aluminium, Titan und Cerium in Kontrollzellen nicht vorkommen, wurde deren Konzentration mit 0 ppm angegeben. Die Ortsauflösung der zellulären Elementverteilung liegt im Bereich von einem Mikrometer, weshalb subzelluläre Strukturen, wie z.B. Zellorganellen oder Vesikel, nur schwer auflösbar sind. Die zelluläre Konzentration der NP ist in ppm ($\mu\text{g/g}$) Trockengewicht angegeben und bezieht sich jeweils auf eine isolierte Einzelzelle. Die An- oder Abwesenheit einer Proteinkorona ist durch einen FKS-Gehalt von zehn oder null Prozent angegeben.

Im Allgemeinen zeigt sich der Trend, dass Partikel mit Protein-Korona in geringerer Menge in die Zelle aufgenommen werden (Abb. 3.4.1.2). Die höchste Konzentration aller untersuchten Partikel von 120000 ppm wurde bei ZnO in Abwesenheit einer Protein-Korona festgestellt, während die niedrigste Konzentration von 470 ppm bei TiO_2 in Anwesenheit einer Protein-Korona beobachtet wurde. Der größte Unterschied bezüglich der Protein-Korona wurde im Fall von TiO_2 gemessen, ungefähr 470 ppm in Anwesenheit von FKS und 66000 ppm in Abwesenheit von FKS. Der kleinste Unterschied trat bei CeO_2 -NP auf. In Anwesenheit von FKS waren 19000 ppm und in Abwesenheit von FKS 34000 ppm zu beobachten. ZnO führte zu einer 61-fachen Erhöhung der zellulären Zink-Konzentration und der zelluläre Eisengehalt stieg durch die Exposition mit Fe_2O_3 -NP um das 74-

fache an.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Protein-Korona und die spezifischen Eigenschaften eines Partikels eine große Rolle bei der zellulären Aufnahme spielen.



	Al_2O_3	TiO_2	Fe_2O_3	ZnO	CeO_2
NP-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	30	30	30	30	30
Kontrollzellen (ppm)	0	0	59	188	0
behandelte Zellen (ppm):					
NP (FKS 10 %)	15960	469	4284	11425	19142
NP (FKS 0 %)	40223	66078	48028	119888	34002

Abb3.4.1.2 Ortsaufgelöste Elementquantifizierung von einzelnen Lungen-Epithelzellen (A549) welche mit verschiedenen Metalloxid-NP behandelt wurden. Die Exposition erfolgte jeweils für 48 h bei jeweils 30 $\mu\text{g/ml}$ in Anwesenheit (FKS 10%) oder Abwesenheit (FKS 0%) einer Proteinkorona. Schwefel wurde in der oberen Reihe als Zellmarker verwendet und jedes Element-map repräsentiert eine Fläche von 50 x 50 μm . In der Falschfarbencodierung entspricht hellgelb der höchsten und schwarz der niedrigsten Konzentration. Das Verhältnis von Applikationsvolumen zur Probenoberfläche war jeweils 0,208 ml/cm^2 . Gezeigt ist der Mittelwert von mindestens n = 10 Einzelzellen.

3.4.2 CeO_2

3.4.2.1 Kinetik und Dosisabhängigkeit der CeO_2 -NP Aufnahme

Der genaue Mechanismus der NP Aufnahme ist komplex und nicht vollständig verstanden. Im Allgemeinen ist eine endozytotische Aufnahme der NP zu erwarten. Allerdings wird diskutiert, dass NP auch direkt durch die Plasmamembran hindurchtreten können¹⁴⁵. Deshalb wurde die Aufnahme zeitabhängig verfolgt.

Die CeO_2 -Aufnahme wurde über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden in Gegenwart einer

Proteinkorona untersucht. Nach 24 und 48 Stunden war jeweils die höchste Konzentration von ungefähr 12000 ppm zu beobachten, was eine Sättigung der CeO_2 -Aufnahme vermuten lässt.

Nach 72 Stunden trat ein signifikanter Abfall der CeO_2 -Konzentration auf ca. 5000 ppm ein, welcher sich deutlich unterhalb der Konzentration von ca. 12000 ppm befindet, die nach 24 Stunden gemessen wurde. (Abb 3.4.2.1.1 A). Da CeO_2 -NP tendenziell ein geringes Toxizitätspotential zeigen, ist der Grund für die Abnahme höchstwahrscheinlich in der Exozytose der Partikel zu suchen. Allerdings kann sich die CeO_2 -Konzentration einzelner Zellen durch die Zellteilung ebenfalls halbieren.

In Bezug auf zelluläre Elemente war eine leichte, allerdings nicht signifikante Abnahme, der Schwefelkonzentration mit zunehmender Expositionszeit detektierbar (Abb 3.4.2.1.1 B). Phosphor zeigte den stärksten Abfall nach 72h Expositionszeit, indem die Konzentration von 13000 ppm auf 9500 ppm abfiel. Nach 24 bzw. 72 Stunden tritt durch die CeO_2 -Aufnahme eine leichte Abnahme des zellulären Kalzium- und Zinkgehalts ein. Dies zeigt, dass die CeO_2 -Aufnahme die zelluläre Homöostase von Kalzium und Zink beeinflusst.

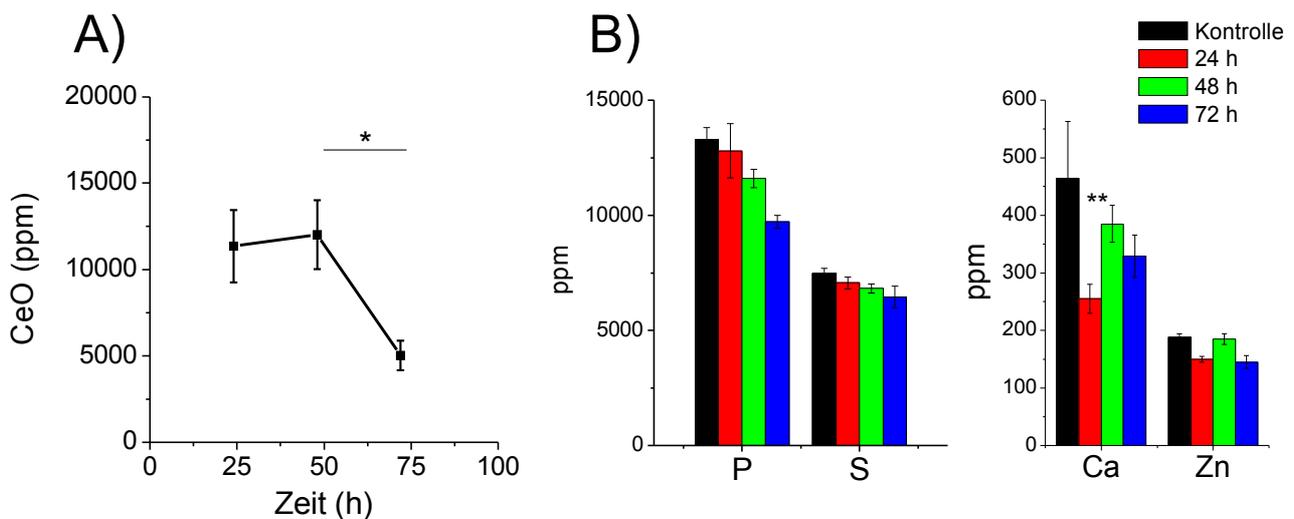


Abb 3.4.2.1.1 Kinetisches Verhalten der CeO_2 -Aufnahme in Lungen-Epithelzellen (A549). Die NP Exposition erfolgte jeweils bei einer Dosis von 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CeO_2 für 24, 48 oder 72 Stunden in Anwesenheit von 10% FKS. Dargestellt sind die Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten unter Berücksichtigung des Standardfehlers; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. **A)** Zelluläre CeO_2 -Konzentration in Abhängigkeit der Zeit **B)** Veränderung der Konzentration zellulärer Struktur- und Spurenelemente nach CeO_2 -Exposition. Das Verhältnis von Applikationsvolumen zur Probenoberfläche war jeweils 0,104 ml/cm^2 . Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. Signifikanzen sind im Vergleich zu CeO_2 -NP unbehandelten Kontrollzellen angegeben: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

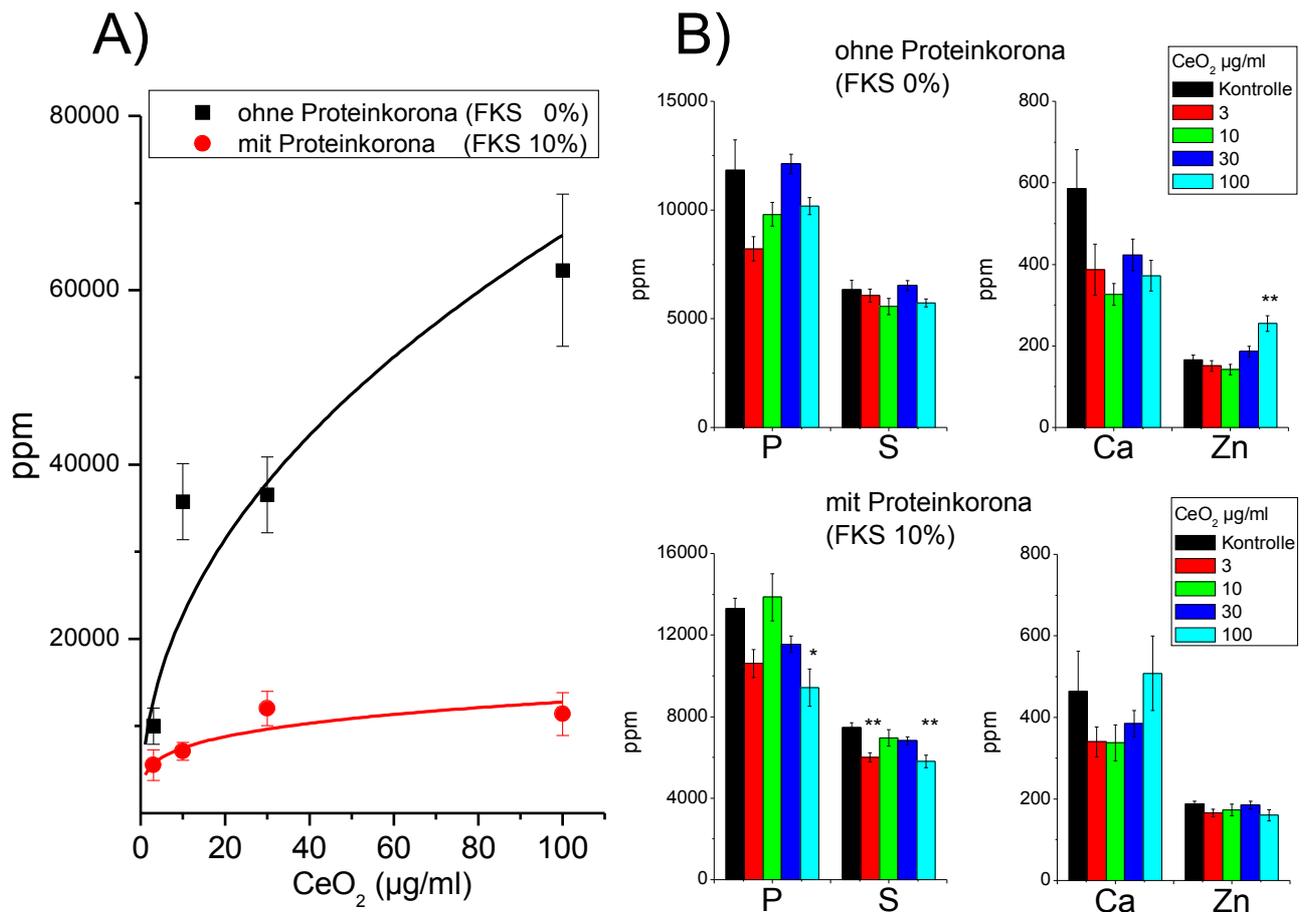


Abb 3.4.2.1.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme von CeO_2 -NP in A549-Lungen-Epithelzellen. Die NP Exposition erfolgte für jeweils 48 h bei einer Dosis von 3, 30 oder 100 $\mu\text{g/ml}$ CeO_2 in Anwesenheit (10 %) oder Abwesenheit (0 %) von FKS. Dargestellt sind die Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten unter Berücksichtigung des Standardfehlers; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. **A)** Zelluläre CeO_2 -Konzentration in Abhängigkeit der NP-Dosis **B)** Veränderung der Konzentration zellulärer Struktur- und Spurenelemente nach CeO_2 -Exposition. Das Verhältnis von Applikationsvolumen zur Probenoberfläche war jeweils 0,104 ml/cm². Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. Signifikanzen sind im Vergleich zu CeO_2 -NP-unbehandelten Kontrollzellen angegeben: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Die konzentrationsabhängige Aufnahme wurde nach Applikation von 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{g/ml}$ CeO_2 -NP in Ab- und Anwesenheit einer Proteinkorona untersucht. Generell wurde in Abwesenheit dieser eine vier- bis sechsfach höhere Menge an Cerium aufgenommen (Abb 3.4.2.1.2 A) und der Sättigungsbereich zeichnete sich bei höheren Dosen ab.

Die zellulären CeO_2 -Konzentration zeigt eine relativ große Schwankung, wenn die Partikel keine Proteinkorona tragen. Dies kann durch die stabilisierende Wirkung der Proteinhülle auf die Partikelgröße begründet sein. Wenn die CeO_2 -Partikel keine Proteinhülle tragen ist eine unterschiedliche Ausprägung der Partikelgröße zu beobachten*, wodurch die Menge des aufgenommenen Cerium stark schwanken kann.

* Dissertation Jana Fleddermann

In Anwesenheit der Protein-Korona steigt die zelluläre CeO_2 -Konzentration bis zu einer Dosis 30 $\mu\text{g/ml}$ stark an und geht bei 12000 ppm in einen deutlichen Sättigungsbereich über. Die Stagnation der Aufnahme, besonders in Gegenwart von Serum, korreliert mit dem Ergebnis aus Abb 3.4.2.1.1 A), welches eine Exocytose der CeO_2 -NP nahelegt.

Unabhängig von der Proteinkorona konnte durch die CeO_2 -Aufnahme die Tendenz zur Abnahme der zellulären Konzentration von Phosphor und Kalzium beobachtet werden.

3.4.2.2 Aufnahmemechanismus von CeO_2 -NP

Die Klärung des Aufnahmemechanismus kann beispielsweise Aufschlüsse über das Ziel intrazellulärer Stoffwechselwege der Nanopartikel geben und so dazu beitragen deren physiologische Effekte und Risiken besser abschätzen zu können. Daneben kann die Kenntnis des Aufnahmemechanismus für die gezielte Wirkstoffapplikation (drug delivery) und somit beim Design neuer Medikamente auf Nanosphären-Basis hilfreich sein.

Die Aufnahme von NP durch Endozytose kann in A549-Zellen nach 4h beobachtet werden¹⁴⁶. Unter Einsatz der Inhibitoren Genistein und Amilorid wurde die Aufnahme von CeO_2 -NP nach 3h Applikationszeit studiert. Genistein wurde verwendet um die Clathrin/Caveolin medierte Endozytose zu inhibieren¹⁴⁷. Amilorid führt, durch eine leichte Azidifizierung des Zytosols und der Blockierung des Natrium-Protonen-Austauschers, zur Blockade der Makropinozytose¹⁴⁸. Beide Inhibitoren wurden in nicht toxischen Konzentrationen eingesetzt. Als nicht toxisch wurden Konzentrationen definiert, die mindestens ein Schwellwert von 80% Überlebensrate entsprachen. Die Zellen wurden durch prä-Inkubation sowie ko-Inkubation konditioniert.

Abb. 3.4.2.2 zeigt eine deutliche Reduktion der CeO_2 -Aufnahme durch die Inhibitoren Genistein und Amilorid. Allerdings war dieser Effekt nur zu beobachten wenn die Inhibitoren gleichzeitig mit den NP appliziert wurden, da durch die prä-Inkubation alleine keine Blockierung der CeO_2 -Aufnahme zu beobachten war. Genistein zeigte eine ähnliche Potenz im Vergleich zu Amilorid. Beide Inhibitoren verringerten die CeO_2 -Aufnahme um den Faktor 4,5 bzw. 3,1. Folglich werden CeO_2 -NP in A549-Zellen sowohl durch Clathrin/Caveolin medierte Endozytose als auch durch Makropinozytose internalisiert. Außerdem zeigte sich, dass die zelluläre Kalziumkonzentration, durch die Aufnahme der CeO_2 -NP, zunächst ansteigt. Wird die Aufnahme der CeO_2 -NP inhibiert, ist, im Vergleich zur Kontrolle, keine Änderung der Kalziumkonzentration zu beobachten.

Die hier dargestellte Inhibition der CeO_2 -Aufnahme konnte in der Arbeit von Marcus Buschner durch die Detektion der Seitwärtsstreuung mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden.

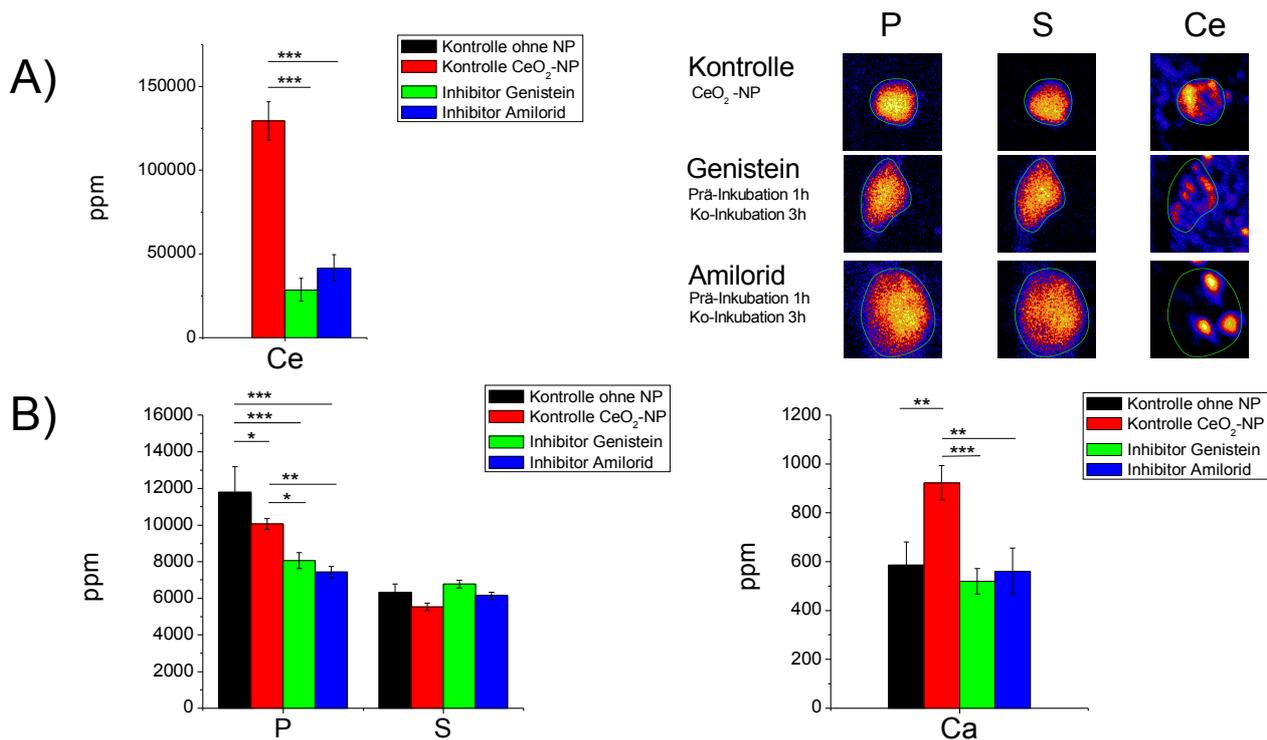


Abb. 3.4.2.2 Lungen-Epithelzellen internalisieren CeO₂-NP durch Makropinozytose oder Clathrin/Calveolin medierte Endozytose. A549-Zellen wurden mit CeO₂-NP (100 µg/ml, FKS 0 %) für 3 Stunden in An- und Abwesenheit des jeweiligen Inhibitors (Genestin 200 µM oder Amilorid 200 µM) inkubiert. Es erfolgte eine prä-Inkubation mit dem entsprechenden Inhibitor für 1 Stunde direkt vor der NP Exposition und eine ko-Inkubation mit den NP. **A)** Änderung und orts aufgelöste Darstellung der intrazellulären Cerium Konzentration. **B)** Änderung der zellulären Elementkonzentrationen von Phosphor, Schwefel und Kalzium nach der Blockierung der zellulären CeO₂-Aufnahme. Das Verhältnis von Applikationsvolumen zur Probenoberfläche war jeweils 0,104 ml/cm². Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; *** P ≤ 0.001.

3.4.2.3 Atmung als selektiver Parameter der NP-Aufnahme

Da Lungenzellen einem Atmungsrythmus unterliegen, welcher unter Laborbedingungen nicht gegeben ist, wurden primäre AT-II-Lungenzellen der Ratte auf einem elastischen Substrat kultiviert und gedehnt, um die Aufnahme der CeO₂-NP unter realistischen physiologischen Bedingungen zu simulieren. Die Dehnung wurde bei physiologischen Ruhebedingungen unter Einsatz einer Frequenz von 40 min⁻¹ sowie einer Oberflächenänderung des Substrats von 15 % durchgeführt. Es ist zu erwarten, dass sich durch die Dehnung die Aufnahmewahrscheinlichkeit der Partikel ändern kann, da sich die Größe der Zelloberfläche ändert und somit die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung erhöht. Auf der anderen Seite herrscht durch die Dehnung eine erhöhte Bewegung zwischen den einzelnen Partikeln, was dem entgegen wirken kann. Physiologisch betrachtet, konnte gezeigt werden, dass AT-II-Lungenzellen durch die Dehnung mehr Surfactant sekretieren können¹³⁴,

was eine höhere potentielle Blockade für die Aufnahme von NP darstellen kann, da Nanopartikel die Surfactant-Protein-A (SPA) binden, häufiger von Makrophagen phagozytiert werden¹⁴⁹. Andererseits werden Surfactant-Lipide und SPA von Typ-2-Pneumozyten aktiv aufgenommen recycelt¹⁵⁰, was die Aufnahme von NP, die an SPA oder an Surfactant-Lipide binden, begünstigen kann.

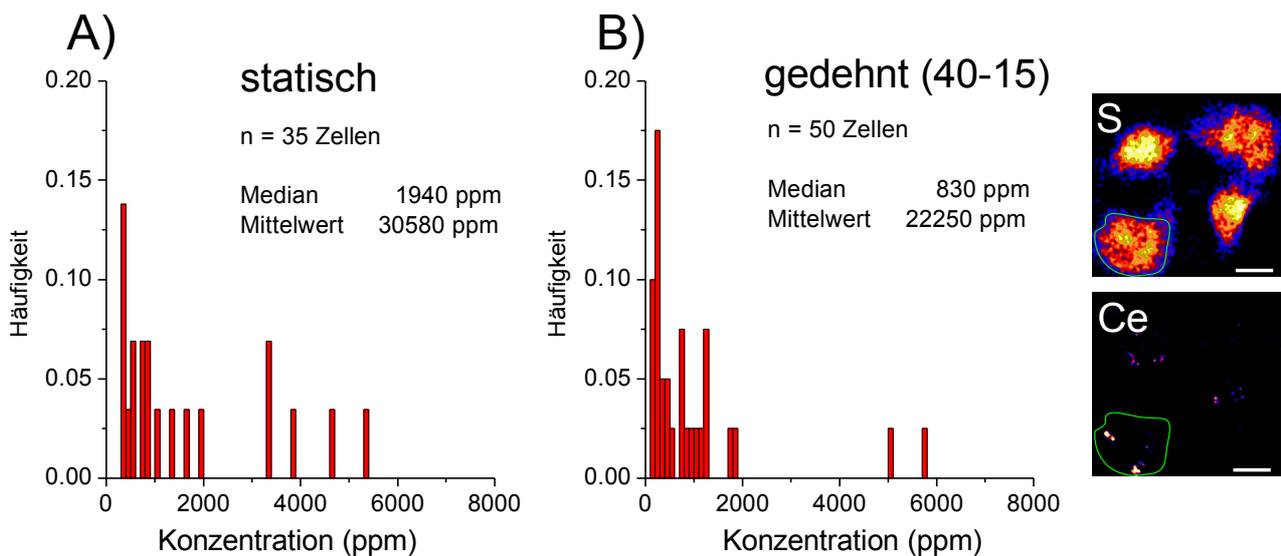


Abb 3.4.2.3 Gedehte Lungen-Epithelzellen nehmen CeO₂-NP in geringerer Menge auf. Primäre AT-II-Zellen der Ratte wurden für 24 h mit CeO₂-NP (30 µg/ml, FKS 10%) behandelt. Das Histogramm zeigt jeweils die Wahrscheinlichkeit eine Zelle der entsprechenden Konzentration in einer Klasse mit der Größe von 100 ppm vorzufinden. Die Häufigkeit von 0,1 entspricht dabei einer Wahrscheinlichkeit von 10%. Dargestellt sind n = 3 unabhängige Experimente (Ratten). Während der Dehnung war das Verhältnis von Applikationsvolumen zur Probenoberfläche jeweils 0,312 ml/cm². **A)** CeO₂-NP-Expositon bei statisch kultivierten Kontrollzellen. **B)** CeO₂-NP-Expositon während Dehnung (40-15; Frequenz = 40, Oberflächenänderung des Substrats = 15 %). PIXE-Element-Maps (weißer Balken jeweils 10 µm) zeigen die orts aufgelöste Ce-Verteilung eines typischen Dehnungs-Experiments mit Schwefel als Kontrolle für die zelluläre Position.

Die Studien zur CeO₂-Aufnahme in Abhängigkeit der Atmung wurden in Gegenwart einer Proteinkorona durchgeführt, da dies den natürlichen Bedingungen in der Lunge eher entspricht. Abb. 3.4.2.3 B) zeigt die Verteilung von CeO₂-NP in einzelnen primären Typ-II-Pneumozyten. Es zeigt sich eine stark ungleiche Konzentrationsverteilung. Wegen der breiten Verteilung, wurde der Median zur Quantifizierung der Aufnahme gewählt.

Abb. 3.4.2.3 zeigt, dass gedehnte Typ-2-Pneumozyten mit 830 ppm, im Vergleich zu statisch kultivierten Zellen mit 1936 ppm, deutlich weniger CeO₂-NP mit Proteinkorona aufnehmen. Die Daten sind dabei in Histogrammform mit einer Klassengröße von 100 ppm dargestellt. Abb 3.4.2.3

B) zeigt, dass die Schwankungen der CeO₂-Aufnahme auch innerhalb einer Messung auftreten. Dadurch kann die Ursache der Schwankung nicht auf die Herkunft unterschiedlicher Tiere zurückgeführt werden. Partikel welche in der Region der Zellmembran bzw. an der Grenze zum Substrat lokalisiert waren, wurden zur Zelle gezählt, da die Zellen vor der Analyse passagiert wurden und dabei CeO₂-Partikel welche auf dem Träger adhären nicht mitgeführt werden. Insgesamt korreliert das gezeigte Ergebnis mit den Daten der Durchflusszytometrie*. Dort wurde mit Hilfe der Seitwärtsstreuung für eine deutlich höhere Zellzahl ermittelt, dass gedehnte Typ-II-Pneumozyten weniger CeO₂-NP aufnehmen.

3.4.2.4 CeO₂-NP-Quantifizierung durch die Lichtstreuung

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen im Hochdurchsatzverfahren hinsichtlich der Emission oder Streuung von kohärenten Licht charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass die Granularität oder der intrazelluläre Brechungsindex mit der Lichtstreuung korreliert¹⁵¹. Weil NP über einen höheren Brechungsindex verfügen, streuen das Licht stärker als die Zelle. Werden NP in die Zelle aufgenommen, erhöht sich der Brechungsindex der Zelle, was sich in einer erhöhten Vorwärtsstreuung des Lichts widerspiegelt. Entscheidend für die Detektion der NP-Aufnahme durch die Lichtstreuung ist deshalb der Unterschied zwischen dem Brechungsindex der Zelle und des Nanopartikels sowie die aufgenommene Menge der Partikel.

Durch das eher geringe Toxizitätspotential von CeO₂-NP bleibt die Zellmembran intakt und durch den starken Anstieg der intrazellulären Cerium-Konzentration in einem Applikationsbereich von 3 – 100 µg/ml (Abb. 3.4.2.4 A) ist ein deutliches Streusignal zu erwarten. Im Allgemeinen konnte durch Kombination zwischen Ionenstrahlanalyse und Durchflusszytometrie eine Kalibrationskurve zwischen wirklicher zellulärer NP-Konzentration und Seitwärtsstreuung dosisabhängig dargestellt werden. Dies erlaubt, unter Kombination der Vorteile beider Methoden, die absolute NP-Konzentration pro Zelle sehr schnell und für eine hohe Zellzahl zu bestimmen. Dabei wurden die Studien zur zellulären Seitwärtsstreuung mittels Durchflusszytometrie (FACS Calibur) von Jana Fleddermann durchgeführt⁹⁴. Abb. 3.4.2.4 B & C zeigt den Anstieg der Seitwärtsstreuung durch die zelluläre Aufnahme von CeO₂-NP bei einer Applikationsdosis von 3, 30 und 100 µg/ml. Dabei wurde die wirklich aufgenommene Dosis, anstelle der applizierten Konzentration, berücksichtigt (Abb. 3.4.2.4 A). Im Allgemeinen ist ein stetiger Anstieg, ohne Sättigung, der Seitwärtsstreuung erkennbar. Die stärkste relative Seitwärtsstreuung lag bei 7,9 und wurde in Abwesenheit einer Proteinkorona beobachtet. Wenn die Partikel eine Proteinkorona trugen, war im Allgemeinen eine

* Daten erhoben von M. Buschner

deutliche geringere Erhöhung der relativen Seitwärtsstreuung durch die CeO_2 -Aufnahme zu beobachten, welche bei der höchsten CeO_2 -Dosis ungefähr 2,0 betrug.

Im Fall der NP TiO_2 und FeO_2 war u.A. durch die geringe zelluläre Aufnahme keine signifikante Änderung der Seitwärtsstreuung detektierbar. Obwohl für Al_2O_3 und ZnO ähnliche zelluläre Konzentration wie bei CeO_2 -NP gemessen wurde, konnte bei diesen Partikeln ebenfalls keine konzentrationsabhängige Änderung der Seitwärtsstreuung beobachtet werden.

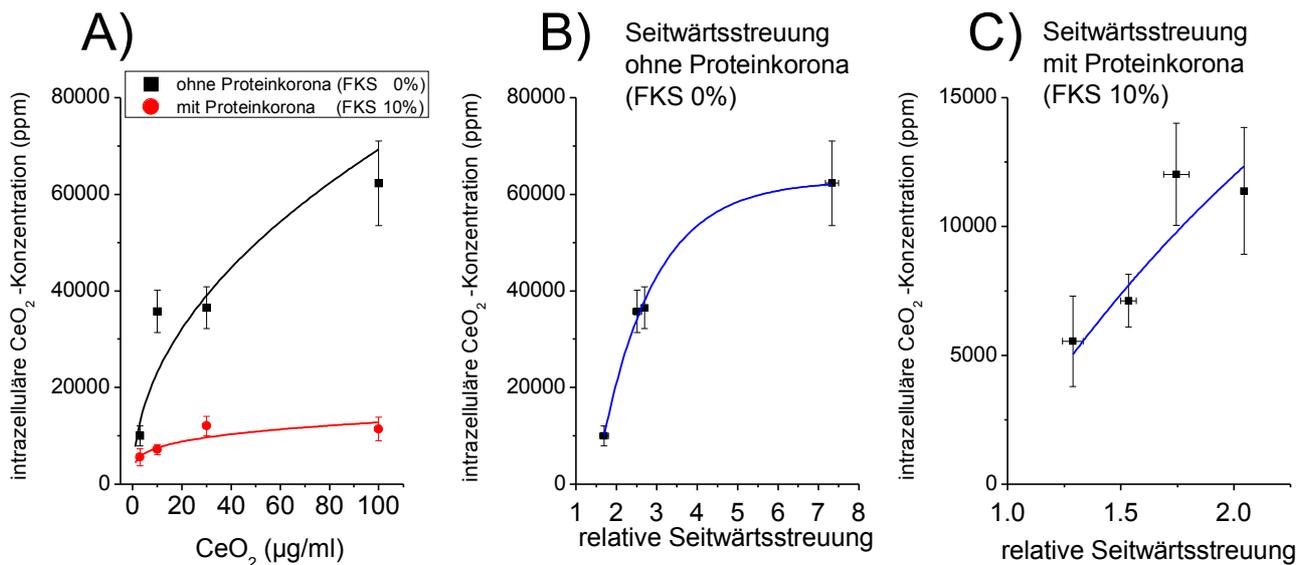


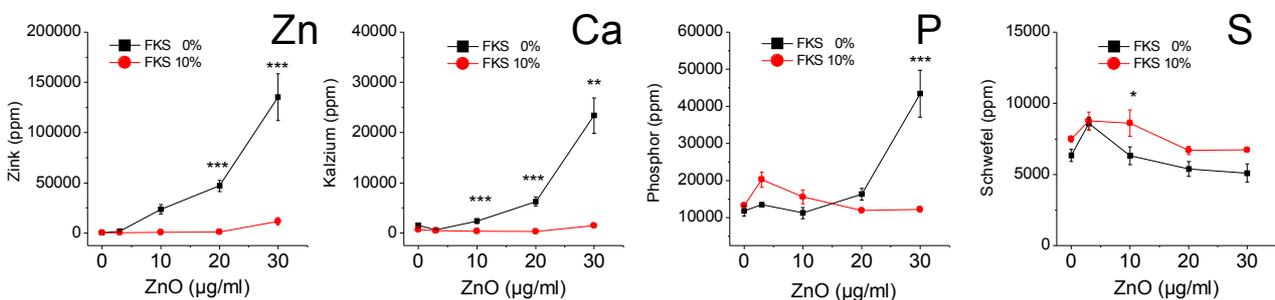
Abb. 3.4.2.4 Die zelluläre Aufnahme von CeO_2 -NP kann mittels Lichtstreuung quantifiziert werden. Lungen-Epithelzellen (A549) wurden für 48 h mit CeO_2 -NP in Gegenwart (FKS 10%) und Abwesenheit (FKS 0%) einer Proteinkorona inkubiert. Die Seitwärtsstreuung wurde in der Durchflusszytometrie mittels eines Argons Lasers (488 nm Wellenlänge) in einem Winkel von 90° im FACSCalibur detektiert. Es wurden 10000 Zellen gezählt die zuvor von der Population der Zelltrümmer separiert wurden. Jeder Datenpunkt repräsentiert jeweils den Mittelwert von 3 unabhängige Experimenten mit Standardfehler **A)** Beziehung zwischen applizierter CeO_2 -Menge und intrazellulärer Cerium-Konzentration (ermittelt durch Ionenstrahlanalyse) **B & C)** Anstieg der Seitwärtsstreuung durch die zelluläre Aufnahme von CeO_2 -NP (blaue Line: exponentieller Fit). Die Seitwärtsstreuung NP-behandelter Zellen wurde in Relation zur Seitwärtsstreuung NP-freier Zellen dargestellt und die Applikationsdosis betrug 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.3 ZnO

3.4.3.1 Kinetik und Dosisabhängigkeit der ZnO-NP Aufnahme

Die ZnO-Exposition wurde über einen Zeitraum von 24 – 72 h und bei einer Dosis von 3, 10, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$ untersucht (Abb. 3.4.3.1). Da die Zellen sich durch den toxischen Effekt der ZnO-NP vom Boden ablösten, konnte der zelluläre Elementgehalt nur bis zu einer ZnO-Dosis von 30 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden. Im Allgemeinen war eine deutlich höhere zelluläre Zink-Konzentration in Abwesenheit einer Protein-Korona zu beobachten (Abb. 3.4.3.1 A). In Gegenwart der Proteinhülle war die höchste zelluläre Zink-Konzentration ungefähr 10 mal geringer. Generell konnte kein Sättigungseffekt (Vgl. CeO_2 Abb 3.4.2.1.2) bei der Aufnahme von ZnO-NP festgestellt werden. Mit steigender Dosis sank der Schwefelgehalt leicht ab. Dieser Effekt war am stärksten, wenn die Dosis in Abwesenheit der Proteinhülle erhöht wurde. Die Elementgehalte von Phosphor und Kalzium zeigten eine sehr starke Korrelation mit dem zellulären Zink-Gehalt. Dieser Effekt war nur in Abwesenheit der Proteinkorona zu beobachten.

A) Dosisabhängigkeit (48 h)



B) Kinetik (10 $\mu\text{g/ml}$)

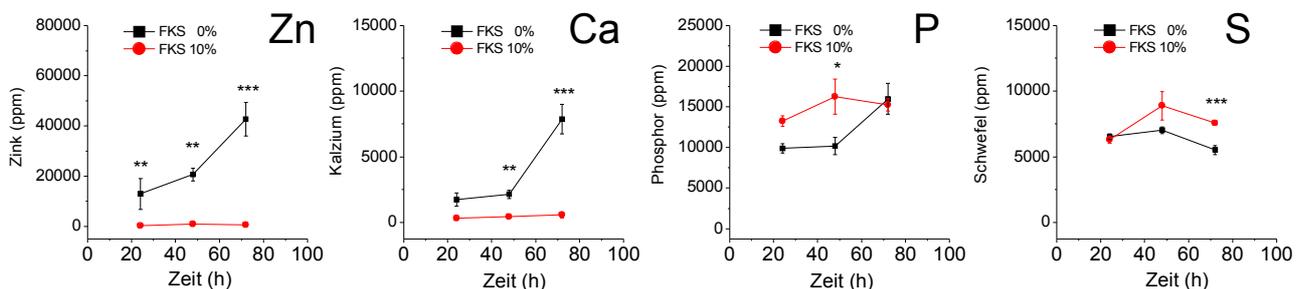


Abb. 3.4.3.1 Dosis- und zeitabhängige zelluläre Aufnahme von ZnO-NP im Kontext der Elemente P, S und Ca. **A)** Dosisabhängige Aufnahme von ZnO-NP in Lungen-Epithelzellen. A549 wurden mit ZnO-NP unterschiedlicher Konzentration (0, 3, 10, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$) für 48 h in Ab- und Anwesenheit einer Proteinkorona (10 % FKS bzw. 0 % FKS) inkubiert. **B)** Zeitabhängige Aufnahme von ZnO-NP nach 24, 48 und 72 h Expositionszeit bei einer Dosis von 10 $\mu\text{g/ml}$ in Ab- und Anwesenheit einer Proteinkorona (10 % FKS bzw. 0 % FKS). Das Verhältnis von Applikationsvolumen zur Probenoberfläche war jeweils 0,208 ml/cm^2 . Dargestellt sind jeweils mindestens 3 unabhängige Experimente. Signifikanzen sind im Vergleich zwischen Ab- und Anwesenheit einer Proteinkorona (10 % FKS bzw. 0 % FKS) dargestellt: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

3.4.3.2 Elementare Kolokalisation nach ZnO-Exposition

Im vorherigen Kapitel wurde ein starker Anstieg der zellulären Phosphor- und Kalziumkonzentration durch die ZnO-NP Aufnahme beschrieben. Da ZnO-NP im Kulturmedium mit Phosphor und Kalzium kolokalisiert sind, liegt es nahe, dass die Aufnahme der ZnO-NP für die erhöhte zelluläre Phosphor- und Kalziumkonzentration verantwortlich ist. Durch das zelluläre Rückstreusignal von Zink konnte gezeigt werden, dass ZnO-NP von A549-Zellen aufgenommen werden, da die Verschiebung des Zink-Rückstreusignals in einen Bereich unterhalb von ca. 2125 keV die Aufnahme der Partikel anzeigt (Abb. 3.4.3.2 C). Gleichzeitig zeigten die zellulären Elemente Phosphor, Kalzium und Zink nach der NP-Aufnahme eine charakteristische Kolokalisation. Dies bestätigt, dass die Aufnahme der ZnO-NP die Ursache für die Erhöhung der zellulären Phosphor- und Kalziumkonzentration sein könnte. Abb 3.4.3.2 A) zeigt ein typisches zweidimensionales Verteilungsmuster von P, Ca und Zn, wobei S als Marker-Element eingesetzt wurde um die einzelnen Zellen abzugrenzen. Zur Darstellung der Konzentrationsverteilung der jeweiligen Elemente diente der grüne Bereich, welcher als region-of-interest definiert wurde. Dabei ist die Kolokalisation von P, Ca und Zn sowohl im zellulären Bereich als auch in schwacher Ausprägung auf dem Trägersubstrat zu beobachten und durch ein charakteristisches Konzentrationsprofil mit jeweils 4 Maxima gekennzeichnet. Die Konzentrationen für Phosphor und Calcium übersteigen mit max. 43000 bzw. 24000 ppm deutlich die Werte zellulärer Konzentrationen von Kontrollzellen für diese Elemente (Phosphor: 13300 ppm, Calcium: 1506 ppm). Wie in Kap. 3.3.3 gezeigt stammt die zusätzliche Menge an Phosphor und Kalzium, mit großer Wahrscheinlichkeit, aus dem Kulturmedium.

Die Ausprägung der Kolokalisation wurde näher beschrieben, indem der Korrelationskoeffizient nach Pearson für die einzelnen Elementbeziehungen ermittelt wurde (Abb 3.4.3.2 B). Dabei wurde die stärkste Korrelation zwischen Zink und Kalzium bzw. Zink und Phosphor beobachtet. Dort betrug der Korrelationskoeffizient 0,97 bzw. 0,96. Eine Korrelation geringerer Ausprägung fand sich bei Zink und Schwefel, dort lag der Korrelationskoeffizient bei 0,73.

In der Gruppe der untersuchten Metalloxid-NP zeigten ZnO-NP als einzige NP die dargestellte charakteristische Kolokalisation zwischen NP, Phosphor und Kalzium nach der Aufnahme der Partikel (Abb. 3.4.3.2). Daneben konnte der Anstieg der zellulären Kalzium- und Phosphorkonzentration in Abhängigkeit der ZnO-Aufnahme in Anwesenheit einer Proteinkorona nicht beobachtet werden, was höchstwahrscheinlich durch die geringere Partikel-Aufnahme zu begründen ist.

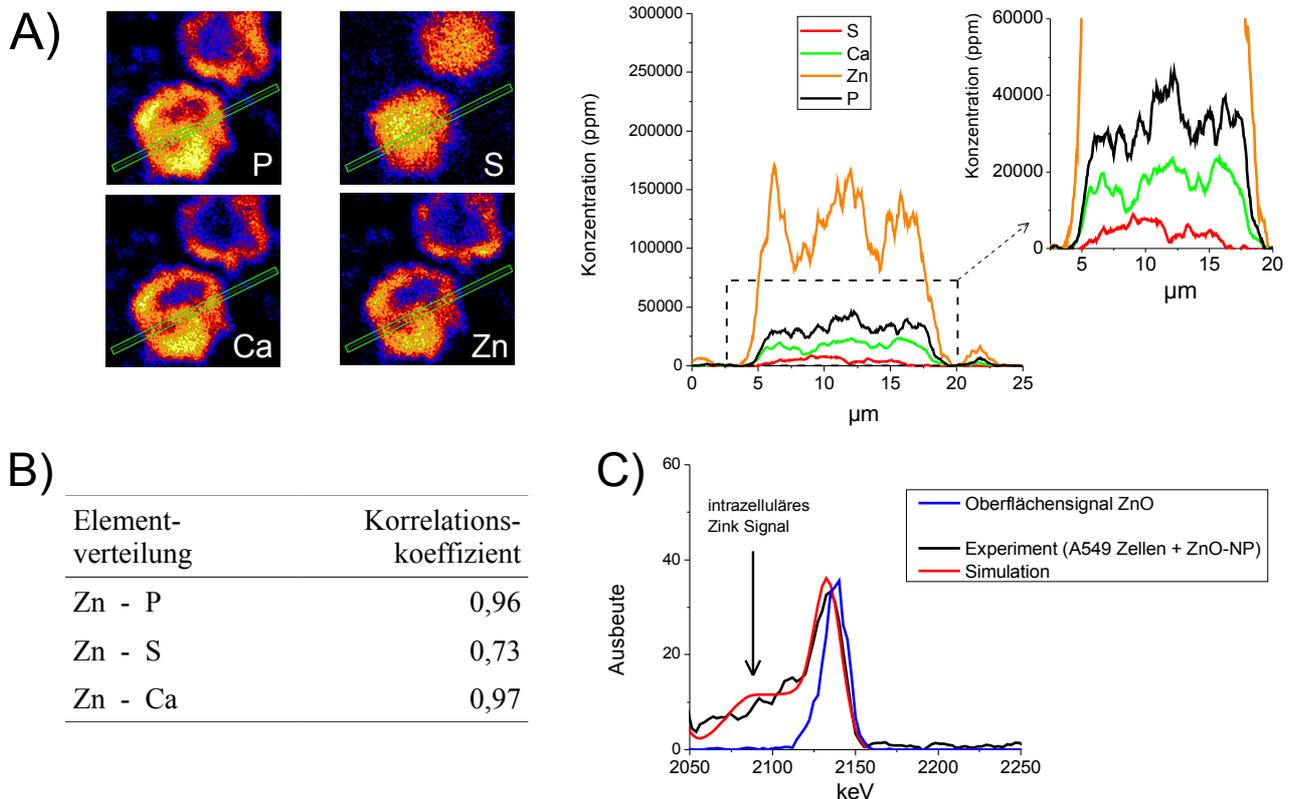


Abb 3.4.3.2 Typische Kolo-kalisation wichtiger physiologischer Elemente nach ZnO-NP Exposition. Lungen-Epithelzellen (A549) wurden für 48 h mit ZnO-NP (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Abwesenheit einer Protein-Korona (FKS 0%) behandelt. **A)** Mittels der ROI (grün) wurde das Profil der Elementverteilung von P, S, Ca, Fe & Zn dargestellt. Die PIXE-element-Maps repräsentieren jeweils einen Bereich von 25 x 25 μm . **B)** Korrelation der Elementverteilung zwischen Zink und der zellulären Elemente P, S, Ca. Die Korrelation wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson ermittelt **C)** Verschiebung des zellulären Zink Rückstreu-signals, was gleichzeitig die zelluläre Aufnahme der NP anzeigt.

3.4.3.3 Beziehung zwischen wirklicher zellulärer Dosis und Toxizität

Die Ionenstrahlanalytische Quantifizierung von zellulären Material erlaubt es, im Vergleich zu der extrazellulären Applikationsdosis, die wirkliche intrazellulär aktive, d.h. die wirksame Dosis, zu ermitteln. Der Vorteil der Ionenstrahlmikroskopie liegt darin, dass authentische NP ohne Markierung quantifiziert werden können und so ein möglicher Einfluss der Markierung auf die zelluläre Aufnahme ausgeschlossen werden kann. Im biologischen Kontext ist es erforderlich, der Dosis des NP einen zellulären Effekt zuzuordnen zu können. Oberdörster et al. hat bezüglich der NP-Dosis aufgeführt¹⁵², dass im Fall von TiO_2 die Masse, absolute Zahl sowie totale Oberfläche des Partikels geeignet ist, um einen toxischen Effekt quantitativ zu beschreiben. Dennoch zeigen NP

vielfältige Eigenschaften welche es schwierig gestalten die NP-Dosen verschiedener Partikel miteinander zu vergleichen. Beispielsweise stehen sedimentierte Partikel begrenzt für die zelluläre Aufnahme zur Verfügung, wobei die Sedimentationsgeschwindigkeit stark von der Partikelgröße abhängig ist. Daneben erfolgt in der Praxis der Kontakt mit NP oft in Aerosolform und im Zellkultursystem werden die NP in Lösung appliziert. Folglich können die Applikationsdosen für verschiedene NP nur schwer verglichen werden.

Das vorliegende Kapitel liefert einen neuen Beitrag, indem die wirksame intrazelluläre Dosis quantifiziert wird. Diese kann dazu beitragen das Risiko eines Nanomaterials umfassender abschätzen zu können, sowie den Wirkmechanismus besser zu verstehen.

Abb. 3.4.3.3 zeigt im Diagramm die wirkliche zelluläre Zink-Dosis nach einer applizierten ZnO-Dosis von 0, 3, 10, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$ in Abhängigkeit der Toxizität*. Daneben zeigen die PIXE-Element-Maps die orts aufgelöste zelluläre Position (grüne ROI, vom zellulären Schwefel Signal abgeleitet) des Zink-Signals in einer Scanfeldgröße von 156 oder 625 μm^2 .

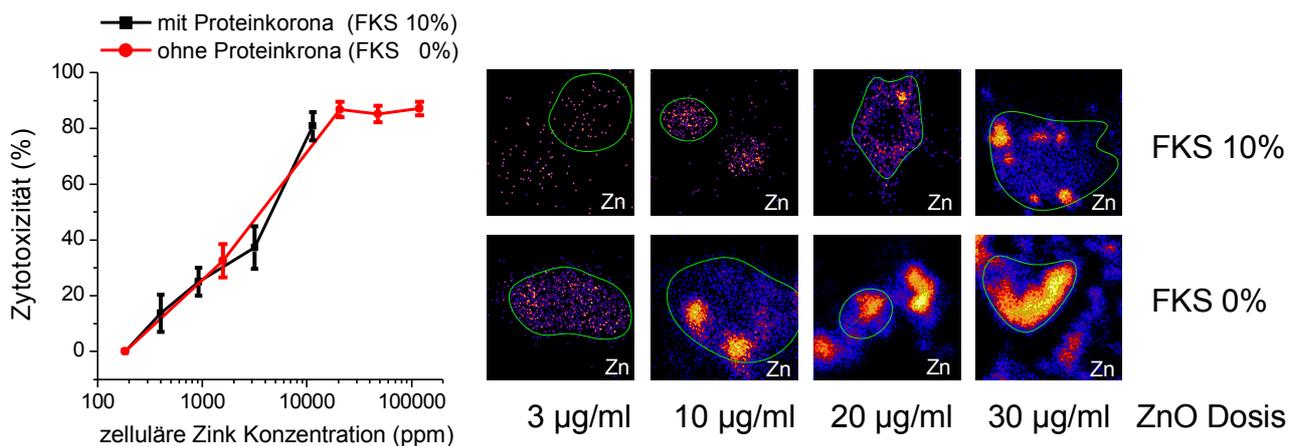


Abb. 3.4.3.3 Beziehung zwischen wirklicher zellulärer Zink Dosis und Toxizität von ZnO-NP in An- und Abwesenheit einer Proteinkorona (FKS 10% bzw. FKS 0%). Die Toxizität wurde indirekt ermittelt, indem die Zellvitalität mittels MTT-Test quantifiziert wurde. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die PIXE-Element-Maps einer Scanfeldgröße zwischen 12,5 x 12,5 μm und 25 x 25 μm zeigen jeweils zellulär lokalisiertes Zink in Abhängigkeit der ZnO-Dosis und des Serumgehalts. Das Verhältnis von Applikationsvolumen zur Probenoberfläche war jeweils 0,208 ml/cm². Die grüne Markierung (ROI) zeigt die zelluläre Position, welche zuvor mit Hilfe des Schwefel-Signals festgelegt wurde.

Im Allgemeinen zeigte sich unabhängig von der Proteinkorona eine inhomogene zelluläre Zink-Verteilung mit steigender ZnO Konzentration. Bei einer intrazellulären Zink-Konzentration zwischen ca. 400 und 25000 ppm besteht eine lineare Beziehung zwischen intrazellulärer

* Toxizitätsdaten wurden mittels MTT-Test von J. Fleddermann erhoben.

Konzentration und Zytotoxizität, wobei die halbmaximale Dosis (EC_{50}) bei ungefähr 4000 ppm angesiedelt ist. Oberhalb von 25000 ppm stieg die zelluläre Zink-Dosis, bei gesättigter Toxizität, bis auf einen Wert von ca. 120000 ppm an.

Zwischen der logarithmischen zellulären Zinkkonzentration und Zytotoxizität konnte ein sehr hoher Pearsonscher Korrelationskoeffizient von 0.93 ermittelt werden.

3.4.3.4 Rolle freier Zink-Ionen

Besonders im Fall von ZnO können Zinkionen eine wichtige Rolle beim Toxizitätsmechanismus des NP spielen. Beispielsweise liegen im Applikationsmedium eine Reihe von Substanzen, wie z.B. Cystein, Proteine oder Phosphat-Ionen, vor, welche sehr affin für Zinkionen sind. Durch die Fähigkeit Ionen in Lösung quantifizieren zu können, bietet die massenspektrometrische Analyse eine Auskunft darüber, in welcher Form ZnO Partikel extrazellulär vorliegen. Da die Löslichkeit von ZnO eine starke pH-Abhängigkeit zeigt und endozytierte ZnO-NP im Lysosom bei einem pH von 4 – 5 prozessiert werden können, wurde die freie Zinkionenkonzentration bei verschiedenen pH-Werten im Puffersystem ohne zusätzliche Komponenten untersucht (Abb. 3.4.3.4 A). Im nächsten Schritt erfolgte die Bestimmung der freien Zinkionenkonzentration im Kulturmedium ohne Serum (Abb. 3.4.3.4 B).

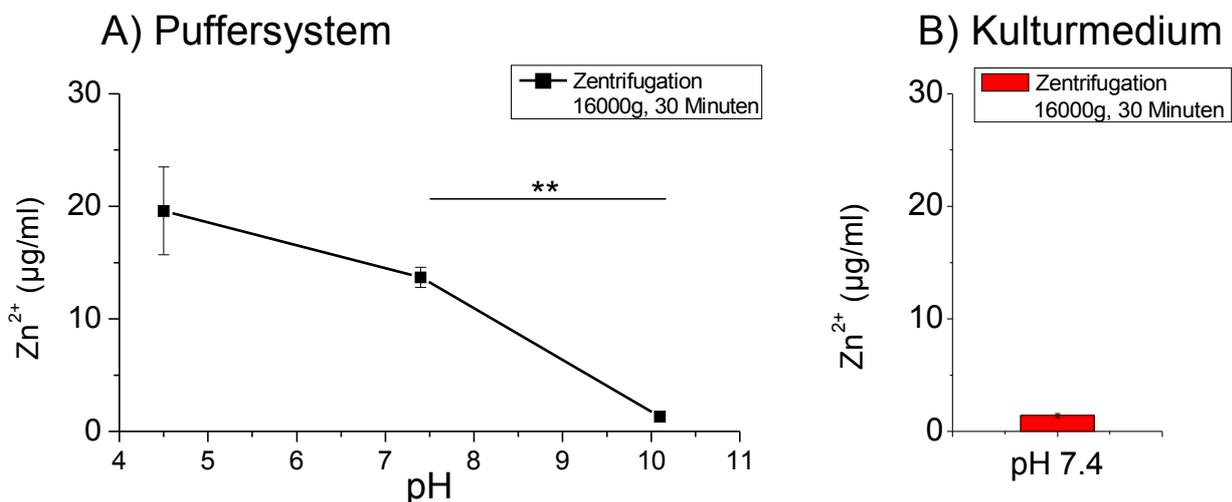


Abb. 3.4.3.4 Freie Zinkionenkonzentration von ZnO-NP bei verschiedenen pH-Werten (A) und im Kulturmedium (B). Zinkionen wurden von ZnO-NP (30 µg/ml) durch Zentrifugation (16000g, 30 Minuten) getrennt und massenspektrometrisch quantifiziert. Die entsprechenden pH-Werte wurden jeweils mit 25 mM Hepes-, Acetat- oder Tris-Puffer bei einer Ionenstärke von 160 mM eingestellt. Die Quantifizierung freier Zinkionen im Puffer und Kulturmedium wurde in Abwesenheit von Serum (FKS 0%) durchgeführt. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten. ; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Zur Quantifizierung der Zinkionenkonzentration in Lösung wurden die Ionen mittels Zentrifugation (16000g, 30 Minuten) von den ZnO-NP getrennt. Im Experiment betrug die eingesetzte ZnO-Konzentration 30 µg/ml, was einer maximalen freien Zinkionenkonzentration von 24,1 µg/ml entspricht. Bei einem pH von 4,5 konnten 19,6 (+/- 3,9) µg/ml Zn²⁺ beobachtet werden. Bei Erhöhung des pH-Werts auf 7,4 und 10,1 sinkt die freie Zinkionenkonzentration auf 13,7 (+/- 0,9) bzw. 1,3 (+/- 0,2) µg/ml ab (Abb. 3.4.3.4). Aus diesen Werten ergibt sich, dass freie Zinkionenkonzentration umgekehrt proportional mit dem pH Wert korreliert. Bei einem pH-Wert von 7,4 im Medium ergibt sich, im Vergleich zum Puffersystem, eine deutlich niedrigere freie Zinkionenkonzentration von 1,4 (+/- 0,2) µg/ml statt 13,7 (+/- 0,9) µg/ml. Das bestätigt die Vermutung, dass im Kulturmedium Substanzen vorhanden sind, welche ZnO-NP bzw. Zinkionen binden können bzw. deren Aggregationsverhalten beeinflussen.

3.4.4 Graphen als Nanopartikel-Carrier

Graphen ist ein zweidimensionales Molekül, was durch seine physikalischen und chemischen Eigenschaften¹⁵³ als Carrier für drug-delivery-Systeme¹⁵⁴ im Allgemeinen und für die Applikation von wasserunlöslichen Medikamenten¹⁵⁵ im Besonderen geeignet ist. Gold- und Silber-NP zeigen vielfältige Einsatzmöglichkeiten im Bereich der Diagnostik und Therapie oder als Biomarker^{156 157 158}. Zusätzlich sind diese Partikel durch die Kopplung mit der Thiol- oder Aminogruppe für eine große Zahl von Biomolekülen, wie z.B. DNA oder Peptide, leicht zugänglich.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Fähigkeit von Graphenoxid als Carrier zur zellulären Aufnahme von Gold- und Silber-NP untersucht werden. Dazu wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Gao Graphenoxid-Moleküle mittels Cystamin und einer Disulfidbrückenbindung kovalent mit Silber- und Gold-NP gekoppelt und anschließend das Verhältnis zwischen NP und Graphen massenspektrometrisch bestimmt. Dabei entspricht 100 µg/ml Graphenoxid-NP-Konjugat der gleichen absoluten Gold- bzw. Silber-Menge wie 5 µg/ml NP-Lösung.

Abb. 3.4.4.1 zeigt ein typisches PIXE-Spektrum von A549-Lungenzellen, welche mit Gold- oder Silber-NP bzw. Graphenoxid konjugierten Partikeln behandelt wurden. Dabei lassen sich Gold durch die L-Linie zwischen 9 und 14 keV und Silber durch die K-Linie bei 22 keV eindeutig durch die charakteristische Röntgenstrahlung identifizieren. Bei einer starken Aufnahme der NP überlappt das Signal der L-Linie von Gold und Silber mit den zellulären Elementen im Bereich zwischen 2 bis 4 keV.

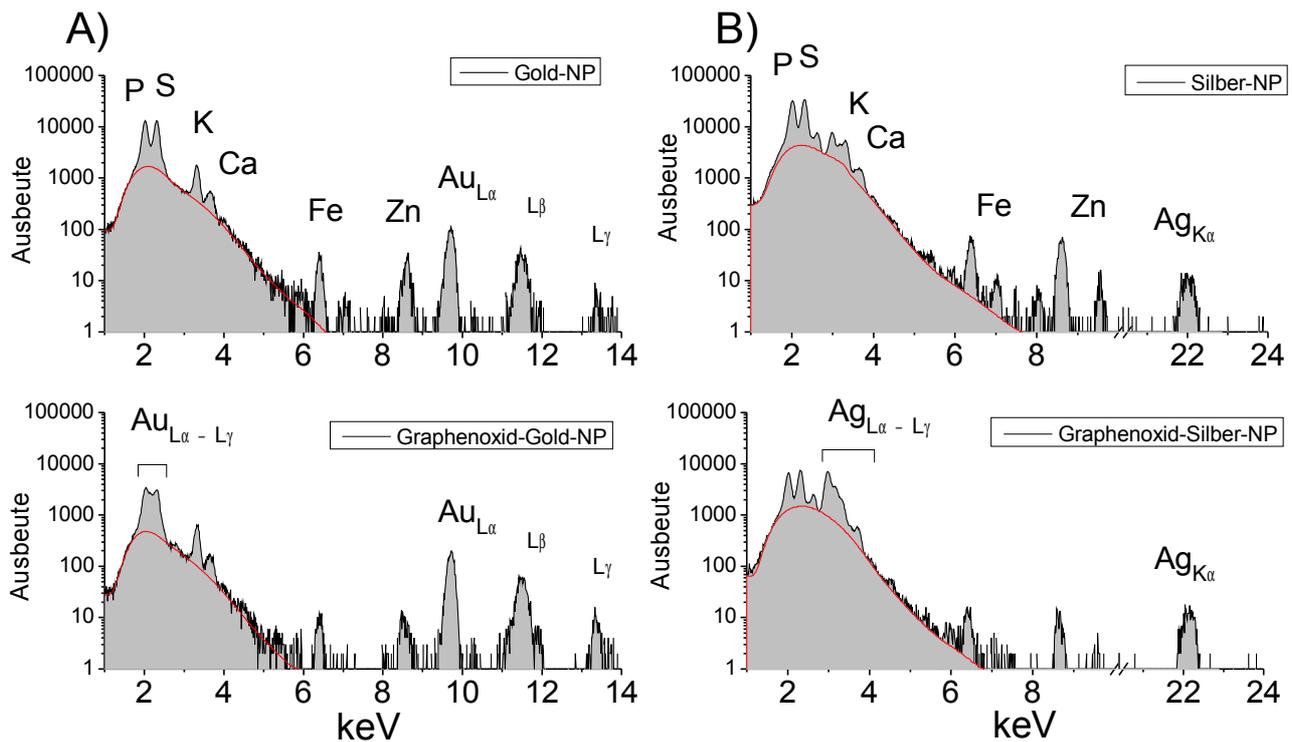


Abb 3.4.4.1 Typisches PIXE-Spektrum zur Quantifizierung von Gold (A) oder Silber (B) in Lungenepithelzellen (A549).

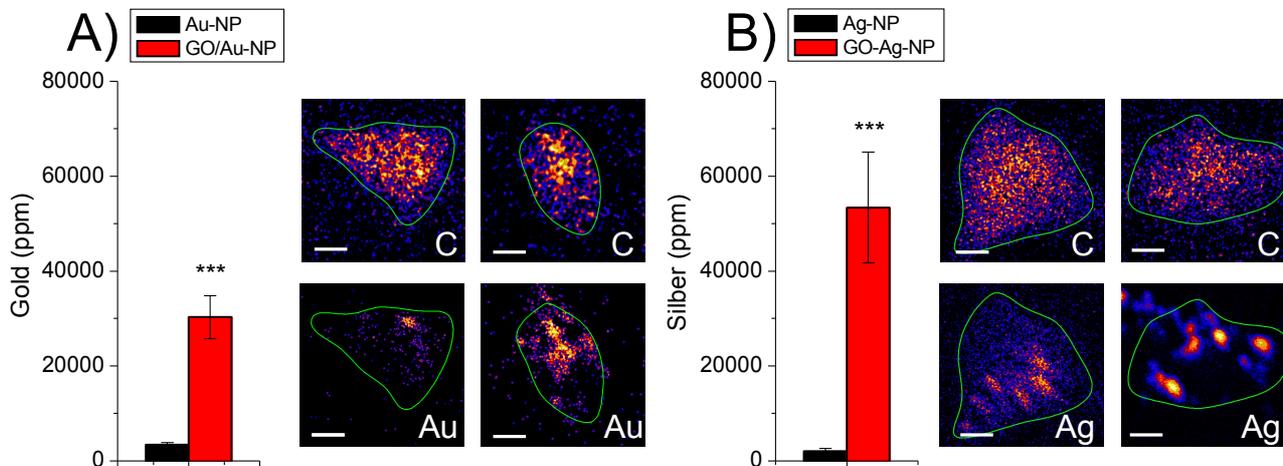


Abb 3.4.4.2 Verteilung und Quantifizierung von der Nanopartikel Gold (A) und Silber (B) in Lungenzellen. A549-Zellen wurden für 24 Stunden mit den jeweiligen NP, bzw. der mit Graphenoxid konjugierten Variante, in Gegenwart von 10% FKS inkubiert. Die Konzentration der Nanopartikel betrug (Ag-NP bzw. Au-NP) jeweils 5 $\mu\text{g/ml}$ und die Konzentration der Graphenoxid-Konjugate (Ag-GO-NP bzw. Au-GO-NP) jeweils 100 $\mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis von Applikationsvolumen zur Probenoberfläche war jeweils 0,208 ml/cm^2 . Gezeigt ist der Mittelwert und Standardfehler von jeweils 3 unabhängigen Experimenten ($n = 3$) und der weiße Balken repräsentiert jeweils 5 μm ; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Abb. 3.4.4.2 zeigt die Verteilung und die zelluläre Konzentration von Gold und Silber in A549-Lungenzellen nach Exposition mit unkonjugierten-NP und Graphenoxid-konjugierten-NP. Die

Konzentration der Partikel wurde dabei so eingestellt, dass die applizierte Dosis von Gold und Silber, unabhängig von der Konjugation konstant bleibt (Au-NP & Ag-NP 5 µg/ml und GO-Au-NP & GO-Ag-NP 100 µg/ml). Daneben wurde Kohlenstoff als Signal für die zelluläre region-of-interest verwendet, da bei hohen NP-Konzentrationen eine Überlappung mit zellulären Strukturelementen eintreten kann. Beispielsweise überlappt die Gold L-Line mit der Schwefel K-Linie.

Insgesamt lässt sich unabhängig vom Typ des NP sowie der Konjugation oder zellulären NP-Konzentration eine inhomogene zelluläre Verteilung der Partikel feststellen. In Einzelfällen konnte bei einer hohen Gold-Konzentration die Korrelation des zellulären Gold-Signals mit dem zellulären Kohlenstoffsignal beobachtet werden. Bezüglich der zellulären NP-Konzentration konnte sowohl im Fall von Gold-NP als auch bei Silber-NP eine erhöhte zellulären NP-Aufnahme durch die Konjugation mit Graphen festgestellt werden. Dies zeigt, dass eine Graphen-Konjugation geeignet ist, die NP-Aufnahme in einem Zeitraum von 24 Stunden signifikant um einen Faktor von 9,0 bis 27,1 zu erhöhen.

Da durch die Konjugation der NP an Graphen eine stärkere zelluläre NP-Aufnahme zu erwarten ist, wurde die Toxizität der Graphenoxid-NP im Vergleich zu den unkonjugierten NP untersucht. Zur Beurteilung der Toxizität wurden 3 unterschiedliche Tests angewendet: Reduzierungsfähigkeit mitochondrialer Oxidoreduktasen (MTT-Test), extrazelluläre Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) und das Ausmaß der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Bei den Graphenoxid-NP-Konjugaten wurde durch MTT, LDH und ROS eine leichte bis mittlere signifikante Erhöhung der Toxizität festgestellt (Abb. 3.4.4.3).

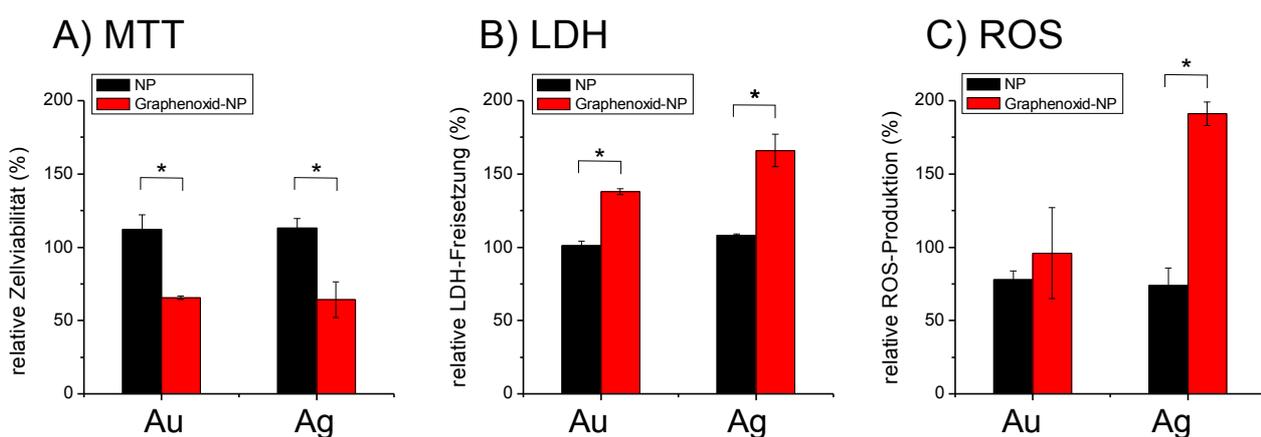


Abb 3.4.4.3 Toxizität von Gold- und Silber-NP im Vergleich zu Graphenoxid-NP-Konjugaten. A549-Lungenzellen wurden jeweils für 24 h mit NP (5 µg/ml) bzw. Graphenoxid-NP-Konjugaten (100 µg/ml) in Gegenwart von 10% FKS inkubiert. **A)** MTT-Test zur relativen Quantifizierung der Zellvitalität. **B)** Zelluläre L-Lactatdehydrogenase Freisetzung. **C)** Relative Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Das Verhältnis von Applikationsvolumen zur Probenoberfläche war jeweils 0,208 ml/cm². Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; *** P ≤ 0.001.

3.5 Quantitative Elementanalyse von Lungengewebe

3.5.1 Vergleich zwischen isolierten Einzelzellen und Gewebe

Es ist bekannt, dass Modifikationen im zellulären Elementgehalt mit bekannten Zivilisationskrankheiten wie Alzheimer oder Parkinson korrelieren können^{159 160}. Um Rückschlüsse auf mögliche Stoffwechselveränderungen oder toxische Effekte durch NP ziehen zu können, wurden die Lungenzellen im gesunden Zustand als Kontrolle untersucht. Dabei wurden die Elementgehalte von A549-Zellen, primären AT-II-Zellen der Ratte und Lungengewebe der Maus verglichen (Abb. 3.5.1). Die zu quantifizierenden Elemente wurden in zwei Gruppen eingeteilt: In der ersten Gruppe sind die Elemente welche zum Aufbau der zellulären Struktur (P, S), sowie Elemente (Cl, K) die voraussichtlich in großer Zahl zur Erfüllung wichtiger Stoffwechselprozesse benötigt werden, enthalten.

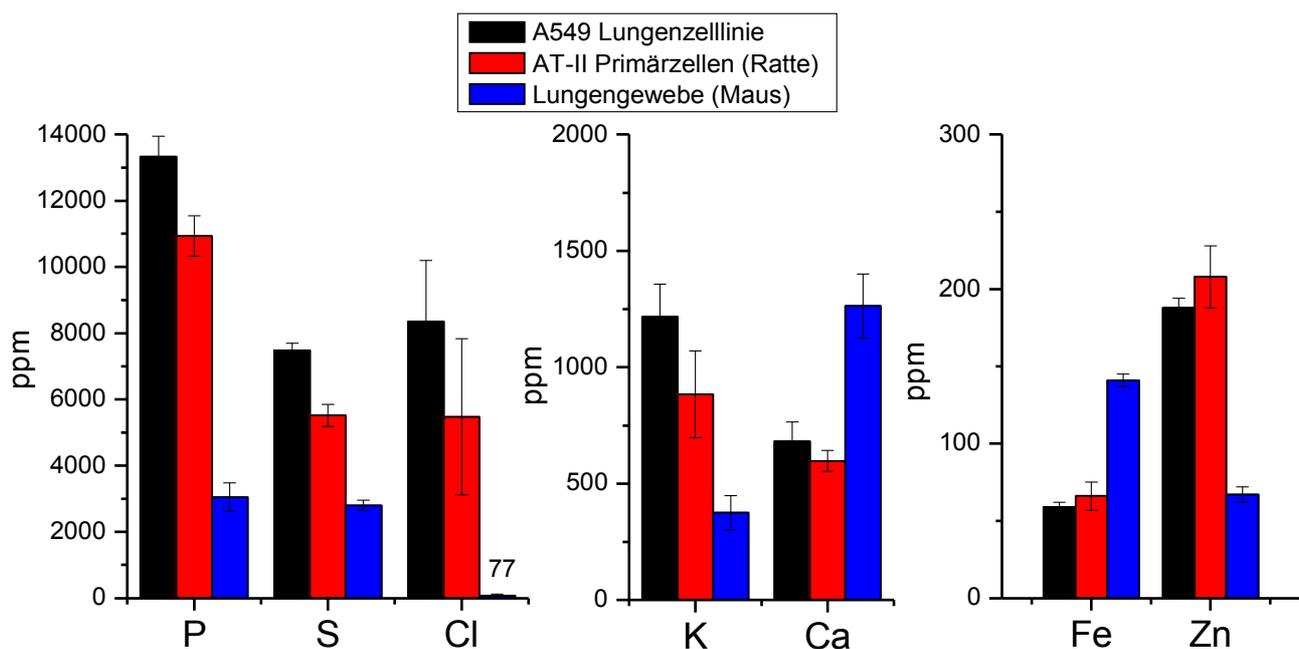


Abb. 3.5.1 Elementkonzentration von unbehandelten Lungenzellen unterschiedlichen Typs (A549-Zelllinie, AT-II-Primärzellen, Lungengewebe). Dargestellt sind $n \geq 3$ Experimente.

In die zweite Kategorie fallen die Spurenelemente, Eisen und Zink, sowie Kalzium, bei denen eine sehr geringe zelluläre Konzentration zu erwarten war. Die Konzentration der jeweiligen Elemente ist in ppm ($\mu\text{g/g}$) angegeben und bezieht sich auf das Trockengewicht der Einzelzelle bzw. Alveole. Die Elementkonzentration der einzelnen Alveolen wurden unter Ausschluss des Lumens bestimmt, indem mit Hilfe der exclude-Funktion der Software GeoPIXE nur Bereiche des Scanfelds zur

Konzentrationsbestimmung verwendet wurden, in denen tatsächlich Zellmaterial vorhanden war. Erwartungsgemäß zeigten bei allen Zelltypen die Strukturelemente Schwefel und Phosphor, im Vergleich zu den anderen Elementen, eine sehr hohe Konzentration. Abb. 3.5.1 zeigt zwar eine höhere Konzentration im Falle von Chlor, dies sollte jedoch durch die sehr hohe Schwankung sowohl innerhalb eines Zelltyps als auch zwischen den Zelltypen kritisch hinterfragt werden. Das Lungengewebe zeigt, vermutlich auf Grund des vielschichtigen Probenpräparationsprozesses, den geringsten Chlorgehalt.

Im Vergleich zu Primärzellen und Lungengewebe sind A549-Zellen durch erhöhte Werte für Phosphor und Schwefel gekennzeichnet. Das Lungengewebe der Maus zeigt im Vergleich zu den Primärzellen und der Zelllinie eine geringere Schwefelkonzentration von ca. 3000 ppm. Bezüglich Phosphor zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei Schwefel. Die A549-Zelllinie und die primären AT-II-Zellen (Ratte) zeigen eine Phosphorkonzentration auf ähnlichen Niveau von 13200 ppm und 10900 ppm, wohingegen das Lungengewebe der Maus eine Konzentration bei 3000 ppm zeigt. Als Zelllinie, oder durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren, befinden sich die Zellen in der Zellkultur in erhöhter Stoffwechselaktivität durch kontinuierliche Zellteilung, was die erhöhten Werte für Phosphor (DNA) und Schwefel (Proteine des Zytoskeletts) erklären kann.

Die Spurenelement-Konzentrationen von Ca, Fe, und Zn befinden sich bei A549-Zellen und Primärzellen der Ratte auf etwa gleichen Niveau. Lediglich das Lungengewebe der Maus zeigt hier stark abweichende Werte im Fall von Eisen und Zink. Im Vergleich zur Primärzelle und A549-Zellen kann im Lungengewebe ein deutlich erhöhter Wert für Eisen von 145 ppm, sowie ein deutlich erniedrigter Wert für Zink von 60 ppm beobachtet werden. Die erhöhten Werte für Kalzium und Eisen im Lungengewebe der Maus können durch den direkten Kontakt mit dem Blut erklärt werden. Im Blut liegt die Kalziumkonzentration bei ca. 2,4 mM und der eisenhaltige Porphyrinkomplex im Hämoglobin kann für die erhöhten Elementkonzentrationen verantwortlich sein.

3.5.2 TiO₂-Aerosol

Abb. 3.5.2.1 zeigt die Verteilung und den Nachweis von TiO₂-NP in einzelnen Alveolen nach Aerosolexposition im Lungengewebe der Maus. Die charakteristische Struktur des Lungengewebes ist in der Aufnahme des optischen Mikroskops in Abb. 3.5.2.1 A) dargestellt, und konnte mit Hilfe des Elements Schwefel in einer Übersichtsaufnahme der Ionenstrahlmikroskopie ebenfalls dargestellt werden. Die Übersichtsaufnahme zeigt eine terminale Bronchiole, welche sich durch die

Mukusschicht, die durch einen höheren Schwefelgehalt gekennzeichnet ist, von den einzelnen Alveolen abgrenzt. In Abb 3.2.2.1 B) wurde die Signalverteilung in einzelnen Alveolen genauer untersucht, indem eine region-of-interest (grün) definiert wurde. Dort war eine Kolo­kalisierung von Titan und Schwefel zu erkennen. Die TiO_2 -NP sind relativ inhomogen verteilt, wodurch lokal stark schwankenden Signalintensitäten beobachtet werden können. In der Grenzschicht zur terminalen Bronchiole ist dabei nur sehr wenig bzw. kein Titan lokalisiert.

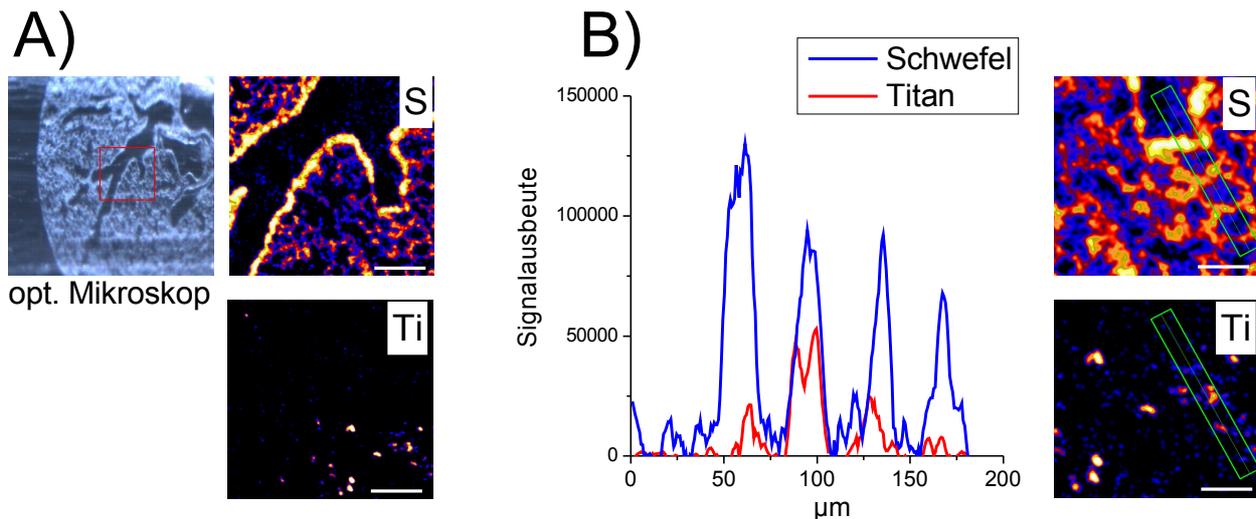


Abb. 3.5.2.1 Darstellung der TiO_2 -NP-Verteilung in Lungengewebe der Maus nach Aerosolexposition mit einer Dosis von $271 \mu\text{g}/\text{m}^3$ für 60 Minuten. **A)** Charakteristische Struktur der Alveolen und einer terminalen Bronchiole in einer Übersichtsaufnahme. Der weiße Balken entspricht jeweils $100 \mu\text{m}$. **B)** Kolo­kalisierung von TiO_2 -NP mit einzelnen Alveolen. Der grüne Bereich in den element-maps wurde als region-of-interest verwendet in dem die Signalausbeute von Schwefel und Titan dargestellt ist. Schwefel wurde als Markerelement zur Identifikation der Alveolen verwendet. Der weiße Balken entspricht jeweils $25 \mu\text{m}$.

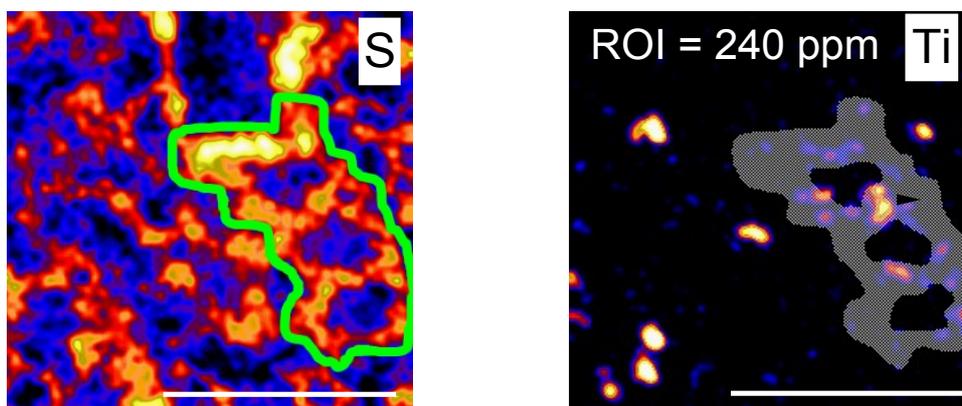


Abb. 3.5.2.2 Konzentrationsbestimmung von TiO_2 -NP in einzelnen Alveolen. Der graue Bereich entspricht der region-of-interest in der die Titan-Konzentration berechnet wurde. Der weiße Balken entspricht jeweils $25 \mu\text{m}$.

Abb. 3.5.2.2 zeigt, dass die Titankonzentration in drei einzelnen Alveolen bei einer Aerosol-Dosis von 271 mg/m^3 und 60 Minuten Expositionsdauer bei 240 ppm liegt. Die Titankonzentration pro einzelner Alveole beträgt somit 80 ppm und liegt im Bereich der Werte, welche für die zellulären Spurenelemente Eisen (140 ppm) und Zink (67 ppm) in unbehandelten Gewebe beobachtet wurden. Eine Änderung der Morphologie des Lungengewebes durch TiO_2 -Aerosolexposition konnte nicht beobachtet werden, da TiO_2 -NP ein geringes Toxizitätspotential zeigen.

3.5.3 Zinkoxid-Aerosol

Abb. 3.5.3 zeigt die Quantifizierung von ZnO -NP in einzelnen Alveolen nach Aerosolexposition. Dabei konnte, im Vergleich zur Kontrolle, keine signifikante Erhöhung des alveolaren Zinkgehalts festgestellt werden (Abb. 3.5.3 B). Andere Elemente wie P, S und Ca, die bei der ZnO Aufnahme in A549-Zellen eine Rolle spielen, blieben ebenfalls auf konstanten Niveau. Da bei der zellulären Aufnahme von ZnO ein toxischer Effekt z.B. durch Nekrose zu erwarten ist¹⁶¹, besteht die Möglichkeit die Morphologie des Lungengewebes durch ZnO -NP zu verändern. Es wurde beobachtet, dass die charakteristische Struktur des Lungengewebes, unabhängig von der ZnO -Dosis, intakt blieb.

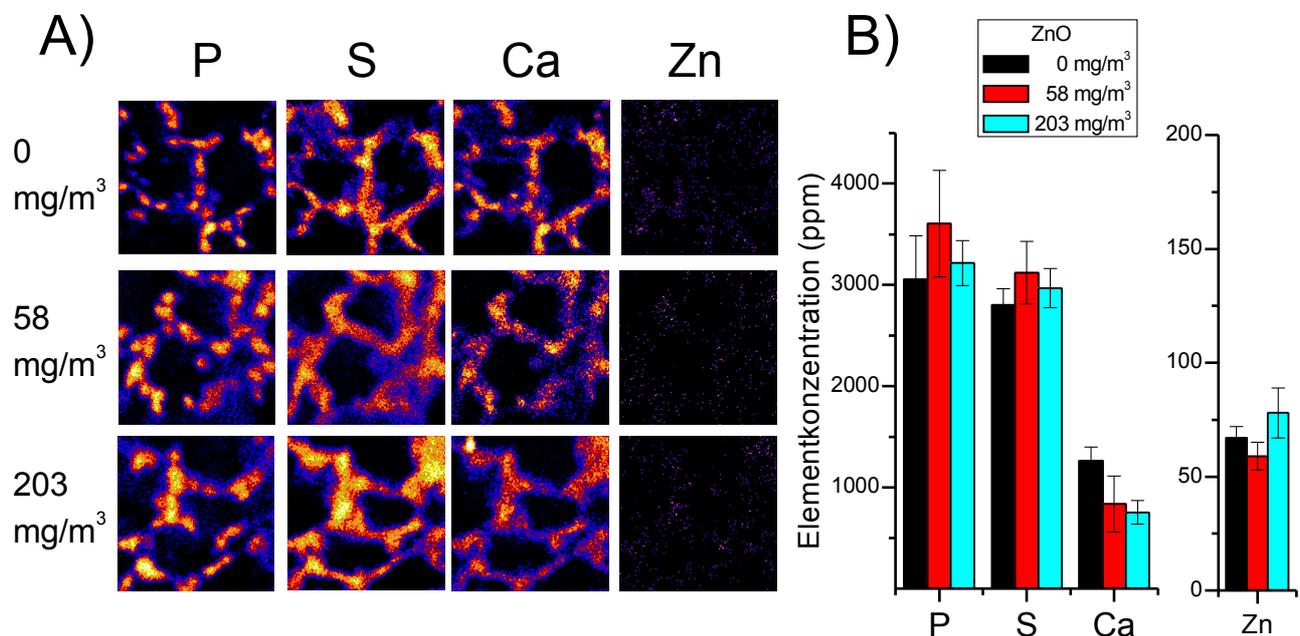


Abb. 3.5.3 Elementgehalt in Lungengewebe der Maus nach Aerosolexposition (0, 58, 203 mg/m^3 , 1 h). **A)** Ortsaufgelöste Elementverteilung in einzelnen Alveolen (P, S, Ca, Zn) in Abhängigkeit der ZnO -Aerosol-Dosis (0, 58, 203 mg/m^3). **B)** Elementkonzentration (ppm bzw. $\mu\text{g/ml}$) einzelner Alveolen nach ZnO -Aerosol-Exposition. Dargestellt ist der Mittelwert und Standardfehler von min. 5 Alveolen aus 3 verschiedenen Mäusen ($n = 3$).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer Applikationszeit von 1h und einer Dosis bis zu 203

mg/m³ die Aufnahme von ZnO-NP in das Lungengewebe durch Barrieren wie z.B. Surfactant aktiv unterbunden wird, oder die Expositionszeit zu kurz für eine Aufnahme der Partikel ist. Bei der Exposition mit ZnO-Aerosol setzte sofort eine Stressatmung ein, welche dazu führte, dass sich die Atmenfrequenz erhöhte¹⁶². Dadurch ist es auch möglich, dass die Partikel nicht bis zu den Alveolen vordringen konnten.

4. Diskussion

4.1 Methodische Diskussion

4.1.1 Probenpräparation und Trägermaterial

Die Ionenstrahlmikroskopie ist eine stark nachgefragte Methode. Andererseits ist sie sehr zeitaufwändig und kostenintensiv. Es gibt nur sehr wenig Ionenstrahlmikroskopie-Anlagen. Deshalb ist die Reduktion der Messzeit für biologische Proben bei trotzdem guter Auflösung von großer praktischer Bedeutung. Da biologische Proben im Allgemeinen eine geringe Dicke und Dichte aufweisen, ist die Signalausbeute bei der Ionenstrahlmikroskopie relativ gering. Im Speziellen ist oft die Detektion der charakteristischen Röntgenstrahlung eines einzelnen Elements geringer zellulärer Konzentration, der kritische Schritt bei der Aufnahme der Messdaten. Um eine möglichst hohe Ausbeute und kurze Messzeit zu erreichen, ist es deshalb erstrebenswert den Abstand zwischen Röntgendetektor und Probe so gering wie möglich zu halten.

Der Raumwinkel (A/r^2) wird als Maß für den Abstand zwischen Probe und Röntgendetektor verwendet, wobei sich die potentielle Detektorfläche mit steigenden Detektorabstand quadratisch verkleinert. Folglich wurde die Probe auf einen Aluminiumrahmen aufgezogen, da die direkte Analyse in der Kulturschale durch den geringen Probenabstand und die Abschirmung der aktiven Röntgendetektorfläche durch den Schalenrand Nachteile bietet. Durch die Übertragung auf den Aluminiumrahmen reduziert sich der Abstand um 13,8 mm, was ungefähr einer Verdopplung des Raumwinkels und damit einer Halbierung der Messzeit entspricht. Ein geringerer Abstand würde die aktive Fläche des RBS-Detektors durch die Abschirmung des Röntgendetektors verringern.

Da das gesamte Präparat auf dem Aluminiumrahmen nicht unter der gleichen mechanischen Spannung steht wie in der Probenschale, wellt sich die Polypropylenfolie gelegentlich etwas auf. Diese Beobachtung zeigt allerdings keinen Einfluss auf die zelluläre Elementkonzentration der Probe, da der Krümmungsradius der Verwerfungen der Folie groß gegenüber der Fläche einer Einzelzelle ist.

In der Ionenstrahlmikroskopie spielt die Wahl des Trägermaterials eine entscheidende Rolle, da dieses oft Elemente enthält, z.B. Kohlenstoff oder Stickstoff, welche ebenfalls in der Probe vorkommen. Durch die Überlappung dieser Elemente im Rückstreupektrum, kann ein Fehler bei der Konzentrationsbestimmung der zellulären Matrix entstehen. Dadurch stellt sich die Frage welches Material zur Analyse von biologischen Material am besten geeignet ist.

Bezüglich des Trägermaterials kommen Siliziumnitrid (Si_3N_4) und Folien auf Kohlenwasserstoff-Basis (Polypropylen) infrage. Siliziumnitrid ist mit 200 nm anstelle von 4 μm ein deutlich dünneres Substrat und enthält keinen Kohlenstoff. Dies prädestiniert das Si_3N_4 -Substrat für die Bestimmung der zellulären Dicke und des Kohlenstoffgehalts in biologischen Proben. Allerdings konnten ähnliche Ergebnisse, bezüglich des Elementgehalts von Kontrollzellen, mit dem Substrat Polypropylenfolie erzielt werden. Zwar überlappen dort das Kohlenstoffsignal von Substrat und Probe, doch beide zeigen durch ihren leicht unterschiedlichen Kohlenstoffgehalt eine unterschiedliche Signalintensität. Dies spiegelt sich durch eine Schulter im RBS-Spektrum wider und erlaubt im Zusammenhang mit dem zellulären Stickstoff- und Sauerstoffsignal ebenfalls eine Bestimmung des zellulären Kohlenstoffgehalts und der zellulären Dicke. Das Si_3N_4 -Substrat ist im Vergleich zu Polypropylenfolie deutlich preisintensiver. Bei deutlich höheren Kosten von 4.63 €/mm², im Vergleich zu 0.02 cent/mm², bietet das Si_3N_4 -Substrat eine wesentlich kleinere potentielle Analysefläche von 4 mm². Dies ist von Nachteil, wenn sich toxisitätsbedingt adhärente Zellen vom Boden ablösen, weshalb Polypropylenfolie zur routinemäßigen Analyse von Lungenzellen durch die Ionenstrahlanalyse besser geeignet ist.

Zusätzlich neigt das Si_3N_4 -Substrat durch die geringe Dicke von 200 nm zum Bruch, was die Handhabung und Lagerung der Präparate erschwert. Da bezüglich der zellulären NP-Analyse die Wahl des Substrats sekundär ist geht aus den oben aufgeführten Ergebnissen hervor, dass Polypropylenfolie ein geeignetes Material zur routinemäßigen Untersuchung des zellulären Elementgehalts nach der NP-Exposition ist.

In speziellen Experimenten spielt die Dehnung der Lungenepithelzellen eine Rolle. Dabei werden die Zellen zur Dehnung auf einem spezifischen Substrat auf Siliziumbasis kultiviert und durch Unterdruck auf diesem gedehnt. Die direkte ionenstrahlanalytische Analyse auf diesem Substrat ist nicht möglich, da dieses relativ elastisch und dick ist. Die Eigenschaften des Substrats führen zur Verformung und Aufladung der Probe in den ersten 15 Minuten der Messung. Wenn Protonen in bzw. auf der Probe akkumulieren, stoßen sie neu einfallende Inzidenzprotonen, durch die identische Ladung ab. Dadurch ist der Wert für die Ladung, welcher die Gesamtzahl der auf die Probe getroffenen Protonen widerspiegelt und für die Berechnung der Konzentration essentiell ist, ungenau. Folglich ist die Analyse gedehnter Lungenepithelzellen ausschließlich nach Trypsinierung und Transfer auf ein geeignetes Substrat, wie z.B. Polypropylenfolie, möglich.

Als Trägermaterial für Kulturzellen wurde dementsprechend Polypropylenfolie von 4 μm Dicke verwendet. Die Folie war frei von Verunreinigungen mit zellulären oder NP-relevanten Elementen.

Präparate von Lungengewebe erfordern eine Einbettung, aus diesem Grund kommt Polypropylenfolie als Träger nicht infrage. Deshalb musste für die Untersuchung von Lungengewebe ein anderer Träger gefunden werden. Standardmäßig kommt das Einbettmittel DePeX, welches eine Mischung aus Xylol, Polystyren und Phthalaten ist, zum Einsatz. Allerdings zeigte DePeX eine deutliche Verunreinigung mit Zink, welche in einem inhomogenen Muster auftrat. Somit ist dieses Trägermaterial für die Analyse von Lungengewebe, welches mit Zinkoxid-NP behandelt wurde, ungeeignet, da es nicht möglich war, den Zinkgehalt des Trägers vom zellulären Zinkgehalt zu trennen. Im Fall von Eisen konnte eine sehr geringe Eisenkontamination im unteren einstelligen ppm-Bereich beobachtet werden. Da Eisen in DePeX homogen verteilt war, wurde der Messwert durch Subtraktion des Eisen-Untergrunds korrigiert. Xylol wird u.a. durch Methylierung von Toluol oder Benzol hergestellt. Da bei diesen Methylierungsreaktionen u.A. Zink als Katalysator eingesetzt wird¹³¹, kann dies die Ursache für die Verunreinigung sein. Um ZnO behandeltes Lungengewebe analysieren zu können, wurde deshalb Limonen als Trägermaterial eingesetzt. Es zeigt bei einem ähnlichen Brechungsindex im Vergleich zu DePeX ein geringeres Toxizitätspotential. Allerdings lässt sich, bedingt durch die geringe Elastizität von Limonen, das eingebettete Lungengewebe nur sehr schwer vom Objektträger ablösen. Diese Einschränkung konnte durch die Mischung mit dem natürlichen Weichmacher Campher aufgehoben werden.

4.1.2 Ladungsbestimmung

Die Ladung nimmt eine Schlüsselrolle bei der Quantifizierung der zellulären Elemente ein, da sie die Gesamtzahl der mit der Probe in Wechselwirkung getretenen Protonen widerspiegelt. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, welche Methode am besten geeignet ist, um die Ladung über den Messzeitraum zu integrieren.

Prinzipiell ist es am Lipsion möglich die Ladung über den Faraday-Becher hinter der Probe oder durch Ableiten des Stroms direkt von der Probe bzw. der Aperturblende zu bestimmen. Daneben ist der Fit des RBS-Spektrums durch Simulation eine etablierte Methode zur Ladungsbestimmung. Die Messung der Ladung durch direkte Ableitung von der Probe ist schwierig, da ein biologisches Präparat in der Regel einen Isolator darstellt. Es kann indirekt durch das Bedampfen mit Aluminium eine dünne Schicht (< 100 nm) auf die Probe aufgebracht werden. Auf diesem Weg entstehen Ladungswerte für das gesamte Scanfeld, welche mit den Werten der Simulation oder des Faraday-Bechers korrelieren. Allerdings erschwert die Aluminiumschicht die Identifikation einzelner Zellen durch das optische Mikroskop hinter der Probe und verlängert so die benötigte Messzeit pro Zelle. Eine weitere Methode besteht darin, den abgeleiteten Strom von der Apertur-Blende mit dem Strom

im Faraday-Becher vergleichen. Bei einer Kalibration ohne Probe wird ein Faktor gebildet, welcher später dazu dient die Ladung aus dem Strom der Apertur-Blende zu berechnen⁸⁰.

Der Vorteil dieser Methode ist, Fehler, welche durch Streueffekte bei der Faraday-Becher-Messung hinter der Probe entstehen können, zu eliminieren. Ein Nachteil ist die Voraussetzung, dass der Messstrom über den gesamten Zeitraum der Datenaufnahme konstant ist. Das ist jedoch im Messbetrieb nicht immer gegeben, da der Protonenstrom in Abhängigkeit der Protonenquelle bzw. den Parametern des Teilchenbeschleunigers variiert. Es wurden z.B. Perioden beobachtet bei denen der Messstrom in einem Zeitraum von 30 Minuten zwischen ungefähr 2 und 50 % schwankte.

Wird die Ladung hinter der Probe durch den Faraday-Becher integriert, besteht die Gefahr, dass einige Protonen nicht im Faraday-Becher detektiert werden können, da der Protonenstrahl durch die Probe gestreut wird. Insgesamt ist jedoch die Streuung einer biologischen Probe gering, da die Probe relativ dünn ist und die Dichte von etwa 1 g/cm^3 vergleichsweise gering ausfällt.

Hauptsächlich trägt Kohlenstoff zur Rückstreuung bei. Obwohl dieses Element, durch die geringe Elektronenzahl, einen ausgeprägten nicht-Rutherford-Effekt zeigt, sind die Wirkungsquerschnitte dieses Elements für viele experimentelle Parameter, wie z.B. den Rückstreuwinkel, sehr genau charakterisiert. Aus diesem Grund ist die Ladungsbestimmung durch Simulation des RBS-Spektrums eine etablierte Methode mit einem relativ geringen Fehlerpotential. Dabei korreliert die Signalintensität im RBS-Spektrum linear mit der Anzahl der auf die Probe getroffenen Partikel.

Zur Simulation bzw. Auswertung der RBS-Spektren ist die Software SIMNRA 6.0 verwendet worden. Diese bietet gegenüber anderen etablierten Programmen auf diesem Gebiet (RUMP) den Vorteil, durch die Windows-Oberfläche eine große Zahl einzelner Spektren schnell handhaben zu können, was bei der Einzelzellanalyse von Vorteil ist. Zusätzlich sind die nicht-Rutherford-Wirkungsquerschnitte für verschiedene Atome und Winkel bereits im Programm enthalten.

Ergänzend soll erwähnt sein, dass die Ladung für jede Einzelzelle spezifisch ist, sie macht einen Bruchteil der Ladung der gesamten Scanfläche aus. Um diesen Wert zu erhalten, wird mittels GeoPIXE eine ROI festgelegt und für diesen Bereich ein RBS-Spektrum extrahiert. Da für alle hier aufgeführten Messergebnisse eine konstante Triggerzeit pro Pixel gilt, verhält sich die Teilladung anteilig zur Gesamtfläche des Scans. Wird die totale Ladung des Scanfelds zur Konzentrationsbestimmung der Einzelzelle verwendet, würde dies zu einem systematischen Fehler führen, da auch Rückstreuereignisse des Trägers in zellfreien Bereichen in die Ladungsbestimmung eingehen. Auch große Unterschiede in der Probendicke können so nicht berücksichtigt werden.

4.1.3 Grenzen und Möglichkeiten des Elementnachweises

Der Röntgendetektor besteht im Strahlengang aus verschiedenen Materialien, welche prinzipiell in der Lage sind die charakteristische Röntgenstrahlung biologischer Elemente zu absorbieren. Um einen dadurch bedingten Fehler bei der Quantifizierung zu berücksichtigen, ist es notwendig das Absorptionsvermögen dieser Materialien zu charakterisieren. Insbesondere der Gold-Frontkontakt zeigt bei 2,3 keV eine Absorptionslinie, welche genau der charakteristischen Röntgenstrahlung von Schwefel entspricht. Daneben absorbiert eine zum Schutz des Röntgendetektors vor zurückgestreuten Photonen installierte Polyethylen-Folie Photonenenergien welche kleiner als 4 keV sind. Unterhalb von 2 keV fällt die Effizienz des in dieser Arbeit eingesetzten Germanium-Röntgendetektors stark ab. Aus diesem Grund wurde für die Quantifizierung der Elemente Phosphor und Aluminium jeweils ein Korrekturfaktor eingeführt. Um die Elemente unterhalb von 2 keV besser quantifizieren zu können ist ein zusätzlicher Detektor auf Siliziumbasis geeignet, da dieses Material weniger Escape-Peaks produziert und ein höheres Bremsvermögen aufweist. Insgesamt ist die Methode der Ionenstrahlmikroskopie geeignet, die Konzentration biologischer Elemente in einem Bereich der charakteristischen Röntgenstrahlung von ca. 2 bis 24 keV zu bestimmen. Der Fehler liegt dabei in einem Bereich von +/- 10 %. Für die Elemente Silizium, Natrium, Magnesium, Aluminium und Phosphor, welche eine charakteristische Röntgenstrahlung unterhalb von 2 keV zeigen, entsteht durch die geringe Detektoreffizienz ein höherer Fehler, weshalb für diese Elemente eine Korrekturfaktor eingeführt wurde.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die biologisch relevanten Elemente Schwefel, Chlor, Kalium, Kalzium, Eisen und Zink sowie die NP-relevanten Elemente Titan, Aluminium und Cerium durch die Ionenstrahlmikroskopie mit einem relativ geringen Fehler von +/- 10% quantifizierbar sind. Im Kalibrierten Bereich liegt dabei die Nachweisgrenze im einstelligen ppm-Bereich¹¹².

Es ist möglich, die Konzentration eines Elements bei Überlappung mit einem anderen Element zu bestimmen, wenn ein isolierter peak vorliegt. Beispielsweise überlappen im Fall von Silber die L-Linien dieses Elements mit den K-Linien von Kalium und Calcium zwischen 3 – 4 keV. Ist ein isoliertes Silber-Signal (K_{α} 22 keV) zu erkennen, so ist die Quantifizierung von Silber durch die L-Linie durchführbar. Wenn allerdings alle Teile des Signals (z.B. K_{α} & K_{β}) mit dem Signal eines anderen Elements vollständig überlappen ist der Fehler bei der Konzentrationsbestimmung sehr hoch. Eine vollständige Überlappung der Signale zweier verschiedener Elemente konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Unterhalb von 2 keV kann unabhängig vom Element oft ein peak-fronting zu beobachtet werden. Die Ursache hierfür kann mit der geringen Detektoreffizienz unterhalb von 2 keV erklärt werden. Diese Beobachtung kann durch die Installation eines zweiten Detektors (z.B. Röntgendetektor auf Siliziumbasis), mit besserer Effizienz in diesem Bereich, korrigiert werden.

4.2 Analyse des zellulären Rückstreusignals

Die RBS-Analyse wurde eingesetzt, um das Verhältnis der zellulären Matrixelemente (C, H, N, O) und die zelluläre Dicke durch das Signal zurückgestreuter Inzidenzteilchen zu ermitteln. Der typische Kohlenwasserstoffgehalt von A549-Zellen ($C_{7.4}H_{13.5}N_{2.0}O_{0.8}$), primären Lungenzellen ($C_{7.9}H_{13.4}N_{1.8}O_{0.6}$) und Lungengewebe ($C_{7.7}H_{15.2}N_{0.5}O_{0.5}$) korreliert mit dem für Hirngewebe ionenstrahlanalytisch ermittelten Kohlenwasserstoffgehalt ($C_8H_{10}N_{0.8}O_{0.3}$) einer früheren Arbeit¹⁶³. Daneben knüpfen die Daten dieser Arbeit an publizierte Werte für den Elementgehalt von *E. Coli* ($C_{6.2}H_{10}N_{2.6}O_{1.4}$) und *S. Cerevisiae* ($C_{5.5}H_{10}N_{2.9}O_{0.9}$) an^{164 165}. Der erhöhte Stickstoff- oder Sauerstoffgehalt in Hefe und Bakterien, kann u.a. durch deren, komplexen Aufbau der Zellmembran durch Polysaccharide und Glykoproteine begründet werden.

Die Konzentration des zellulären Wasserstoffgehalts lässt sich nur indirekt als Ergänzungswert bestimmen, da das Wasserstoffatom zu leicht ist um ein Rückstreueignis zu erzeugen. Eine direkte Quantifizierung des zellulären Wasserstoffgehalts ist mittels ERDA (Elastic Recoil Detection Analysis) und Koinzidenzanalyse möglich. Dort treffen das Inzidenzteilchen (H^+) und das aus der Probe gestoßene Wasserstoffatom, auf Grund der Kinematik der (p,p)-Streuung, im Winkel von 90° gleichzeitig in zwei verschiedene Detektoren.

Primäre Lungenzellen zeigen in der RBS-Analyse eine deutliche geringere Dicke im Vergleich zu A549-Zellen (14000×10^{15} Atome/cm²) und Lungengewebe (90000×10^{15} Atome/cm²). Die Dicke dieser Zellen (4800×10^{15} Atome/cm²) beträgt im Mittel ca. ein Zehntel der Dicke des Trägers. Da das zelluläre RBS-Signal von Kohlenstoff mit dem des Trägers überlappt, besteht die Wahrscheinlichkeit eines höheren Fehlers bei der zellulären Dickebestimmung von primären Lungenzellen. Allerdings ist die Position und Intensität des Sauerstoff- bzw. Stickstoffsignals ebenfalls von der zellulären Dicke abhängig und diese Signale können isoliert analysiert werden.

Im Gegensatz zur Analyse von Kulturzellen wurde bei der Analyse von Lungengewebe ein anderer Träger eingesetzt, welcher in der Regel eine größere Dicke aufweist. Dadurch wurde die maximale Analysetiefe der RBS-Methode oft erreicht. Auf Grund des unterschiedlichen Kohlenstoffgehalts

von Präparat ($C_{7.7}H_{15.2}N_{0.5}O_{0.5}$) und Träger DePeX ($C_{10.8}H_{12.8}O_{0.4}$) oder Limonen ($C_{9.1}H_{60.2}O_{1.8}$) konnte die Dicke des Schnittes ermittelt werden. Bei besonders dicken Trägerschichten kam es auch bei relativ geringen Strömen (~ 300 pA) zur Aufladung der Probe. In diesem Fall ist keine quantitative Analyse möglich, da die Ausbeute der Röntgenfluoreszenz durch die in der Probe deponierten Protonen negativ beeinflusst wird und die Bremsstrahlung unverhältnismäßig stark ansteigt.

Eine Analyse des Bremsvermögens von Polypropylenfolie (C_3H_6 , 0.92 g/cm³) ergab, dass die Protonen eine maximale Penetrationstiefe von $80 - 90$ μ m erreichen. Da der zelluläre Massenanteil der NP im ppm-Bereich liegt und somit gering ausfällt, ist keine starke Veränderung der zellulären Dichte durch die NP-Aufnahme zu erwarten. Folglich werden die Lungenzellen immer vollständig durch das RBS-Signal erfasst, da die Zelldicke deutlich unter 80 μ m liegt. In Ausnahmefällen konnte bei extrem hohen zellulären NP-Konzentrationen eine starke Streuung der Inzidenzteilechen beobachtet werden. Diese führte dazu, dass die Zelldicke nicht bestimmt werden konnte.

Bei den Proben der Kulturzellen konnte ein peak-fronting beobachtet werden, welches etwa 10% des Maximums von Kohlenstoff entspricht und bis zum Anfang des Spektrums bei 0 keV reicht. Dieses Signal konnte dem Rückstreusignal des Kohlenstoffs aus dem Faraday-Becher zugeordnet werden, welcher sich auf der Strahlachse hinter der Probe befindet. Da diese Protonen die gesamte Probe erneut passieren müssen, bevor sie in den RBS-Detektor treffen, findet keine Addition mit den zellulären Rückstreueignissen von Kohlenstoff statt. Somit bleibt die zelluläre Ladung durch das Rückstreusignal des Faraday-Bechers unbeeinflusst.

Zellelemente sind im Vergleich zu Matrixelementen durch die Rückstreuanalyse nicht eindeutig identifizierbar, da ihr Signal zu gering ist oder sie im Rückstreuspektrum sehr nahe beieinander liegen. Da die aufgenommene NP-Menge pro Zelle sehr klein sein kann, spielt der Wirkungsquerschnitt des jeweiligen NP-Rückstreusignals eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang sind ZnO und CeO₂ besonders geeignet, da sie im Vergleich zu Al₂O₃, Fe₂O₃ und TiO₂ eine deutlich höhere Ausbeute des Rückstreusignals aufweisen. Folglich konnte bei geringen Konzentrationen von Al₂O₃, Fe₂O₃ und TiO₂, welche oft in Anwesenheit einer Proteinkorona auftraten, kein zelluläres NP-Rückstreusignal detektiert werden.

Das zelluläre NP-Rückstreusignal ist von Ausnahmen abgesehen, generell nicht geeignet, die zelluläre Konzentration des Partikels zu bestimmen. Allerdings liefert dieses Signal eine qualitative

Information über die zelluläre Position des Partikels. Im Fall der NP-Aufnahme werden die Partikel durch eine zusätzliche Zellschicht bedeckt, was einen zusätzlichen Energieverlust bedeutet. Dadurch wird das Rückstreusignal des NP im Vergleich zum Oberflächensignal zu niedrigen Energien verschoben und es ist möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob der NP an der Zelloberfläche oder intrazellulär lokalisiert ist. In dieser Arbeit wurde die Aufnahme von ZnO, CeO₂ und Al₂O₃ durch das Rückstreusignal untersucht. Dabei zeigte das Rückstreusignal von Al₂O₃ als einziger NP eine Überlappung mit einem zellulären Element (Natrium). Allerdings korreliert der Natriumgehalt mit dem Gegenion Chlor, so dass sich das Aluminium-Rückstreusignal oft vom zellulären Untergrund abhebt.

Die Analyse des Rückstreusignals von primären AT-II-Zellen war nicht aussagekräftig, da diese im Vergleich zu A549-Zellen deutlich dünner sind. Die Verschiebung des Rückstreusignals durch die zelluläre Aufnahme liegt hier im Bereich des Auflösungsvermögens des RBS-Detektors (ca. 16 keV).

Sind die Partikel an der Zelloberfläche lokalisiert, kann auf Grund der Membrangröße von ca. 100 nm mit der RBS-Methode nicht entschieden werden, ob die Partikel extrazellulär assoziiert oder an der Innenseite der Membran lokalisiert ist. Die Verschiebung wäre kleiner wie die Auflösung der RBS-Methode, denn eine Auflösung des RBS-Detektors von 10 keV entspricht ungefähr einer Z-Achsen-Auflösung von 400 nm. Eine Methode welche geeignet ist die NP-Position an der Zellmembran darzustellen ist die Transmissionselektronenmikroskopie, da dort die Auflösungsgrenze unter einem Nanometer liegt.

4.3 NP-Nachweis in Lungengewebe

Pneumozyten im Lungengewebe können im Vergleich zur Zellkultur ein anderes Aufnahmeverhalten für NP zeigen, da sie der Atmung unterliegen und im Zellverbund auf NP reagieren können. Es ist beispielsweise bekannt, dass gedehnt kultivierte Typ 2 Pneumozyten kurzzeitig erhöhte Kalziumwerte aufweisen und mehr Surfactant sekretieren¹³⁴. Dies erhöht die alveolare Barriere für NP, da Surfactant-Proteine (z.B. SP-A) die NP direkt binden können und so die Phagozytose durch Makrophagen beschleunigen²⁹. Für die Risikobewertung der NP ist entscheidend, dass die NP-Quantifizierung unter realistischen Bedingungen durchgeführt wird. Dazu ist es erforderlich die NP-Konzentration in Lungengewebe im natürlichen Zellverbund zu untersuchen, da diese wie oben beschrieben die NP-Aufnahme durch eine höhere alveolare Barriere entscheidend beeinflusst.

Da die Präparate zur Gewebeanalyse durch die Einbettung in das Trägermaterial DePeX deutlich

dicker sind und einen ähnlichen Kohlenstoffgehalt wie das Präparat zeigen, besteht die Gefahr, dass sich die Probe auflädt bzw. die Dicke des Präparats nur unzureichend im Rückstreuungsspektrum erkennbar ist. Die Präparate für die Gewebeanalyse wurden mittels Mikrotom in einer Dicke von 10 μm angefertigt. Bei Polypropylenfolie entsprechen $40000 \cdot 10^{15}$ Atome/ cm^2 einer geometrischen Dicke von 4 μm . Eine typische gemessene Dicke für ein Gewebepräparat war $90000 \cdot 10^{15}$ Atome/ cm^2 , was folglich einer geometrischen Dicke von ca. 9 μm entspricht. Da die experimentell ermittelte Dicke sehr nah an dem Wert der Schnittdicke des Mikrotoms liegt, kann somit ein Fehler durch eine ungenaue Dickebestimmung ausgeschlossen werden.

Erstmalig konnte die Elementgehalt und NP-Aufnahme in Lungengewebe und einzelnen Alveolen ortsaufgelöst dargestellt werden. Daneben erlaubt die Ionenstrahlmikroskopie einzelne Zellen innerhalb einer Alveole zu identifizieren. Allerdings besteht Lungengewebe aus einer Mischung verschiedener Zelltypen (Typ I oder II Pneumozyten, Makrophagen, Bindegewebe), weshalb für einen Vergleich der NP-Aufnahme mit den Experimenten der Zellkultur eine Markierung des jeweiligen Zelltyps erforderlich ist. Dafür können beispielsweise Antikörper eingesetzt werden, welche mit Gold-NP konjugiert sind.

Bei dem Studium der Nanopartikelaufnahme ist insbesondere die Markierung der alveolaren Makrophagen sinnvoll, da sie zusätzlich NP phagozytieren können. Allerdings ist die Anzahl von Makrophagen im Lungengewebe mit einem Anteil unter 10 % eher gering^{166 167}, weshalb die Anzahl von makrophagentypischen CD14-Rezeptoren als limitierender Faktor zum Nachweis dieser Zellen angesehen werden kann. Bei der Annahme, dass sich ca. 100000 CD14-Rezeptoren¹⁶⁸ auf der Oberfläche ($514,8 \mu\text{m}^2$)¹⁶⁹ eines Makrophagen befinden und jeder dieser Rezeptoren einen Antikörper mit einem Gold-NP von 10 nm Durchmesser bindet, ergibt sich eine Gold-Konzentration auf der Makrophagenoberfläche von $1,9 \text{ fg}/\mu\text{m}^2$. Eine vergleichbare Standard-Messung mit Gold-NP auf Polypropylenfolie ($95,5 \text{ fg}/\mu\text{m}^2$) lieferte ein deutliches Signal für Gold. Aus dieser Betrachtung geht hervor, dass trotz einer geringen Rezeptorenanzahl die Markierung von einzelnen Zelltypen mit Gold-Antikörpern im Lungengewebe möglich ist.

Bezüglich des NP-Nachweises in Lungengewebe wurden die Exposition mit ZnO- und TiO₂-Aerosol untersucht. Das Ziel war es, den Elementgehalt pro einzelner Alveole zu bestimmen. Im Lungengewebe waren keine ZnO-NP zu erkennen, da ZnO-Aerosol (0 – 203 mg/m^3 , 1h) die Zink-Konzentration von Lungengewebe nicht erhöhte. Offensichtlich ist eine längere Inkubationszeit als 60 Minuten notwendig um eine Aufnahme der ZnO-NP in die Alveolen zu erreichen. Es ist aber auch denkbar, dass die von ZnO-NP induzierte Stressatmung¹⁶² das Vordringen der ZnO-NP zu den

einzelnen Alveolen verhindert.

Im Fall von TiO₂-Aerosol (271 µg/m³, 60 Minuten) konnten einzelne Partikel pro Alveole quantifiziert werden. Die mittlere TiO₂-Konzentration pro Alveole liegt bei ca. 80 ppm. Allerdings fällt die Extrembelastung pro einzelner Zelle deutlich höher aus, da die Partikel sehr inhomogen verteilt sind und sich in eigenen Regionen der jeweiligen Alveole stark aufkonzentrieren. Hier besteht der Vorteil der Ionenstrahlmikroskopie darin, einzelne Zellen der Alveole analysieren zu können, um so die Extrembelastung pro einzelner Zelle quantitativ anzugeben.

Bei der Untersuchung von gedehnten primären AT-II-Zellen zeigte sich im Vergleich zu Lungengewebe ein ähnliches Ergebnis. Dort schwankt die CeO₂-Konzentration pro Zelle sehr stark, was ebenfalls eine große Extrembelastung für bestimmte Zellen bedeutet. Gleichzeitig zeigen die Experimente mit gedehnten primären AT-II-Zellen, dass durch die Dehnung weniger CeO₂-NP aufgenommen werden. Dies bestätigt das Lungenzellen unter natürlichen Bedingungen, wie z.B. der Dehnung, eine höhere alveolare Barriere für NP aufweisen.

Die Ergebnisse sind jedoch nicht direkt vergleichbar, da bei den Experimenten mit Lungengewebe die NP in Aerosolform appliziert werden und bei Kulturzellen eine NP-Lösung verwendet wird. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird auch dadurch eingeschränkt, dass in Lungengewebe die Konzentration pro Alveole und in Kulturzellen pro spezifischer Einzelzelle bestimmt wurde.

Durch die größere alveolare Barriere im Fall von Lungengewebe liegt die Stärke der Ionenstrahlmikroskopie darin, die wirksame intrazelluläre Dosis zur Beurteilung der Aufnahme und Toxizität der NP zu verwenden. Dadurch wird es möglich, das Risiko von NP in *in vitro*-Tests schneller abschätzen zu können und gleichzeitig die Anzahl von Tierexperimenten zu reduzieren. Um die Aussagekraft der NP-Aufnahme in Experimenten mit Kulturzellen zu erhöhen, ist es notwendig die Bedingungen im Lungengewebe zu simulieren. Dazu ist beispielsweise eine Kokultur mit Makrophagen geeignet¹⁷⁰, da diese Zytokine sezernieren können und durch Phagozytose die NP-Aufnahme beeinflussen.

4.4 Elementgehalt von Lungenepithelzellen

4.4.1 Allgemeiner Nachweis des zellulären Elementgehalts

In dieser Arbeit ist die zelluläre Position und Konzentration von Metalloxid-NP (Al_2O_3 , TiO_2 , CeO_2 , ZnO , Fe_2O_3) jeweils auf Einzelzellebene dargestellt. Dabei wurden ZnO und CeO_2 näher untersucht. ZnO zeigt den stärksten toxischen Effekt und CeO_2 wird bei moderater Toxizität in großer Menge aufgenommen. Zusätzlich überlappt das Rückstreusignal dieser NP nicht mit den Signalen zellulärer Elemente.

Die zelluläre Verteilung aller untersuchten NP ist, mit Ausnahme geringer ZnO -Konzentrationen, überwiegend inhomogen. Dies kann durch die intrazelluläre Prozessierung erklärt werden, da NP i.d.R. endozytotisch aufgenommen werden. Im Fall von ZnO -NP befinden sich freie Zinkionen in relativ hoher Konzentration im Zytosol. Deshalb ist bei diesen NP u.U. eine homogene Verteilung von Zink zu erkennen.

Die Auflösung der routinemäßigen ionenstrahlanalytischen Konzentrationsbestimmung mittels PIXE liegt bei ca. $1,0 \mu\text{m}$ für die X- und Y-Achse. Eine Tiefenanalyse der NP-Position gelingt durch das Rückstreusignal des NP. Dort hängt die Auflösung der Z-Achse von der Dichte der Probe und der Auflösung des RBS-Detektors ab. Eine Untersuchung mittels der Software SIMNRA, unter Berücksichtigung der in Kap. 3.1.1 aufgeführten Werte für die zelluläre Komposition, zeigt für das Cerium-Signal eine Verschiebung von $31,1 \text{ keV}$, wenn dieses von einer zellulären Schicht der Dicke $0,18 \text{ mg/cm}^2$ ($10000^{15} \text{ Atome/cm}^2$) bedeckt ist. Unter Berücksichtigung der genannten Komposition und einer theoretischen Dichte von 1 g/cm^3 für zelluläres Material entspricht dies 58 nm/keV . Bei einer routinemäßigen RBS-Detektorauflösung von $\text{FWHM} = 13,8 \text{ keV}^{103}$ ergibt sich für die Tiefenauflösung ein mit der horizontalen und vertikalen Auflösung vergleichbarer Wert von 800 nm . Die totale Analysetiefe des RBS-Signals liegt im Modellsystem Polypropylenfolie ungefähr bei einer Penetrationstiefe von $80 \mu\text{m}$ (Abb. 3.1.2). In der Praxis kann der Wert allerdings darunter liegen, weil durch die Rauigkeit der fixierten Zelloberfläche mehr Streueffekte auftreten können und die zurückgestreuten Protonen von der Probe absorbiert werden können. Allerdings stellt das Limit der RBS-Analysetiefe keine Einschränkung bezüglich der Bestimmung der Z-Position des NP dar, da Einzelzellen eine relativ geringe Dichte aufweisen und meist eine Dicke im einstelligen Mikrometerbereich zeigen.

Generell ist es mit der ionenstrahlanalytischen Bestimmung des Elementgehalts nicht möglich freie Ionen zu identifizieren. Allerdings ist es im Vergleich zu anderen Methoden, wie z.B. der Transmissionselektronenmikroskopie, möglich die zelluläre Konzentration dieser Ionen zu

ermitteln. Dies ist insbesondere bei ZnO-NP relevant, da diese durch freie Ionen toxisch wirken können bzw. diese Ionen lysosomal entstehen. Aus diesem Grund wurden Zinkionen ergänzend fluoreszenzspektrometrisch analysiert*. Die dafür optimierten Farbstoffe sind für gängige physiologische Elemente (Zn, Fe, Ca) verfügbar und hoch spezifisch. Allerdings kann die Bindung durch konkurrierende Ionen, wie z.B. Ca, beeinflusst werden und die Analyse ist auf ungebundene Ionen beschränkt. Da allerdings der zelluläre Ionen-Puffer, welcher hauptsächlich von Methallothionein realisiert¹⁷¹ wird, mit Ionen aus dem Zellmetabolismus im Austausch steht, ist die freie intrazelluläre Ionenkonzentration eine aussagekräftige Größe. Insgesamt ergab sich, dass die intrazelluläre freie Zinkionenkonzentration deutlich mit der applizierten ZnO-Dosis und der ionenstrahlanalytisch ermittelten zellulären Zinkkonzentration korreliert. Dies bestätigt, dass Zinkionen für den toxischen Effekt von ZnO-NP verantwortlich sind.

Die Elementkonzentration von Kontrollzellen (A549-Zellen) ohne NP-Behandlung wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten (bspw. 24, 48, 72 h) und bei verschiedenen Serumkonzentrationen (FKS 10 % bzw. 0 %) untersucht. Bezüglich Schwefel ergab sich eine leicht verminderte Konzentration von ca. 1100 ppm in Abwesenheit von Serum. Bei Phosphor, welches ebenfalls als zelluläres Strukturelement gilt, zeigt sich keine Änderung. Generell zeigen verschiedene Kultivierungsperioden keinen Einfluss auf die zelluläre Elementkonzentration. Ebenso zeigen die Konzentrationen der wichtigen Spurenelemente Fe und Zn, unter Berücksichtigung der Parameter Zeit und Serumgehalt, keine Veränderung. Dies ist zu erwarten, da der zelluläre Metabolismus als Homöostase beschrieben werden kann und alle Elemente die keiner Schwankung unterliegen im Kulturmedium vorkommen¹⁷².

4.4.2 Elementgehalt von Lungenepithelzellen im Kontext zu anderen Zelltypen

Generell ist der Elementgehalt der strukturgebenden Elementen Phosphor und Schwefel erwartungsgemäß am größten. Die Phosphor- und Schwefelkonzentration wird nicht durch den Präparationsprozess beeinflusst, obwohl der PBS-Puffer Phosphat-Ionen in großer Menge enthält. Aus diesem Grund eignet sich Phosphor und besonders Schwefel, wie von C. Jeynes et al. Aufgeführt, als internes zelluläres Standardelement⁴⁵. Gleichzeitig zeigt sich durch den Einsatz eines ionenfreien Polyethylenglykol-Waschpuffers, dass der zelluläre Elementgehalt von Ca, K, Na und insbesondere Cl durch die Waschprozedur mit PBS stark verfälscht wird. Wenn das nicht physiologische Element Rubidium mit einer Konzentration von 22.7 mM im Waschpuffer präsent ist, steigt dessen zelluläre Konzentration auf Werte an, die charakteristisch für die strukturgebenden

* Dissertation Christoph Sandner

Elemente hoher Konzentration sind (P, S). Andererseits bleiben die Konzentrationen für Spurenelemente wie Eisen oder Zink nach der Waschprozedur konstant. Kohlenwasserstoff-Moleküle wie PEG oder auch Ficoll können aber auch an die Zelle binden und so deren Gehalt für Kohlenstoff, Wasserstoff oder Sauerstoff verändern. Da als Inzidenzteilchen Protonen verwendet werden, kann insbesondere der Wasserstoffgehalt der Probe die Berechnung aller PIXE-sensitiven Elementkonzentrationen durch die RBS-Analyse beeinflussen. Daneben kann durch die zelluläre Assoziation von Kohlenwasserstoff-Molekülen die Ladungsbestimmung beeinträchtigt werden, da diese hauptsächlich über die RBS-Analyse des Elements Kohlenstoff realisiert wird. Das Ausmaß all dieser Effekte ist allerdings eher gering einzuschätzen, da bspw. mehrmaliges Waschen mit Methanol nach der Fixierung den zellulären Chlorgehalt ähnlich reduziert. Allerdings ist durch die potentiell aufgeführten Fehlerquellen vom routinemäßigen Einsatz von PEG als Waschlösung abzuraten.

Ortega et al. führt auf, dass bei Nierenzellen (PC12) ein kurzes Waschen von einigen Sekunden mit deionisiertem Wasser (millipore H₂O) vor der Fixierung, zellulär assoziierte Pufferionen entfernen kann¹³⁰. Bei A549-Zellen führt diese Prozedur zur raschen Freisetzung des Zytosols und kann nicht empfohlen werden. Zwar kann durch die Methanol-Fixierung ebenfalls die Zellwand zerstört werden, allerdings führt das verhältnismäßig kleine zelluläre Volumen in Bezug auf die große Menge von Methanol (-20°C) zum rascheren Gefrieren des Zytosols. Das Eis löst sich anschließend im Methanol und wird durch dieses ersetzt (Freeze Substitution). Ein osmotischer Schock wird vermieden, da der Phasenübergang von flüssig zu fest im Millisekundenbereich abläuft und durch den Austausch des Zytosols durch ein nicht polares Lösungsmittel ist dies der schonenste Art, um wasserlösliche Stoffe in einer fixierten Struktur zurückzuhalten¹⁷³.

Im folgenden sind die Elementkonzentrationen verschiedenster Zelltypen im Vergleich zu den in Leipzig ionenstrahlanalytisch ermittelten Daten für Lungenepithelzellen dargestellt (Tabelle 4.4.2). Meist wurden die Daten anderer Gruppen mittels Elektronenstrahlmikroanalyse ermittelt und in mmol/kg Trockengewicht angegeben. Zum Vergleich ist dieser Wert in Tabelle 4.4.2 mit Hilfe der Molmasse in ppm ($\mu\text{g/g}$ Trockengewicht) dargestellt. Im Vergleich zur Elektronenstrahlmikroanalyse ist am Lipsis, bedingt durch die geringe Detektoreffizienz unterhalb von 2 keV, die quantitative Analyse von Natrium und Magnesium mit einem großen Fehler behaftet. Allerdings erlauben Protonen als Inzidenzteilchen, durch das hohe Signal/Untergrund-Verhältnis, den quantitativen Nachweis der medizinisch wichtigen Spurenelemente Eisen und Zink.

Tabelle 4.4.2 Übersicht zwischen Elementkonzentrationen von Lungenepithelzellen und anderen Zelltypen ohne Nanopartikel Exposition. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte (in ppm ($\mu\text{g/g}$) Trockengewicht) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten ermittelt durch Elektronenstrahlmikroanalyse (ESMA) oder partikelinduzierte (H^+) Röntgenemission (PIXE bzw. Lipsion). Die Kultivierung von A549-Zellen und AT-II-Zellen erfolgte in Anwesenheit von 10 % FKS, da die anderen Zelltypen meist aus Geweben stammen und dies die natürlichen Bedingungen im Gewebe am besten widerspiegelt. (--) entspricht keiner Angabe bzw. der Wert ist nicht mit der entsprechenden Methode zugänglich.

Zelltyp (jeweils Kontrolle)	Quelle	Analyse	P	S	Cl	Ca	K	Fe	Zn
U937 (Makrophagen) ¹⁷⁴	hum. Zelllinie	ESMA	9238	--	5460	84	15288	--	--
Acanthamoeba castellanii ¹⁷⁵	Bakterium	ESMA	15252	7200	6055	320	8970	--	--
Axon (optischer Nerv) ¹⁷⁶	Ratte (Gewebe)	ESMA	14291	--	11725	120	57135	--	--
ATII (Lungenepithelzelle) ¹⁷⁷	Ratte (Gewebe)	ESMA	17019	8896	5530	264	20475	--	--
Hepatom (Leberkrebszelle) ¹⁷⁸	Ratte (Gewebe)	ESMA	13426	5344	8925	--	15210	--	--
PC12 (Nebennierenmark) ¹³⁰	Zelllinie (Ratte)	PIXE	--	--	--	--	36000	86	163
Darmzellen (Muskel) ¹⁷⁹	Ratte (Gewebe)	PIXE	--	--	--	199	--	31	101
HatCat (Keratinocyte) ⁴⁷	hum. Zelllinie	PIXE	15900	4400	--	330	26800	29	116
Nervengewebe (Gehirn) ¹⁸⁰	Maus (Gewebe)	PIXE	9493	4962	--	160	11181	41	20
A549 (Lungenepithelzelle)	hum. Zelllinie	Lipsion	13332	7479	8347	682	1271	59	188
ATII (Lungenepithelzelle)	Ratte	Lipsion	10935	5516	5479	597	884	66	208
Lungengewebe	Maus	Lipsion	3054	2801	77	1263	374	141	67

Im Lungengewebe ist eine Mischung von Zelltypen vertreten. 40 Prozent des Gewebes besteht aus Typ I Pneumozyten und 60 Prozent aus Typ II Pneumozyten, wobei Typ II für die Surfactant-Produktion verantwortlich ist. Surfactant wird in den schwefelhaltigen Kerationosomen (Lamellarkörperchen) der Typ II Zellen gespeichert und besteht zu einem sehr hohen Anteil aus Phospholipiden. Dies kann die geringeren Werte für Phosphor und Schwefel von Lungengewebe im Vergleich zu *in-vitro*-kultivierten Typ II Pneumozyten erklären.

Im Vergleich zwischen A549-Zellen und primären Typ 2-Zellen fallen leicht höhere Phosphor- und Schwefelwerte bei A549-Zellen auf. Als Zelllinie befinden sich die Krebszellen (A549) in erhöhter Stoffwechselaktivität durch kontinuierliche Zellteilung, was die erhöhten Werte für Phosphor (DNA) und Schwefel (Proteine des Zytoskeletts) erklären kann.

Die Werte für Phosphor und Schwefel sind in A549-Zellen und primären AT-II-Zellen Zellen der

Ratte sehr ähnlich, weshalb diese Element als interner Standard in Frage kommen.

Insgesamt ist eine deutliche Korrelation bezüglich der zellulären Strukturelemente Phosphor und Schwefel zwischen den verschiedensten Zelltypen und den am LPS analysierten Lungenepithelzellen zu erkennen. Im direkten Vergleich der primären ATII-Zellen fallen die Werte für Phosphor als auch Schwefel in der Elektronenstrahlmikroanalyse höher aus. In der entsprechenden Publikation ist bedingt durch die Analysemethode ein Ausschnitt des Zytoplasmas analysiert worden. Im extrazellulären Raum steigt der Phosphorgehalt deutlich an, während die Werte für Schwefel und beispielsweise Kalium signifikant absinken. Die Zellmembran wurde nicht gezeigt. Im Fall von Typ-II-Lungenepithelzellen ist diese Region allerdings von Bedeutung, da diese Surfactant sekretieren der zum Großteil aus Phospholipiden und Proteinen im Verhältnis 10:1 besteht. ATII und andere Zellen der Elektronenstrahlmikroanalyse zeigen, sowohl horizontal/vertikal als auch in der Z-Achse einen Ausschnitt bzw. Bruchteil des gesamten Zytoplasmas. Die Ionenstrahlmikroskopie berücksichtigt die gesamte Zelle inklusive der Zellmembran. Dieser ist wichtig, da wie oben erwähnt dieser Zelltyp für die Produktion und Sekretion von Surfactant verantwortlich ist. Der höchste Kaliumgehalt bzw. der niedrigste Zinkgehalt ist in einer Nervenzelle erkennbar. Bedingt durch die Funktion dieses Zelltyps, welche in der Signalleitung durch das Aktionspotential bzw. in dem Neurotransmitterstoffwechsel liegt, kann der Kaliumgehalt stark schwanken. Allerdings fällt der Kaliumgehalt aller Zelltypen im Vergleich zu den am LPS untersuchten Lungenepithelzellen generell höher aus. Eine mögliche Begründung ist, dass die Komposition von Surfactant und das Volumen von Lungenepithelzellen u.a. durch Kalium- und Chlorid-Kanäle reguliert wird¹⁸¹. Andererseits zeigt eine PIXE-Analyse von Gewebe aus 6 unterschiedlichen menschlichen Organen einen Kaliumgehalt, welcher zwischen 12 und 1550 ppm schwankt und meist deutlich unter 1000 ppm liegt¹⁸². Da in diesen Veröffentlichungen eine vergleichbare Präparationsmethodik eingesetzt wird, ist eine zellspezifische Ursache höchstwahrscheinlich. Wie bereits aufgeführt kann die Assoziation extrazellulärer Ionen aus dem Puffer ebenfalls den zellulären Elementgehalt verändern (Vgl. Kap. 3.2.3). Daneben ist die Elektronenstrahlmikroanalyse im Vergleich zu der Untersuchung mit Protonen durch eine geringere Analysetiefe gekennzeichnet. Zwar können die Elektronen unter typischen Bedingungen die Probe bis in eine Tiefe von ca. 10 µm penetrieren, allerdings werden bereits ab einer Tiefe von ca. 2 µm emittierte Photonen vollständig von der Probe absorbiert¹⁸³. Inhomogenität bezüglich der Elementverteilung durch bspw. extrazelluläre Assoziation oder lokale Aufkonzentrierung zur Erfüllung zellulärer Funktionen können so die gemessene zelluläre Konzentration stark verfälschen. Zusammenfassend knüpfen die gezeigten Ergebnisse, mit Ausnahme von Kalium, an bereits

veröffentlichte Werte etablierter Gruppen (R. Ortega et al. & F. Watt et al.) an. Die Ionenstrahlmikroskopie eignet für die Elementquantifizierung der zellulären Elemente Phosphor, Schwefel, Zink und Eisen. Unter Einschränkungen, die den Zelltyp oder die Probenpräparation betreffen, ist außerdem die Quantifizierung der zellulären Elemente Kalium, Kalzium und Chlor möglich.

4.4.3 NP-Postmodifikation durch Phosphor und Kalzium

Es ist eine wichtige Frage bei der Beurteilung der NP induzierten Toxizität, ob die physikochemischen Eigenschaften des Partikels selbst für die Aufnahme und die Verteilung entscheidend sind. In der biologischen Umgebung der Partikel existiert ein großes Spektrum an Substanzen (Moleküle und Ionen) welche durch das allgemeine Bestreben der NP eine niedrige Grenzflächenenergie einzunehmen an die NP-Oberfläche adsorbieren können. Daneben wird davon ausgegangen, dass positiv geladene NP leichter von der Zelle aufgenommen werden können, da sie besser an die negativ geladene Zelloberfläche binden können.

In dieser Arbeit zeigten CeO₂- und ZnO-NP eine Kolokalisation mit Phosphor- und Kalziumionen aus dem Kulturmedium, wenn sie in Abwesenheit von Zellen inkubiert wurden. Als einziger NP zeigte ZnO diese Kolokalisation auch nach der zellulären Aufnahme der Partikel.

Folglich sind diese NP höchstwahrscheinlich mit einer Schicht Kalziumphosphat bedeckt. Zinkionen formen mit Phosphat ein unlösliches Salz, welches in der Zahnmedizin als Harvard cementum zur Reparatur eingesetzt wird. Höchstwahrscheinlich formen die Hydroxylgruppen auf der ZnO-Oberfläche mit Phosphat eine negativ geladene Hülle um den NP. Andererseits bildet Kalzium bei neutralen pH-Werten ein nahezu unlösliches Salz mit Phosphat, welches als Hydroxylapatit bekannt ist und der Hauptbestandteil in Knochen und Zähnen ist. Im Fall von CeO₂-NP sind ähnliche Interaktionen zu erwarten und es ist bekannt das Phosphat an CeO₂-NP bindet und dadurch die Größe sowie die katalytischen Eigenschaften der CeO₂-NP verändert¹⁸⁴.

In allen aufgeführten Fällen findet eine drastische Modifizierung der NP-Oberfläche statt und es ist bekannt, dass eine Apatit-Hülle die Interaktion mit der Zellmembran begünstigt¹⁸⁵. Kalziumphosphat ist beispielsweise ein Transfektionsreagenz, um genetisches Material in die Zelle zu transportieren. Folglich ist durch die Oberflächenmodifikation mit Kalzium und Phosphat zu erwarten, dass die Aufnahme und das toxische Potential des NP beeinflusst wird. Im Fall von ZnO kann durch die hohe Toxizität die Zellwand zerstört werden, weshalb die mit Kalzium und Phosphat beschichteten Partikel zusätzlich an intrazelluläre Domänen binden können.

4.4.4 Graphen als NP-Carrier

Graphen ist ein planares Molekül mit vielfältigen Eigenschaften und wird u.a. als organische Elektrode¹⁸⁶, Wasserstoffspeicher¹⁸⁷, Biosensor^{188 189} und zur Wirkstoffapplikation (drug delivery)¹⁵⁴ eingesetzt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht klar, ob Graphen-Partikel von Lungenepithelzellen (A549) in ausreichenden Ausmaß aufgenommen werden¹⁹⁰, um als Carrier-System Anwendung zu finden. Die Experimente dieser Arbeit hatten zum Ziel die Aufnahme von Graphenoxid konjugierten NP zu quantifizieren. Durch die Markierung mit Silber- und Gold-NP sollte die Eignung von Graphen als Carrier-System in Lungenepithelzellen (A549) dargestellt werden.

Die zelluläre Konzentration von Silber und Gold wurde durch die das Röntgensignal L-Line ermittelt. Die Quantifizierung von Silber mittels der L-Line kann durch die Überlappung mit zellulären Elementen Kalium und Kalzium mit einem relativ großen Fehler behaftet sein. Allerdings ist es mit Hilfe des isolierten Signals der K-Line bei 22 keV möglich, die Signalintensität der L-Line in der Software GeoPIXE zu berechnen.

In Kooperation mit Prof. C. Gao wurde die zelluläre Silber- und Goldkonzentration mittels Massenspektrometrie (ICP-MS) bestimmt. Um die Daten der Massenspektrometrie mit den Daten der Ionenstrahlmikroskopie zu vergleichen wurde die Einheit pg/Zelle gewählt (Tab 4.4.4). Bei der Massenspektrometrie wird der Elementgehalt einer großen Zellzahl in Lösung nach Behandlung mit Königswasser analysiert, was den Wert pg/Zelle einfach zugänglich macht. Bei den Werten der Ionenstrahlanalyse (ppm = $\mu\text{g/g}$ Trockengewicht) erfolgte die Umrechnung in pg/Zelle unter Berücksichtigung des mittleren zellulären Volumens (2,14 pl), der zellulären Dichte¹⁹¹ ($1,074 \text{ g/cm}^3$) und des Wassergehalts¹⁹² (63%) für Lungenepithelzellen.

Tabelle 4.4.4 Vergleich zweier unabhängiger Methoden zur intrazellulären Quantifizierung von Graphenoxid-NP-Konjugaten

Nachweismethode	Au-NP	Graphenoxid-Au-NP	Ag-NP	Graphenoxid-Ag-NP
ICP-MS (pg/Zelle)	12,9	58,9	11,1	46,8
IBM (pg/Zelle)	2,8	25,4	1,0	30,8

Insgesamt konnte mit Hilfe zweier unabhängiger Methoden eine stärkere Aufnahme der NP durch die Konjugation mit Graphen quantitativ nachgewiesen werden. Generell fallen die Werte welche

mittels ICP-MS ermittelt wurden höher aus. Das kann durch die Probenpräparation begründet werden. Bei der ICP-MS-Analyse werden sehr kleine Volumina benötigt, bei denen sich Aggregate in der Lösung störend auswirken. Aus diesem Grund werden die NP-behandelten Zellen vor der Analyse mit einer starken Säure zersetzt. Diese Vorgehensweise erlaubt es nicht extrazellulär assoziierte NP zu identifizieren oder auszuschließen.

Daneben zeigten die Graphenoxid-NP-Konjugate, im Vergleich zu den unkonjugierten NP, einen Anstieg der zellulären Toxizität bei 3 verschiedenen Toxizitätstests (MTT, LDH, ROS). Dieser Befund bestätigt die zelluläre Aufnahme der Graphenoxid-NP-Konjugate. Allerdings deutet sich an, dass der Einsatz als Carrier-System durch die leichte bis mittlere Toxizität der Graphenoxid-NP-Konjugate begrenzt ist. Die in dieser Arbeit verwendete Graphenoxid-Konzentration betrug 100 µg/ml und bei einer geringeren Dosis von ca. 20 µg/ml ist das Ausbleiben der Toxizität unmarkierter Graphenoxid-Moleküle zu erwarten¹⁹³.

4.5 Quantifizierung von Nanopartikeln in Lungenzellen

4.5.1 Allgemeine Aussagen zur Aufnahme von Metalloxid-NP

Die wesentlichen Partikeleigenschaften, welche die Aufnahme der Metalloxid-NP beeinflussen, sind die Oberflächeneigenschaften, sowie das Diffusions- und Sedimentationsverhalten der Partikel. Sedimentiert ein Partikel, nimmt die zelluläre Verfügbarkeit ab und eine Aufnahme ist weniger wahrscheinlich. Durch die verschiedenen Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel ist im Allgemeinen ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten von Liganden zu erwarten. Wenn Ionen oder Proteine auf der Partikeloberfläche adsorbieren, können sie z.B. die Größe des Partikels stabilisieren, indem das Aggregieren verhindert wird.

Beim gleicher applizierter Dosis aller in dieser Arbeit untersuchten Metalloxid-NP Al_2O_3 , TiO_2 , Fe_2O_3 , ZnO und CeO_2 wurde die höchste zelluläre Konzentration im Fall von ZnO und die niedrigste im Fall von TiO_2 beobachtet. Die höchste Konzentration wurde in Abwesenheit und die geringste Konzentration in Anwesenheit einer Proteinkorona gemessen. Dies spiegelt die allgemeine Tendenz wider, dass alle untersuchten Metalloxid-NP in Gegenwart der Proteinkorona eine geringere zelluläre Konzentration zeigen.

Bei der Ionenstrahlmikroskopie ist die Konzentrationsbestimmung durch die charakteristische Röntgenstrahlung auf die zweidimensionale Ebene beschränkt, dadurch ist es nur schwer möglich

die intrazelluläre Konzentration der NP anzugeben.

In den Messwert der zellulären Konzentration gehen sowohl NP ein, welche von der Zelle aufgenommen wurden, sowie auch diejenigen NP welche extrazellulär assoziiert sind. Trotzdem ist es ein Vorteil der Ionenstrahlmikroskopie, durch die Rückstreuanalyse eine Tiefenauflösung des NP-Signals zu ermöglichen. Dadurch konnte entschieden werden, ob die NP an der Zellaußenseite oder intrazellulär lokalisiert sind. Die Ausbeute des Rückstreusignals ist dabei vom Wirkungsquerschnitt des jeweiligen NP-Elements und von der aufgenommenen Partikelmenge abhängig. Bei höheren zellulären Konzentrationen konnte, die Internalisierung der Nanopartikel Al_2O_3 , CeO_2 und ZnO durch das Rückstreusignal nachgewiesen werden.

Allerdings ist es durch die Rückstreuanalyse nicht möglich, den Anteil von internalisierten und extrazellulär assoziierten Nanopartikeln quantitativ anzugeben. Der Ursache hierfür liegt in der Auflösung des RBS-Detektors und im großen Fehler des Fittings, welcher durch die oft geringe Ausbeute des NP-Rückstreusignals unvermeidbar war.

Die Konzentrationsverhältnisse wurden nur qualitativ bewertet, indem zwischen Zellen, bei denen nur internalisierte NP vorlagen, und der Gesamtheit aller Zellen unterschieden wurde (Abb. 4.5.1).

In der letzteren Kategorie könnte man erwarten, dass die Konzentration größer ausfällt.

Trotzdem konnte bei vollständiger Internalisierung eine höhere zelluläre Konzentration, im Fall von ZnO -NP, beobachtet werden. Durch ihre toxische Wirkung blockieren ZnO -NP höchstwahrscheinlich die weitere Aufnahme von Partikeln.

Im Vergleich dazu, wurde bei CeO_2 -NP eine relativ geringe Toxizität und eine Exozytose der Partikel beobachtet. Dadurch kann die Konzentration, bei vollständiger Internalisierung der Partikel, niedriger im Vergleich zur Gesamtheit aller Zellen ausfallen.

A) ZnO (30 g/ml)

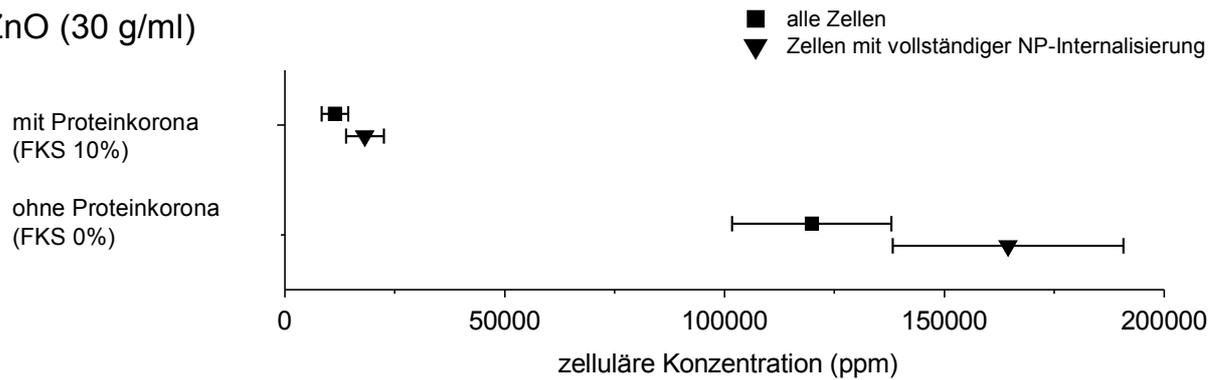
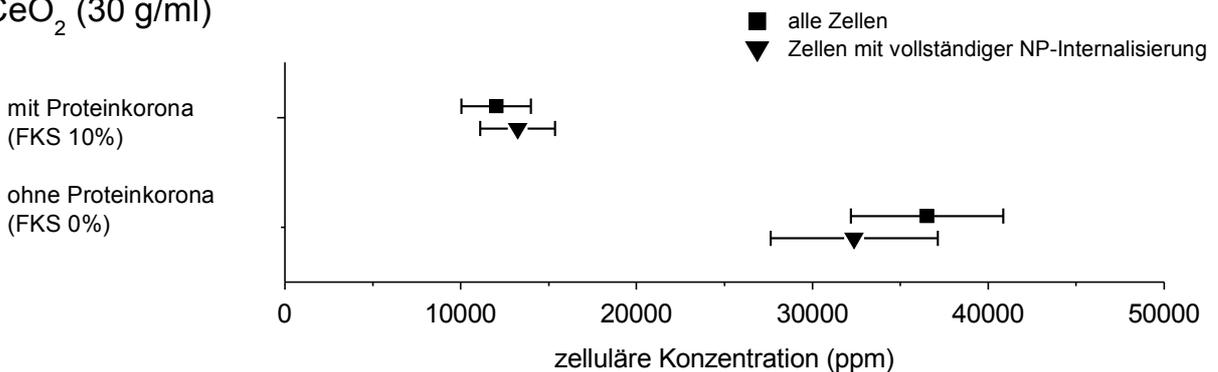
B) CeO₂ (30 g/ml)

Abb. 4.5.1 Konzentrationsintervalle zur Abschätzung der intrazellulären Konzentration von ZnO und CeO₂-NP. In jedem Intervall wurde die mittlere Konzentration aller Zellen (■) und die mittlere Konzentration der Zellen, welche die Partikel vollständig internalisierten (▼), als Extrempunkt verwendet. Da die Zellen deutlich mehr ZnO-NP aufnahmen, wurden zur Veranschaulichung der Ergebnisse die Achsen der zellulären Konzentration von CeO₂- und ZnO-NP im Maßstab von 1 : 4 angegeben. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationsangaben innerhalb der jeweiligen Kategorien.

Abb. 4.5.1 vergleicht die intrazelluläre Konzentration in denjenigen Zellen, bei denen vollständige Internalisierung vorlag, mit denen der gesamten zellulären Konzentration für verschiedene Bedingungen, sowohl für CeO₂-NP als auch für ZnO-NP.

Da in Anwesenheit einer Proteinkorona generell weniger Partikel an der Zelloberfläche detektiert wurden, liegt die Konzentration mit ausschließlicher Internalisierung und die Konzentration der Gesamtheit der Zellen nah beieinander. In Abwesenheit einer Proteinkorona zeigen diese Konzentrationen eine größere Schwankung und sind vor allem deutlich größer als in Anwesenheit der Proteinkorona. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Konzentration aller Zellen und den Zellen mit vollständiger Internalisierung festgestellt.

In Abwesenheit einer Proteinkorona finden sich bei der Mehrzahl der Zellen sowohl extrazellulär assoziierte als auch aufgenommene Nanopartikel. Nur wenige Zellen zeigen eine vollständige Internalisierung der NP. Trotzdem wurden, im Vergleich zu NP mit Proteinkorona, bei Abwesenheit

der Proteinkorona deutlich mehr Zellen mit einer höheren zellulären NP-Konzentration beobachtet. Im Fall der ZnO-NP-Aufnahme zeigen die großen Konzentrationsschwankungen zwischen der Gesamtheit der Zellen und den Zellen wo eine vollständiger Internalisierung vorlag, dass die Zellen, die ZnO-NP aufgenommen haben, eine weitere Aufnahme toxizitätsbedingt blockieren können. Das erklärt wahrscheinlich große Zahl von Zellen mit zellulär assoziierten ZnO-NP.

Im Vergleich zu ZnO liegen die Werte für CeO₂ bei Abwesenheit der Proteinkorona in einem kleineren Bereich und zeigen keinen signifikanten Unterschied. Da CeO₂-Nanopartikel ein sehr geringes Toxizitätspotential aufweisen, ist davon auszugehen dass, aufgenommene Partikel die weitere Aufnahme nicht blockieren. Daneben deuten die Experimente, in denen die Exozytose von CeO₂ festgestellt wurde, darauf hin, dass sich die zelluläre CeO₂-Konzentration in einem Austausch mit der extrazellulären Umgebung befindet.

Bei der Anwesenheit einer Proteinkorona verhindert diese die Aggregation der Nanopartikel. Allerdings vermindert sie gleichzeitig die zelluläre Interaktion und Aufnahme, was sich in einer niedrigeren zellulären Konzentration widerspiegelt. Da die Proteinkorona aus den Proteinen des Serums zusammengesetzt ist, besteht sie zum überwiegenden Anteil aus Albumin. In diesem Zusammenhang bestätigen andere Untersuchungen, dass die zelluläre Interaktion und Aufnahme von Nanopartikel reduziert wird, wenn die Oberfläche der Partikel mit Albumin oder beispielsweise Polyethylenglykol beschichtet ist^{194 195}.

Es ist möglich, dass große NP im Vergleich zu vielen kleinen in geringer Menge aufgenommen werden, da größere Partikel sedimentieren und somit ihre Verfügbarkeit reduziert wird. Andererseits ist ein großer NP, durch seine Masse, länger mit der Zellaußenseite in Kontakt, was die Aufnahme begünstigen kann.

Durch die unterschiedliche Dichte der NP könnte man ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der Sedimentation und Diffusion vermuten⁴². Bei der zellulären Verfügbarkeit spielt die Sedimentation, im Vergleich zur Diffusion, eine größere Rolle, da dort der Partikelradius stärker gewichtet ist und die Dichte der Lösung und des Teilchens Berücksichtigung findet (Gleichung 4.5.1.1 & 4.5.1.2).

$$D = \frac{k T}{6 \Pi \eta r} \quad (4.5.1.1)$$

$$V_{sed} = \frac{2}{9} \frac{r^2 (\rho_T \rho_L) g}{\eta} \quad (4.5.1.2)$$

r	Partikel-Radius
V_{sed}	Sedimentationsgeschwindigkeit
D	Diffusionskonstante
g	Gravitationskonstante
k	Boltzmann-Konstante
η	Viskosität der Lösung
ρ_L	Dichte der Lösung
ρ_T	Dichte des Teilchens

Größere Partikel sedimentieren schneller aber diffundieren langsamer, da bei der Sedimentationsgeschwindigkeit, im Vergleich zur Diffusionskonstanten, der Radius des Partikels mit dem Quadrat eingeht, wogegen die Diffusionskonstante proportional zum Kehrwert des Radius ist.

Nach der Sedimentation könnte ein Partikel nur eingeschränkt für die zelluläre Aufnahme verfügbar sein. Folglich ist bei Partikeln mit relativ geringer Dichte eine höhere zelluläre Konzentration zu erwarten. Was aber durch die Experimente so nicht bestätigt wird. Die Nanopartikel Al_2O_3 und TiO_2 sowie Fe_2O_3 und ZnO zeigen eine ähnliche Dichte und Größe in Abwesenheit bzw. Anwesenheit einer Proteinkorona. Trotzdem wurden, bei gleicher Dosis und Applikationszeit, sehr unterschiedliche zelluläre Konzentrationen von Al_2O_3 und TiO_2 bzw. Fe_2O_3 und ZnO beobachtet. Daneben fällt die zelluläre Konzentration für NP ähnlicher Größe, wie z.B. TiO_2 , Fe_2O_3 und CeO_2 , sehr unterschiedlich aus.

Dies unterstützt die Annahme, dass die Spezifität bzw. Oberfläche der Nanopartikel entscheidend für deren zelluläre Aufnahme ist. Der Einfluss von Größe und Masse tritt deutlich hinter den Einfluss der Spezifik der Oberfläche und der Natur der Partikel zurück.

4.5.2 CeO_2

Die Aufnahme von CeO_2 -NP wurde in dieser Arbeit näher untersucht, da sie in Lungenzellen eine sehr geringe Toxizität zeigen und gleichzeitig in hoher Menge aufgenommen werden. Daneben erlaubt die, im Vergleich zu anderen Metalloxid-NP, hohe Signalausbeute des Rückstreusignals zu unterscheiden, ob die CeO_2 -NP an der Zellaußenseite oder intrazellulär lokalisiert sind.

Bei der CeO_2 -Aufnahme in Abhängigkeit der Dosis tritt eine Sättigung der Aufnahme bei ca. 11000 ppm ein, wenn die Partikel eine Proteinkorona tragen. Diese zelluläre CeO_2 -Konzentration befindet

sich auf einem ähnlichen Niveau wie die Konzentration der zellulären Strukturelemente Phosphor und Schwefel, welche die höchste Konzentration zellulärer Elemente repräsentieren. In Abwesenheit der Proteinkorona tritt keine Sättigung der zellulären CeO_2 -Konzentration ein und das Niveau der zellulären CeO_2 -Konzentration ist, im Vergleich zu den zellulären Strukturelementen Phosphor und Schwefel, bis zu zehn mal höher. Trotz dieser vergleichsweise hohen CeO_2 -NP-Konzentration fällt die zelluläre Toxizität erstaunlich gering aus.

Bezüglich der Aufnahmekinetik von CeO_2 -NP halbiert sich nach 72 Stunden Expositionszeit die zelluläre CeO_2 -Konzentration, was eine Exozytose der Partikel suggeriert, welche in Einzelfällen auch direkt mit PIXE abgebildet werden konnte (Abb 4.5.2).

Die beobachtete Sättigung im Zusammenhang mit der Exozytose und der geringen Toxizität der CeO_2 -NP, lässt darauf schließen, dass intrazelluläre CeO_2 -NP im Austausch mit den CeO_2 -NP des Kulturmediums stehen.

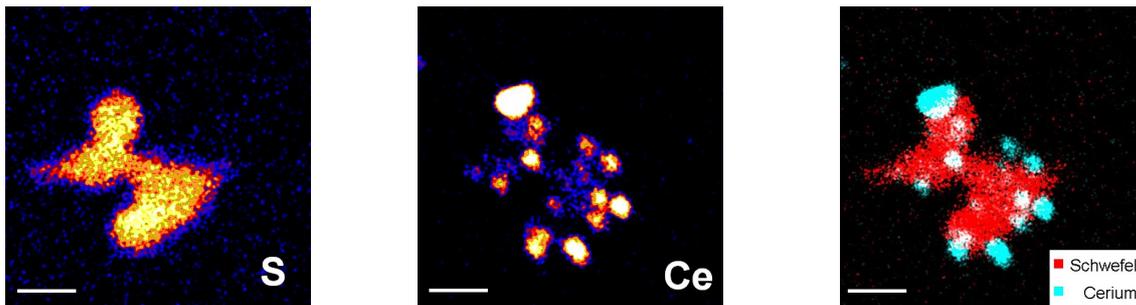


Abb. 4.5.2 Exozytose von CeO_2 Nanopartikeln. A549-Zellen wurden für 72 Stunden mit CeO_2 -NP (10 $\mu\text{g/ml}$) in Gegenwart einer Proteinkorona (FKS 10%) inkubiert. Dargestellt sind PIXE element maps mit einer Scanfeldgröße von 50 x 50 μm . Der weisse Balken entspricht jeweils 10 μm .

Die Ionenstrahlmikroskopie erlaubte es erstmalig, die Konzentration verschiedener zellulärer Elemente gleichzeitig zur Nanopartikel-Aufnahme zu studieren. Indem die CeO_2 -Aufnahme durch die Inhibitoren Amilorid und Genistein blockiert wurde, konnte eine Erhöhung der zellulären Kalziumkonzentration durch die Aufnahme der CeO_2 -NP nach drei Stunden nachgewiesen werden. Gleichzeitig bewirkte die Inhibition der CeO_2 -Aufnahme einen leichten Abfall der zellulären Phosphorkonzentration. Bei höheren Applikationszeiten von 24 bis 72 Stunden, war eine Verringerung der zellulären Phosphor- und Kalzium-Konzentration durch die CeO_2 -Aufnahme zu beobachten, welche jedoch nur in seltenen Fällen signifikant war.

Bei der höchsten applizierten CeO_2 -Dosis von 100 $\mu\text{g/ml}$ ist eine Erhöhung der Zinkkonzentration

zu beobachten. Im Kulturmedium sind CeO₂-NP mit Phosphat und Kalzium kolokalisiert, wobei Phosphat alternativ durch die Bindung von Zinkionen auch zur Erhöhung der zellulären Zinkkonzentration beitragen kann.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die CeO₂-Aufnahme die zelluläre Homöostase von Zink und besonders Phosphor und Kalzium beeinflusst wird. Da CeO₂-NP mit Kalzium und Phosphat aus dem Kulturmedium vergesellschaftet sind, kann die Aufnahme der Partikel in einem relativ kurzen Zeitrahmen direkt zur Erhöhung der zellulären Konzentration dieser Elemente beitragen.

Bei einem längeren Zeitrahmen, ab 24 Stunden, ist eine zelluläre Antwort zu erwarten. Durch die Exocytose, welche unter anderem durch eine erhöhte zelluläre Kalzium-Konzentration ausgelöst wird¹⁹⁶, kann die zelluläre Konzentration der NP-assoziierten Elemente Phosphor und Kalzium abnehmen.

Insbesondere die zelluläre Kalziumkonzentration ist sehr klein und unterliegt einer strikten Regulation. Eine erhöhte zelluläre Kalziumkonzentration kann beispielsweise einen osmotischen Schock hervorrufen, der die Freisetzung von ATP zur Folge haben kann^{197 198}. Extrazelluläres ATP führt zum programmierten Zelltod durch Apoptose¹⁹⁹ und kann den zellulären S-Adenosylmethionin-Spiegel beeinflussen²⁰⁰.

Ein anderer Aspekt ist, dass CeO₂ durch seine redoxaktiven Eigenschaften einen direkten Einfluss auf das Redoxsystem der Zelle ausüben kann. In diesem Zusammenhang wird von antioxidativen Eigenschaften²⁰¹ als auch von zytotoxischen Eigenschaften der CeO₂-NP berichtet²⁰².

CeO₂ zeigt eine ähnlich hohe Brechzahl wie TiO₂. Deshalb sind CeO₂-NP geeignet die zelluläre Aufnahme durch die Seitwärtsstreuung in der Durchflusszytometrie zu untersuchen. Frühere Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass sich die Aufnahme von TiO₂-NP mittels Seitwärtsstreuung nachweisen lässt^{203 77}.

Da die Ionenstrahlmikroskopie eine kosten- und zeitintensive Analysemethode ist, konnte durch die Kombination mit der Seitwärtsstreuung eine schnelle und einfache Analyse der zellulären CeO₂-Konzentration mittels Durchflusszytometrie erreicht werden. Dazu ist aber eine vorherige Kalibration mit Hilfe der Ionenstrahlanalytisch bestimmten zellulären Konzentration erforderlich, da durch die Seitwärtsstreuung alleine keine Angabe bezüglich der zellulären Konzentration der NP möglich ist.

Folglich kann die Seitwärtsstreuung, nach der Kalibration mit den Daten der Ionenstrahlmikroskopie, dazu verwendet werden die zelluläre Konzentration von CeO₂-NP zu bestimmen.

4.5.3 ZnO

In der Gruppe der Metalloxid-NP nehmen ZnO-NP eine besondere Rolle ein, da sie nach der zellulären Aufnahme einen starken zytotoxischen Effekt hervorrufen und durch Kompartimentalisierung freie Zinkionen in großen Ausmaß freisetzen können. Zinkionen erfüllen wichtige zelluläre Stoffwechselfunktionen, da sie bei vielen Enzymen im aktiven Zentrum vorkommen oder in Form von Zinkfingerproteinen als Transkriptionsfaktor agieren.

Die zelluläre Zinkionenkonzentration unterliegt einer stark regulierten Homöostase und die freie zelluläre Zinkionenkonzentration im Zytoplasma liegt ungefähr im Bereich von einem Nanomol pro Liter¹⁷¹.

ZnO ist der NP welcher zur höchsten gemessenen zellulären NP-Konzentration führt. Allerdings ist bei einigen Zellen ein Teil der Konzentration auf die extrazellulär assoziierten Nanopartikel zurückzuführen. Daneben ist eine deutliche Korrelation zwischen steigender zellulärer Zink-Konzentration und Toxizität zu erkennen.

Im Fall von ZnO muss der Einfluss von Zinkionen berücksichtigt werden, da durch die intrazelluläre Prozessierung ZnO-NP in das Lysosom gelangen können, wo sie durch den niedrigen pH zu Zinkionen umgesetzt werden. Die Ionenstrahlmikroskopie erlaubt es, die gesamte zelluläre Zinkkonzentration zu bestimmen, unterscheidet dabei jedoch nicht zwischen freien Zinkionen und gebundenen Zink bzw. ZnO-NP. Aus diesem Grund kann ergänzend die freie intrazelluläre Zinkionenkonzentration mit Hilfe von hochspezifischen Fluoreszenzmarkern wie z.B. FluoZin-3 quantifiziert werden. Dabei wurde in der Dissertation von Christoph Sandner festgestellt, dass der Anstieg der totalen zellulären Zinkkonzentration mit dem Anstieg der freien intrazellulären Zinkionenkonzentration positiv korreliert²⁰⁴.

Das ZnO-NP zum Anstieg der freien intrazellulären Zinkionenkonzentration führen wurde ebenfalls in anderen Studien bestätigt^{205 206} und deutet darauf hin, dass der Anstieg der zellulären Zink-Konzentration, welcher mittels Ionenstrahlmikroskopie ermittelt wurde, eher durch Zinkionen als durch ZnO-NP erreicht wird.

Diese Arbeit zeigt, dass im Kulturmedium ohne Serum durch ZnO-NP eine freie Zinkionenkonzentration von 1,4 (+/- 0,2) µg/ml vorliegt, was mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen korreliert²⁰⁷. Daneben belegt diese Arbeit experimentell, dass ein lysosomaler pH-Wert zwischen 4 - 5 zur Auflösung der ZnO-Partikel führt. Auch muss davon ausgegangen werden, dass sich zum Zeitpunkt der Messung freier Zinkionen sich ein Gleichgewicht zwischen ZnO und

verfügbaren Bindungsstellen für Zinkionen (bspw. Thiolgruppe von Serumproteinen bzw. Cystein) eingestellt hat. Die Verfügbarkeit dieser Bindungsstellen begünstigt somit, durch die Stoffwechselaktivität der Zellen, die zelluläre Aufnahme von Zinkionen.

Daneben zeigt die Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (XANES), dass die intrazelluläre Auflösung von ZnO-NP relativ schnell erfolgt, da bereits nach 1 Stunde das gesamte zelluläre Zink in Form von Zinkionen vorliegt²⁰⁸.

Somit lässt sich aus den Ergebnissen dieser und anderer Arbeiten schlussfolgern, dass Zinkionen für den toxischen Effekt von ZnO-NP verantwortlich sind. Da zu hohe intrazelluläre Zinkionenkonzentrationen toxisch wirken, kann Zn^{2+} beispielsweise durch Glutathion gebunden werden und unter ATP Verbrauch exozytiert werden. Ein möglicher Toxizitätsmechanismus von Zinkionen ist deshalb die zelluläre Verringerung von ATP (ATP-Depletion), welche zum Zelltod durch bspw. Nekrose oder Apoptose führt²⁰⁹. Alternativ binden bei einer relativ hohen intrazellulären Zinkionenkonzentration viele Proteine Zink, was deren Aktivität inhibieren kann²¹⁰²¹¹. Daneben blockiert der Rückgang von ATP die energieabhängige Endozytose, was wie bei der Rückstreuanalyse (RBS) der ZnO-Aufnahme beobachtet wurde, zur extrazellulären Assoziation von ZnO-NP bei höheren Konzentration führt.

4.5.4 Effektiv wirksame Dosis

Die Aufnahme und Wirkung von Nanomaterialien ist wesentlich durch deren Obeflächeneigenschaften bestimmt. Zusätzlich spielt die potentielle zelluläre Expositionsfläche in der biologischen NP-Dosimetrie eine entscheidende Rolle, weshalb einige Autoren es bevorzugen bei dem am meisten untersuchten NP (TiO_2) die applizierte NP-Masse auf die Fläche ($\mu g/cm^2$) anstatt auf des Volumen ($\mu g/ml$) zu beziehen²¹²²¹. Daneben sind die absolute Partikelzahl und die Masse der NP als Dosisangabe geläufig¹⁵².

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Oberflächenmodifikation in Form einer Protein-Korona, eine geringere intrazelluläre Konzentration eintritt. Da das Vermögen Liganden zu adsorbieren auf die spezifische Oberfläche des jeweiligen Partikels zurückgeführt werden kann, ist es schwierig die applizierte Dosis verschiedener Partikel miteinander zu vergleichen. NP neigen im Allgemeinen zur Aggregation und verschiedene Applikationsformen erschweren es die applizierte Dosis von NP im Zellkultursystem mit Tierexperimenten zu vergleichen, weil z.B. in Lösung ein anderes Aggregationsverhalten als im Aerosol zu erwarten ist.

Inhalation stellt eine der häufigsten Aufnahmewege für NP in der Praxis dar. Allerdings kann die effektive Dosis der Partikel verschieden sein, da die NP unterschiedliche Barrieren wie z.B.

Surfactant oder Makrophagen überwinden müssen, welche sehr unterschiedliche ausfallen können. Deshalb ist es mit Hilfe der herkömmliche NP-Dosis sehr schwierig die zelluläre NP-Belastung in *in-vitro*-Experimenten mit den Daten von *in-vivo*-Studien zu vergleichen

Aus den aufgeführten Gründen ist es wichtig den Unterschied zwischen wirklicher zellulärer Dosis (genuine dose) und applizierter Dosis bei der Risikobewertung zu berücksichtigen. Da die wirkliche zelluläre Dosis die spezifischen Eigenschaften der einzelnen NP bei der zellulären Aufnahme respektiert, kann sie als toxikologischer Endpunkt betrachtet werden und stellt die Basis für eine systematische und vergleichbare Toxizitätswertung von *in-vitro*- und *in-vivo*-Testsystemen dar. Dies ist von besonderer Relevanz, da durch neue Regularien der Europäischen Union die Anzahl von Tierversuchen zur Toxizitätswertung nach 2013 massiv reduziert werden soll²¹³. Obwohl diese Richtlinie hauptsächlich in Zusammenhang mit kosmetischen Produkten gilt, betrifft sie im Allgemeinen auch weit verbreitete biochemische Toxizitäts-Assays, welche z.B. der zur Ermittlung der Kanzerogenität eingesetzt werden²¹⁴. Tierversuche können reduziert werden, indem die Sensitivität oder Durchsatzrate in neuen Testsysteme verbessert wird. Auch eine bessere Kenntnis der Wirkmechanismen auf intrazellulärer Ebene trägt dazu bei, das Risiko besser abschätzen zu können bzw. Tests im Tiermodell zu reduzieren.

Diese Arbeit zeigt erstmalig einen Bezug zwischen der wirklichen intrazellulären Dosis und dem toxischen Effekt eines Nanopartikels (ZnO). Kap. 3.4.3.3 zeigt, dass die Korona bei der Vermittlung des toxischen Effektes vernachlässigt werden kann, da unabhängig vom Proteingehalt des Serums die gleiche zelluläre Dosis eine nahezu identisches Ausmaß an Toxizität verursacht. Dies zeigt, dass die effektiv wirksame intrazelluläre Dosis ein toxikologischer Endpunkt ist. Es sind deutliche höhere Dosen bei einem Serumgehalt von 10% notwendig, um die gleiche zelluläre Dosis zu erreichen wie in Abwesenheit der Korona. Dies deutet darauf hin, dass der Proteingehalt des NP bei der zellulären Aufnahme der Partikel eine wichtige Rolle spielt. Proteinbindungsstellen, wie z.B. Cystein im Serum, können durch die Bindung von Zinkionen die toxische Wirkung von ZnO abpuffern. Insgesamt war unterhalb einer zellulären Dosis von 10000 ppm eine Beziehung zwischen wirksamer zellulärer Dosis und Toxizität nach einem linearen Muster zu beobachten. Somit liegt die intrazellulär toxikologisch relevante Dosis von ZnO-NP bzw. Zinkionen in einem Bereich zwischen dem fünf und 50-fachen des normalen physiologischen Werts der Zinkkonzentration in Kontrollzellen.

Die wirklich wirksame intrazelluläre Dosis schlägt die Brücke zwischen den zwei wichtigen toxikologischen Endpunkten applizierte Dosis und Effekt. Dabei ermöglicht die Ionenstrahlmikroskopie die effektive oder wirkliche NP-Konzentration in einzelnen Zellen und Lungengewebe zu quantifizieren. Dies ist von Vorteil, da die NP-Aufnahme anstelle der Applikationsdosis eher durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften, die Art der Applikation und die Oberflächeneigenschaften der NP bestimmt wird.

Die Beziehung zwischen Applikationsdosis und effektiv wirksamer Dosis (E-D) sowie zwischen effektiv wirksamer Dosis und Effekt (D-R) werden dabei als Endpunkte zum Vergleich der Wirkung unterschiedlicher NP eingesetzt.

Da der Dosis, welche tatsächlich im Gewebe oder Organ vorhanden ist ein toxischer Effekt zugeordnet werden kann, ist die effektiv wirksame Dosis als wichtige Größe zum systematischen Vergleich von toxikologischen Studien auf *in-vitro*- und *in-vivo*-Basis geeignet. Dabei ist es nun möglich die *in-vitro*-Analyse als schnelle sowie kostengünstige Alternative zu Tierversuchen einzusetzen. Gleichzeitig können die *in vitro*-Daten der NP-Aufnahme in anderen Analyseverfahren wie z.B. Hochdurchsatzanalyse oder der Genexpressionsanalyse als Referenz verwendet werden.

Die Ionenstrahlmikroskopie ist zur Zeit die einzige Methode, welche für die intrazelluläre Quantifizierung von unmarkierten Nanopartikeln auf Einzelzellebene in Frage kommt. Deshalb ist sie als zukünftige Referenzmethode für die Dosimetrie von Nanopartikeln sehr gut geeignet.

5. Zusammenfassung

Die Nanotechnologie spielt eine Schlüsselrolle bei der technologischen Entwicklung. Jedoch stellen Nanopartikel ein potentiell Gesundheitsrisiko dar. Durch ihre große Oberfläche zeigen Nanopartikel eine hohe Reaktivität und die geringe Größe trägt zu einer erhöhten Beweglichkeit und Bioverfügbarkeit bei. Beispielsweise können Nanopartikel Entzündungen auslösen oder die Produktion von freien Radikalen fördern. Insbesondere Lungenepithelzellen stellen die wichtigste Barriere zur Aufnahme von industriell relevanten Nanopartikeln im Alltag dar, denn durch ihre geringe Größe können Nanopartikel bis in einzelne Alveolen vordringen und in die Blutbahn gelangen. Aus diesen Gründen ist es notwendig das Risikopotential, was von Nanopartikeln ausgeht zu bewerten.

In dieser Dissertation wurden die Metalloxid-Nanopartikel Al_2O_3 , TiO_2 , Fe_2O_3 , ZnO und CeO_2 in einzelnen Lungenzellen erstmals mit Hilfe der Ionenstrahlmikroskopie quantifiziert. Darüber hinaus erfolgte die Quantifizierung von ausgewählten Metalloxid-Nanopartikeln in gedehnten primären Typ 2 Pneumozyten sowie in den Alveolen des Lungengewebes. Außerdem wurden Gold und Silber als Markierungspartikel eingesetzt, um die Aufnahme der organischen Nanopartikel Graphen zu untersuchen.

Die Ionenstrahlmikroskopie ist eine hochempfindliche Methode, welche durch die charakteristische Röntgenstrahlung den zellulären Elementgehalt innerhalb einer Zelle visualisieren kann. Dies ist, je nach Element, bis zu einer unteren Konzentrationsgrenze von 5 – 20 ppm möglich.

Die Ionenstrahlmikroskopie erlaubt, im Vergleich zur Elektronenstrahlmikroanalyse, biologische Proben bis zu einer Tiefe von ca. 80 μm zu untersuchen. Durch das zelluläre Rückstreusignal konnte bei Kulturzellen entschieden werden, ob die Nanopartikel internalisiert wurden oder auf der Zelloberfläche assoziiert sind.

Da biologische Proben eine relativ geringe Dichte und Dicke aufweisen, ist die Signalausbeute und damit die Messzeit ein limitierender Faktor bei der Ionenstrahlanalytischen Quantifizierung des Elementgehalts. Durch das Aufziehen der Probe auf einen Aluminiumrahmen, konnte der Abstand zwischen Röntgendetektor und Probe reduziert werden, was zu einer höheren Signalausbeute führte und damit eine schnellere Analyse der Präparate ermöglichte.

Die Art und Weise der Probenpräparation kann einen Einfluss auf den zellulären Elementgehalt haben, indem Ionen aus dem Medium an die Zellaußenseite binden oder durch die Waschlösung ein Verlust von intrazellulär lokalisierten organischen und anorganischen Molekülen entsteht.

Durch den Vergleich zwischen einer ionenfreien Polyethylenglycol-Lösung mit dem üblicherweise verwendeten Waschpuffer konnte gezeigt werden, dass sich bei der Verwendung des Waschpuffers der zelluläre Elementgehalt von Kalium, Kalzium und insbesondere Chlor erhöht.

Allerdings bleiben Phosphor und Schwefel als wichtige zelluläre Strukturelemente und die biologisch relevanten Spurenelemente Eisen und Zink davon unbeeinflusst.

Die Ionenstrahlmikroskopische Analyse von Lungengewebe erfordert eine Einbettung der Präparate. Dabei erwies sich DePeX, was als Material routinemäßig zur Einbettung verwendet wird, als ungeeignet, da eine inhomogene Zink-Kontamination vorhanden war, welche eine intrazelluläre Zink-Messung verhinderte. Durch die Entwicklung eines neuen zinkfreien Einbettmaterials auf Limonen-Basis, konnte jetzt auch die Zinkkonzentration in Alveolen gemessen werden.

Im biologischen Milieu können Proteine und Ionen auf der Oberfläche der Nanopartikel adsorbieren und dadurch deren Aufnahme in die Zelle beeinflussen. Deshalb wurde die zelluläre Aufnahme in Abhängigkeit der Proteinhülle (Korona) bei *in vitro* Bedingungen untersucht. Tragen die Partikel eine Korona, ist bei allen untersuchten Metalloxid-Nanopartikeln eine geringere zelluläre Konzentration zu beobachten und gleichzeitig sind weniger Nanopartikel auf der Zelloberfläche adsorbiert.

Die Aufnahme von CeO_2 und ZnO wurde näher untersucht, da ZnO als einziger untersuchter Nanopartikel einen deutlichen toxischen Effekt hervorruft und CeO_2 durch die hohe Ausbeute des Rückstreusignals und die starke zelluläre Aufnahme zum näheren Studium der Aufnahme besonders geeignet ist.

Es wurde beobachtet, dass CeO_2 und ZnO im extrazellulären Raum mit Phosphat und Kalzium aus dem Kulturmedium kolokalisiert sind. Da Kalziumphosphat als Transfektionsagenz bekannt ist, kann diese Modifikation der Partikeloberfläche die Aufnahme der Partikel begünstigen.

Im Vergleich zu CeO_2 , ist bei ZnO auf Grund der erhöhten Toxizität keine Sättigung der zellulären Konzentration zu erkennen. Daneben lässt die Halbierung der zellulären CeO_2 -Konzentration nach 72 Stunden Applikationszeit darauf schließen, dass die Zellen in der Lage sind die Nanopartikel durch Exozytose wieder abzugeben.

Mit Hilfe von Inhibitoren wurde der Aufnahmemechanismus von CeO_2 -NP untersucht. Dabei zeigte sich, dass CeO_2 Nanopartikel durch Caveolae- bzw. Clathrin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose aufgenommen werden.

Die Internalisierung von CeO_2 und ZnO Nanopartikeln wurde mit Hilfe des zellulären Protonen-Rückstreusignals untersucht. Internalisierte Nanopartikel liefern im Vergleich zu extrazellulär assoziierten Nanopartikeln ein Rückstreusignal bei niedrigeren Energien, da die zurückgestreuten

Protonen durch die Passage des Zellmaterials zusätzlich Energie verlieren. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt dass, ZnO und CeO₂-Nanopartikel ohne Proteinhülle häufiger an der Zelloberfläche lokalisiert sind und zu einer höheren zellulären Konzentration führen.

Sowohl im Lungengewebe als auch bei gedehnten primären Typ 2 Pneumozyten und kultivierten Lungenepithelzellen zeigte sich eine sehr inhomogene zelluläre Konzentrationsverteilung der Nanopartikel. Hier liegt die Stärke der Ionenstrahlmikroskopie darin, die Konzentration in einzelnen Zellen bzw. Alveolen erfassen zu können. Dadurch erlaubt es diese Methode, das Risiko abzuschätzen, was durch die Extrembelastung in einzelnen Zellen entstehen könnte.

Da Lungengewebe aus Typ I und Typ II Pneumozyten besteht und Makrophagen in das Gewebe einwandern können, ist es in zukünftigen Experimenten notwendig die einzelnen Zelltypen zu markieren, um die Nanopartikel-Aufnahme im Lungengewebe mit den Ergebnissen der Zellkultur besser vergleichen zu können. Durch eine Markierung mit Gold-konjugierten Antikörpern, kann erreicht werden, die einzelnen Zelltypen mittels Ionenstrahlmikroskopie zu identifizieren.

Durch verschiedene Applikationsformen bei *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen ist die Wirkung der Nanopartikel nur schwer vergleichbar. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Konzept der effektiv wirksamen zellulären Dosis eingeführt. Dieses erlaubt es, der Dosis, welche tatsächlich zellulär oder im Gewebe vorhanden ist, einen toxischen Effekt der Nanopartikel zuzuordnen. Dadurch kann die effektive Dosis als wichtige Größe zum systematischen Vergleich von toxikologischen Studien auf *in vitro* und *in vivo* Basis eingesetzt werden.

Die Ionenstrahlmikroskopie ist zur Zeit die einzige Methode, welche für die intrazelluläre Quantifizierung von unmarkierten Nanopartikeln auf Einzelzellebene in Frage kommt. Deshalb ist sie als zukünftige Referenzmethode für die Dosimetrie von Nanopartikeln sehr gut geeignet.

6. Summary

Nanotechnology plays a key role in the technological progress. But nanoparticles are a potential risk for human health. Because of their relatively large surface area, nanoparticles are characterized by a high reactivity and their small size contributes to a high mobility and bioavailability. Nanoparticles are able to trigger inflammation or the production of reactive oxygen species. Especially lung epithelial cells are the most relevant barrier for the uptake of industrial relevant nanoparticles in everyday life. Because of their small size, nanoparticles can reach single alveoli and are able to enter the blood stream. For this reasons, it is necessary to assess the potential risk which originates from nanoparticles.

This dissertation describes the quantification of the metal oxide nanoparticles Al_2O_3 , TiO_2 , Fe_2O_3 , ZnO and CeO_2 in lung cells by the means of Ion Beam Microscopy. Selected metal oxide nanoparticles were quantified in stretched type II pneumocytes and lung tissue. Furthermore gold and silver nanoparticles were used as marker, to investigate the uptake of the organic nanoparticle graphene.

By the use of the characteristic x-ray emission Ion Beam Microscopy is a highly sensitive method, which allows to visualize the element content of single cells in spatial resolved manner. Dependent on the element, the lower detection limit is reached between 5 - 20 ppm.

In comparison to electron microprobe analysis, Ion Beam Microscopy allows a depth analysis of biological samples up to 80 μm . By the detection of the cellular backscattering signal, it was possible to distinguish between internalized and extracellular associated nanoparticles in cultivated A549-cells.

Because biological samples show a relatively low density and thickness, the time dependent acquisition of the x-ray yield is prone to be a limiting factor in the quantification of the element content in lung cells. By mounting the sample onto a aluminium frame, the distance between the sample and x-ray-detector was reduced significantly. Due to a higher x-ray yield, this allowed to reduce the data acquisition time, at the highly frequented and expensive Ion Beam Facility, by approximately factor two.

Through the extracellular binding or uptake of elements from the washing buffer, the cellular element content can be distorted. The comparison of an ion-free polyethylene glycol-solution with the standard washing buffer showed, that the washing buffer significantly raised the cellular element content of potassium, calcium and especially chlorine. At the same time the concentration

of the structural cellular elements phosphorus and sulfur, as well as the physiological important trace elements iron and zinc, remained constant.

In Ion Beam Microscopy, the analysis of tissue sections requires the application of an embedding media. Because of an inhomogeneous distributed zinc contamination the routinely applied embedding media DePeX, was found not to be suitable. Through the development of a new limonene based embedding media, it is now possible to measure the zinc content in single alveoli.

In the biological environment, the cellular nanoparticle uptake is influenced by the adsorption of Proteins and ions at the nanoparticle surface. For this reason the nanoparticle uptake was studied in presence and absence of the protein shell (corona) under *in vitro* conditions. In presence of the protein-corona all investigated nanoparticles showed a lower cellular concentration and a smaller amount of particles was found on the cell surface.

The cellular uptake of CeO₂ and ZnO nanoparticles was investigated in detail, since ZnO shows a clear cytotoxic effect and CeO₂ is taken up in high amounts and produces a high backscattering yield. In culture media, the nanoparticles CeO₂ and ZnO showed a colocalisation with calcium and phosphorous. Because calcium phosphate is known as transfection reagent, these surface modification, can favor the uptake of these particles.

In comparison to CeO₂, the uptake of ZnO did not result in a saturation. Additionally the reduction of the cellular CeO₂ concentration, after 72 hours of exposure, suggests the exocytosis of these particles. By the application of two different inhibitors, the uptake mechanism of CeO₂-nanoparticles was investigated. It was found, that CeO₂-nanoparticles are taken up by Caveolae and Clathrin mediated endocytosis as well as Macropinocytosis.

The cellular internalisation of CeO₂ and ZnO nanoparticles was studied by the analysis of their cellular backscattering signal. In comparison to external associated nanoparticles, internalized nanoparticles can be identified by a shift to lower backscattering energies, because they lose additionally energy when they pass the covering cell material.

In this context it was observed, that CeO₂ and ZnO nanoparticles are more frequently localized at the cell surface, when they are not covered by a protein corona. At the same time these particles showed a higher cellular concentration.

In lung tissue, stretched type II pneumocytes and cultivated lung cells, an inhomogeneous cellular distribution of the nanoparticles was observed. Here the advantage of Ion Beam Microscopy is, to quantify the nanoparticle concentration in single cells or alveoli. This allows to assess the risk which originates from extreme concentrations in single cells.

Lung tissue is composed of type I and II pneumocytes as well as macrophages. To compare the results from lung tissue analysis with the cell culture results, it is necessary to label the different cell types in lung tissue. Through the application of gold-conjugated antibodies, the visualization of different cell types by Ion Beam Microscopy is possible.

It is difficult to compare the cellular nanoparticle uptake from *in vitro* and *in vivo* studies, since often different forms of application are used. This work introduces the genuine dose concept. This allows to assign a toxicological effect to the dose which is actually present in the cell or tissue. Consequently the genuine dose can be used as important value for the systematic comparison of *in vitro* and *in vivo* data in toxicological studies.

At the moment Ion Beam Microscopy is the only method which is qualified for quantification of unlabeled nanoparticles in single cells. Therefore Ion Beam Microscopy is a suitable reference method for the dosimetry of nanoparticles.

7. Literaturverzeichnis

1. Schulz, J., *et al.* Distribution of sunscreens on skin. *Adv Drug Deliv Rev* **54 Suppl 1**, S157-163 (2002).
2. Shen, B., Scaiano, J.C. & English, A.M. Zeolite encapsulation decreases TiO₂-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol* **82**, 5-12 (2006).
3. Hirakawa, K., Mori, M., Yoshida, M., Oikawa, S. & Kawanishi, S. Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. *Free Radic Res* **38**, 439-447 (2004).
4. Gontier, E.Y., M. D.; Bíró, T.; Hunyadi, J.; Kiss, B-; Gáspár, K-; Pinheiro, T.; Silva, J.N.; Filipe, P. Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin? A comparative electron and ion microscopy study. *Nanotoxicology* **2**, 218 - 231 (2008).
5. Colvin, V.L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol* **21**, 1166-1170 (2003).
6. Karlsson, H.L.G., J.; Cronholm, P.; Moller, L., . Size-dependent toxicity of metal oxide particles - a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* **188**, 112-118 (2009).
7. Kumar, C.S.S.R. Nanomaterials: Toxicity, Health and Environmental Issues.
8. Gray, J.J. The interaction of proteins with solid surfaces. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 110-115 (2004).
9. Norde, W. & Giacomelli, C.E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *J Biotechnol* **79**, 259-268 (2000).
10. Gojova, A., *et al.* Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ Health Perspect* **115**, 403-409 (2007).
11. Libby, P., Ridker, P.M. & Hansson, G.K. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* **54**, 2129-2138 (2009).
12. Park, E.J., *et al.* Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* **180**, 222-229 (2008).
13. Shubayev, V.I., Pisanic, T.R., 2nd & Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 467-477 (2009).
14. Nel, A., Xia, T., Madler, L. & Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622-627 (2006).

15. Garza, K.M., Soto, K.F. & Murr, L.E. Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Int J Nanomedicine* **3**, 83-94 (2008).
16. Oberdorster, G., Oberdorster, E. & Oberdorster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **113**, 823-839 (2005).
17. Donaldson, K. & Tran, C.L. Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol* **14**, 5-27 (2002).
18. Lin, W., Huang, Y.W., Zhou, X.D. & Ma, Y. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol* **25**, 451-457 (2006).
19. Beckett, W.S., *et al.* Comparing inhaled ultrafine versus fine zinc oxide particles in healthy adults: a human inhalation study. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 1129-1135 (2005).
20. AshaRani, P.V., Low Kah Mun, G., Hande, M.P. & Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**, 279-290 (2009).
21. Bhattacharya, K., *et al.* Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol* **6**, 17 (2009).
22. Romero, G.E.-L., I.; Castro-Hartmann, E.; Rojas, E.; Llarena, I.; Sanz, D; Donath, E.; Moya S.E.,. Stepwise Surface Tailoring of Carbon Nanotubes with Polyelectrolyte Brushes and Lipid Layers to Control their Intracellular Distribution and in vitro Toxicity. *Soft Matter* **7**, 6883-6890 (2011).
23. Gambogi, J. Minerals Yearbook: Titanium. *U.S. Geological Survey, Department of the Interior: Washington, DC* (2006).
24. Cioffi, N.R., M.; Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects. (2012).
25. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.K. & Zweck, A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol* **24**, 1211-1217 (2006).
26. Perez-Campana, C., *et al.* Tracing nanoparticles in vivo: a new general synthesis of positron emitting metal oxide nanoparticles by proton beam activation. *Analyst* **137**, 4902-4906 (2012).
27. Luis C. Junqueira, J.C.J.A.L. Basic Histology ISBN 0838505708.
28. Meyer, K.C. & Zimmerman, J.J. Inflammation and surfactant. *Paediatr Respir Rev* **3**, 308-314 (2002).
29. Schulze, C., Schaefer, U.F., Ruge, C.A., Wohlleben, W. & Lehr, C.M. Interaction of metal oxide nanoparticles with lung surfactant protein A. *Eur J Pharm Biopharm* **77**, 376-383 (2011).

30. Verwey, E.J. Theory of the stability of lyophobic colloids. *J Phys Colloid Chem* **51**, 631-636 (1947).
31. Fuchs, A. Flockungsverhalten von Latex-Suspensionen bei Adsorption kationischer Polyelektrolyte verschiedener Molmassen und Ladungsdichten, Dissertation ISBN 3-89675-420-3. (1998).
32. Cedervall, T., *et al.* Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2050-2055 (2007).
33. Dobrovolskaia, M.A., *et al.* Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine* **5**, 106-117 (2009).
34. Lundqvist, M., *et al.* Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14265-14270 (2008).
35. Vertegel, A.A., Siegel, R.W. & Dordick, J.S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir* **20**, 6800-6807 (2004).
36. Monopoli, M.P., Bombelli, F.B. & Dawson, K.A. Nanobiotechnology: nanoparticle coronas take shape. *Nat Nanotechnol* **6**, 11-12 (2011).
37. Oberdorster, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med* **267**, 89-105 (2010).
38. Chithrani, B.D.G., A. A.; Chan, W. C.,. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* **6**, 662-668 (2006).
39. Owens, D.E., 3rd & Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* **307**, 93-102 (2006).
40. Camner, P., *et al.* Experimental and calculated parameters on particle phagocytosis by alveolar macrophages. *J Appl Physiol* **92**, 2608-2616 (2002).
41. SCCS (2011) European Commission. Health and Consumer Protection, Directorate-General for Health and Consumers. Scientific Committee on Consumer Safety "The SCCS's Notes of Guidance For Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation". 7th Revision. Adopted by the SCCS during the 9th plenary meeting of 14 December 2010. SCCS/1416/11.
42. Teeguarden, J.G., Hinderliter, P.M., Orr, G., Thrall, B.D. & Pounds, J.G. Particokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences* **95**, 300-312 (2007).
43. Navin, N. & Hicks, J. Future medical applications of single-cell sequencing in cancer.

- Genome Med* **3**, 31 (2011).
44. Tanaka, N., *et al.* Quantitative analysis of cisplatin sensitivity of human esophageal squamous cancer cell lines using in-air micro-PIXE. *Cancer Sci* **101**, 1487-1492 (2010).
 45. Jeynesa, J.C.G.B., M. J.; Coleyb, H.; Kirkbya, K. J.; Jeynesa, C., . Microbeam PIXE analysis of platinum resistant and sensitive ovarian cancer cells. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* **268**, 2168 - 2171 (2010).
 46. Ortega, R.S., A.; Devèsa, G.,. Nuclear microprobe imaging of gallium nitrate in cancer cells. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* **210**, 364 - 367 (2003).
 47. Ortega, R., *et al.* Cobalt distribution in keratinocyte cells indicates nuclear and perinuclear accumulation and interaction with magnesium and zinc homeostasis. *Toxicol Lett* **188**, 26-32 (2009).
 48. Letelier, M.E., Sanchez-Jofre, S., Peredo-Silva, L., Cortes-Troncoso, J. & Aracena-Parks, P. Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chem Biol Interact* **188**, 220-227 (2010).
 49. Song, W., *et al.* Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol Lett* **199**, 389-397 (2010).
 50. Mädler, L.K., H. K.; Mueller, R. & Pratsinis, S.E.,. Controlled synthesis of nanostructured particles by flame spray pyrolysis. *J. Aerosol Sci.* **33**, 369 – 389 (2002).
 51. Mahmoudi, M., *et al.* Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nanoscale* **3**, 1127-1138 (2011).
 52. Cheng, Y.H.Z., Y.; Cheng, L.; Liu, W., . Effect of complexing agents on properties of electroless Ni–P deposits. *Materials Science and Technology* **24**, 457 – 460 (2008).
 53. Chopra, K.L.D., S. R., . Thin Film Solar Cells. (1983).
 54. Hingorani, S., Pillai, V., Kumar, P., Multani, M.S. & Shah, D.O. Microemulsion Mediated Synthesis of Zinc-Oxide Nanoparticles for Varistor Studies. *Materials Research Bulletin* **28**, 1303-1310 (1993).
 55. Polyakov, A.Y., *et al.* Proton implantation effects on electrical and recombination properties of undoped ZnO. *Journal of Applied Physics* **94**, 2895-2900 (2003).
 56. Schubert, D., Dargusch, R., Raitano, J. & Chan, S.W. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 86-91 (2006).
 57. Chen, J., Patil, S., Seal, S. & McGinnis, J.F. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat Nanotechnol* **1**, 142-150 (2006).
 58. Tarnuzzer, R.W., Colon, J., Patil, S. & Seal, S. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett* **5**, 2573-2577 (2005).

59. http://en.wikipedia.org/wiki/Cerium%28III%29_oxide.
60. Park, B., *et al.* Initial in vitro screening approach to investigate the potential health and environmental hazards of Enviroxtrade mark - a nanoparticulate cerium oxide diesel fuel additive. *Part Fibre Toxicol* **4**, 12 (2007).
61. Abanades, S.F., G., . Thermochemical hydrogen production from a two-step solar driven water-splitting cycle based on cerium oxides. *Solar Energy* **80**, 1611 - 1623 (2006).
62. Feng, X.H., Y. S.; Linda, W.; Davis, J.; Oswald, E.; Lu, J.; Bryg, V.; Freeman S. & Gnizak D.,. CeO₂ Particles for Chemical Mechanical Planarization. *MRS Proceedings* **F3.8**, 767 (2003).
63. Corma, A., Atienzar, P., Garcia, H. & Chane-Ching, J.Y. Hierarchically mesostructured doped CeO₂ with potential for solar-cell use. *Nat Mater* **3**, 394-397 (2004).
64. Nemmar, A., Al-Maskari, S., Ali, B.H. & Al-Amri, I.S. Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, L664-670 (2007).
65. Takenaka, S., *et al.* Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* **18**, 733-740 (2006).
66. Muhlfield, C., *et al.* Visualization and quantitative analysis of nanoparticles in the respiratory tract by transmission electron microscopy. *Part Fibre Toxicol* **4**, 11 (2007).
67. Mayhew, T.M., Muhlfield, C., Vanhecke, D. & Ochs, M. A review of recent methods for efficiently quantifying immunogold and other nanoparticles using TEM sections through cells, tissues and organs. *Ann Anat* **191**, 153-170 (2009).
68. Fischer, H.C.F.-B., S.; Chan, W. C. W.; Pang, K. S.,. Quantitative Detection of Engineered Nanoparticles in Tissues and Organs: An Investigation of Efficacy and Linear Dynamic Ranges Using ICP-AES. *NanoBiotechnology* **3**, 46-54 (2007).
69. Fink, A.L., Calciano, L.J., Goto, Y., Kurotsu, T. & Palleros, D.R. Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. *Biochemistry* **33**, 12504-12511 (1994).
70. Uo, M., Watari, F., Yokoyama, A., Matsuno, H. & Kawasaki, T. Visualization and detectability of elements rarely contained in soft tissue by X-ray scanning analytical microscopy and electron-probe micro analysis. *Biomaterials* **22**, 1787-1794 (2001).
71. Yu, J.Z., H.; Ye, L.; Yang, H.; Ku, S.; Yang, N.; Xiao, N.,. Effect of surface functionality of magnetic silica nanoparticles on the cellular uptake by glioma cells in vitro. *J. Mater. Chem.* **19**, 1265 – 1270 (2009).

72. Herr, J.K., Smith, J.E., Medley, C.D., Shangguan, D. & Tan, W. Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells. *Anal Chem* **78**, 2918-2924 (2006).
73. Zucker, R.M. & Daniel, K.M. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Methods Mol Biol* **906**, 497-509 (2012).
74. Chau, J.Y., M.; Li, A.; Su, W.; Chang, K.; Hsueh, S.; Li, T.,. Transparent high refractive index nanocomposite thin films. *Materials Letters* **61**, 2908-2910 (2007).
75. Raschke, G.K., S.; Franzl, T.; Sonnichsen, C.; Klar, T. A.; Feldmann, J.,. Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering. *Nano Lett.* **3**, 935–938 (2003).
76. Neumeier, A.B., M.; Veith, M.; Lehr, C. M.; Daum, N.,. Propidium iodide labeling of nanoparticles as a novel tool for the quantification of cellular binding and uptake. *Nanomed-Nanotechnol* **7**, 410-419 (2011).
77. Zucker, R.M., Massaro, E.J., Sanders, K.M., Degen, L.L. & Boyes, W.K. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry A* **77**, 677-685 (2010).
78. Fahrni, C.J. Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 121-127 (2007).
79. Waern, J.B., *et al.* Intracellular mapping of the distribution of metals derived from the antitumor metallocenes. *J Biol Inorg Chem* **10**, 443-452 (2005).
80. Barapatre, N., Morawski, M., Butz, T. & Reinert, T. Trace element mapping in Parkinsonian brain by quantitative ion beam microscopy. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* **268**, 2156-2159 (2010).
81. Fiedler, A.R., T.; Morawski, M.; Bruckner, G.; Arendt, T.; Butz, T., . Intracellular iron concentration of neurons with and without perineuronal nets. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B - beam Interactions With Materials and Atoms* **260**, 153-158 (2007).
82. Kostarelos, K., *et al.* Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat Nanotechnol* **2**, 108-113 (2007).
83. Lin, H.C., *et al.* Quantitative measurement of nano-/microparticle endocytosis by cell mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 3460-3464 (2010).
84. Laverman, P., Carstens, M.G., Storm, G. & Moghimi, S.M. Recognition and clearance of methoxypoly(ethyleneglycol)2000-grafted liposomes by macrophages with enhanced phagocytic capacity. Implications in experimental and clinical oncology. *Biochim Biophys Acta* **1526**, 227-229 (2001).

85. Kommareddy, S. & Amiji, M. Biodistribution and pharmacokinetic analysis of long-circulating thiolated gelatin nanoparticles following systemic administration in breast cancer-bearing mice. *J Pharm Sci* **96**, 397-407 (2007).
86. Weia, Y.H., B.; Hua, X.; Linc, Y.; Wangd, X.; Deng, X.,. Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles and their Magnetic Properties. *Procedia Engineering* **27**, 632 – 637 (2012).
87. Ballot, S., *et al.* 99mTc/188Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **33**, 602-607 (2006).
88. Bao, A., Goins, B., Klipper, R., Negrete, G. & Phillips, W.T. 186Re-liposome labeling using 186Re-SNS/S complexes: in vitro stability, imaging, and biodistribution in rats. *J Nucl Med* **44**, 1992-1999 (2003).
89. Banerjee, T., Singh, A.K., Sharma, R.K. & Maitra, A.N. Labeling efficiency and biodistribution of Technetium-99m labeled nanoparticles: interference by colloidal tin oxide particles. *Int J Pharm* **289**, 189-195 (2005).
90. Liang, S.W., Y. X.; Zhang, C. F.,. Synthesis of amino-modified magnetite nanoparticles coated with Hepama-1 and radiolabeled with Re-188 for bio-magnetically targeted radiotherapy. *J Radioanal Nucl Chem.* **269**, 3 – 7 (2006).
91. Massoud, T.F. & Gambhir, S.S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* **17**, 545-580 (2003).
92. Gambhir, S.S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* **2**, 683-693 (2002).
93. Filipe, V., Hawe, A. & Jiskoot, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res* **27**, 796-810 (2010).
94. Jana Fleddermann, Dissertation: "In vitro Untersuchungen der Aufnahme und des biologischen Effektes von Metalloxid-Nanopartikeln auf Alveolarepithelzellen", Universität Leipzig, 2014.
95. Gil, J. & Weibel, E.R. Morphological study of pressure-volume hysteresis in rat lungs fixed by vascular perfusion. *Respir Physiol* **15**, 190-213 (1972).
96. Centre for Ion Beam Applications, Department of Physics, National University of Singapore, Blk S7, 2 Science Drive 3, 117542 Singapore
97. Japan Atomic Energy Agency Watanuki 1233, Takasaki, Gunma 370-1292, Japan.
98. Surrey Ion Beam Centre, Nodus Laboratory University of Surrey, Guildford Surrey GU2

7XH, United Kingdom

99. Institut für Angewandte Physik und Messtechnik LRT2, Universität der Bundeswehr München
100. R. Ortega, Chimie Nucléaire Analytique et Bioenvironnementale, CNRS UMRS084, Université de Bordeaux 1, BP 120 Le Haut-Vigneau, 33175 Gradignan cedex, France.
101. Butz, T.F., R. H.; Heitmann, J.; Jamieson, D. N.; Legge, G.J.F.; Lehmann, D.; Reibetanz, U.; Reinert, T.; Saint, A.; Spemann, D.; Szymanski, R.; Tröger, W.; Vogt, J.; Zhu, J. The Leipzig high-energy ion nonoprobe: A report on first results. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* **619**, 323 – 327 (2000).
102. Andrea, T.R., M.; Butz, T.; Reinert, T. The improved STIM tomography set-up at LIPSION: Three-dimensional reconstruction of biological samples. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* **267**, 2098 – 2102 (2009).
103. Klinger, N. Entwicklung eines Systems zur hochaufgelösten Rutherford-Rückstreu-Spektrometrie mittels Halbleiterdetektoren. Masterarbeit, Universität Leipzig. (2012).
104. Rutherford, E. The Scattering of α and β Particles by Matter and the Structure of the Atom. *Philos. Mag.* **6**, 21 (1911).
105. Tesmer, J.R.N., M., . *Handbook of Modern Ion Beam Materials Analysis.* , (Materials Research Society, 1995).
106. <http://www-nds.iaea.org/sigmacalc>.
107. <http://www-nds.iaea.org/ibandl>.
108. Johansson, S.A.E.J., T.B., . Analytical Application of Particle Induced X-ray Emission. . *Nucl. Instr. and Meth.* **137**, 473 – 516 (1976).
109. Birks, L.S.S., R. E.; Batt, A P.; Grosso, J. S.,. Excitation of characteristic X-rays by protons, electrons and primary X-rays. *J. Appl. Phys.* **35**, 2578 – 2581 (1964).
110. Mantler, M.S., M., . X-ray fluorescence spectrometry in art and archaeology. *X-Ray Spectrometry* **29**, 3 – 17 (2000).
111. Macarthur, J.D.M., X. P., . A review of particle-induced x-ray emission in geology. *Int. J. PIXE* **01**, 311 (1991).
112. Johansson, S.C., J.; Malmqvist, K., . *Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (Pixe)*. (1995).
113. Ryan, C.G.G., W. L.,. The nuclear microprobe as a tool in geology and mineral exploration. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* **77**, 381 - 398 (1993).
114. Ryan, C.G.J., D. N.,. Dynamic analysis: on-line quantitative PIXE microanalysis and its use in overlap-resolved elemental mapping. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* **77**, 203 – 214

- (1993).
115. Overleya, J.C.S., R.M.S.; Macdonalda, J.D.; Lefevrea, H.W.,. Energy-loss image formation in scanning transmission ion microscopy. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* **30**, 337 – 341 (1988).
 116. Deves, G. & Ortega, R. Subcellular mass determination by 4He^+ energy-loss microspectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* **374**, 390-394 (2002).
 117. Ziegler, J.F.Z., M. D.; Biersack, J. P., . SRIM – The stopping and range of ions in matter (2010). *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* **268**, 1818 - 1823 (2010).
 118. CANBERRA Industries Inc., Ultra-LEGe Detector (GUL0110).
 119. http://de.wikipedia.org/wiki/Massenspektrometrie_mit_induktiv_gekoppeltem_Plasma.
 120. Mallucci, L., Wells, V. & Young, M.R. Effect of trypsin on cell volume and mass. *Nat New Biol* **239**, 53-55 (1972).
 121. Giard, D.J., *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1417-1423 (1973).
 122. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63 (1983).
 123. Berridge, M.V. & Tan, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* **303**, 474-482 (1993).
 124. Berridge, M.V.H., P. M. & Tan, A. S., . Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* **11**, 127 - 152 (2005).
 125. Dikalov, S., Griendling, K.K. & Harrison, D.G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* **49**, 717-727 (2007).
 126. Zieglera, J.F., Zieglerb, M.D. & Biersack, J.P. SRIM – The stopping and range of ions in matter (2010). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* **268**, 1818-1823 (2010).
 127. Goodfellow Produkt Nr. ET311115, Polyethylen-Film (niedrige Dichte), Dicke: 0,015 mm, Breite: 500 mm.
 128. Mohantya, B.P.B., P.; Gargc, M. L.; Nandid, T. K.; Mittala, V. K.; Govilb, I. M.,. Comparison of experimental and theoretical efficiency of HPGe X-ray detector. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. A* **584**, 186 - 190 (2008).
 129. Musket, R.G.B., W., . Determination of gold-layer and dead-layer thicknesses for a Si(Li)

- detector. . *Nuclear Instruments and Methods* **109**, 593-595 (1973).
130. Carmona, A., Deves, G. & Ortega, R. Quantitative micro-analysis of metal ions in subcellular compartments of cultured dopaminergic cells by combination of three ion beam techniques. *Analytical and bioanalytical chemistry* **390**, 1585-1594 (2008).
131. Phatanasri, S.P., P.; Punsupsawat, T. Influence of Fe or Zn loading method on toluene methylation over MFI-type zeolite catalysts. *Korean Journal of Chemical Engineering* **17**, 414 - 419 (2000).
132. Stanley, C.B.S., H. H., . Measuring Osmotic Pressure of Poly(ethylene glycol) Solutions by Sedimentation Equilibrium Ultracentrifugation. *Macromolecules* **36**, 6888-6893 (2003).
133. Adrian, R.H. & Slayman, C.L. Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle. *The Journal of physiology* **184**, 970-1014 (1966).
134. Wirtz, H.R. & Dobbs, L.G. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science* **250**, 1266-1269 (1990).
135. Bareford, L.M. & Swaan, P.W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 748-758 (2007).
136. Everett, W.N., *et al.* Phosphate-enhanced cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles and agglomerates. *Toxicology Letters* **225**, 177-184 (2014).
137. Singh, S., *et al.* A phosphate-dependent shift in redox state of cerium oxide nanoparticles and its effects on catalytic properties. *Biomaterials* **32**, 6745-6753 (2011).
138. Everett, W.N., *et al.* Phosphate-enhanced cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles and agglomerates. *Toxicol Lett* **225**, 177-184 (2014).
139. Kim, J.S.Y., t. J.; Yu, K. N.; Noh, M. S.; Woo, M.; Kim, B. G.; Lee, K. H.; Sohn, B. H.; Park, S. B.; Lee, J. K. & Cho, M. H.,. Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J Vet Sci.* **4**, 321 - 326 (2006).
140. Cartiera, M.S., Johnson, K.M., Rajendran, V., Caplan, M.J. & Saltzman, W.M. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials* **30**, 2790-2798 (2009).
141. Geiser, M., *et al.* Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* **113**, 1555-1560 (2005).
142. Xia, T., *et al.* Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* **2**, 2121-2134 (2008).
143. Maret, W. Zinc and sulfur: a critical biological partnership. *Biochemistry* **43**, 3301-3309

- (2004).
144. Coleman, J.E. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem* **61**, 897-946 (1992).
 145. Lai, Y.R., *et al.* Comparison of in vitro nanoparticles uptake in various cell lines and in vivo pulmonary cellular transport in intratracheally dosed rat model. *Nanoscale Res Lett* **3**, 321-329 (2008).
 146. Shapero, K., *et al.* Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells. *Mol Biosyst* **7**, 371-378 (2011).
 147. dos Santos, T., Varela, J., Lynch, I., Salvati, A. & Dawson, K.A. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PLoS One* **6**, e24438 (2011).
 148. West, M.A., Bretscher, M.S. & Watts, C. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol* **109**, 2731-2739 (1989).
 149. Ruge, C.A., *et al.* Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein A. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **7**, 690-693 (2011).
 150. Ryan, R.M., Morris, R.E., Rice, W.R., Ciruolo, G. & Whitsett, J.A. Binding and Uptake of Pulmonary Surfactant Protein (Sp-a) by Pulmonary Type-Ii Epithelial-Cells. *J Histochem Cytochem* **37**, 429-440 (1989).
 151. Mourant, J.R., *et al.* Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics. *Appl Opt* **37**, 3586-3593 (1998).
 152. Oberdorster, G., Oberdorster, E. & Oberdorster, J. Concepts of nanoparticle dose metric and response metric. *Environ Health Perspect* **115**, A290 (2007).
 153. Geim, A.K. & Novoselov, K.S. The rise of graphene. *Nature Materials* **6**, 183-191 (2007).
 154. Zhang, L.M., Xia, J.G., Zhao, Q.H., Liu, L.W. & Zhang, Z.J. Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs. *Small* **6**, 537-544 (2010).
 155. Liu, Z., Robinson, J.T., Sun, X.M. & Dai, H.J. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 10876-+ (2008).
 156. Boisselier, E. & Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev* **38**, 1759-1782 (2009).
 157. Mani, V., Chikkaveeraiah, B.V., Patel, V., Gutkind, J.S. & Rusling, J.F. Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and

- Multienzyme-Particle Amplification. *ACS Nano* **3**, 585-594 (2009).
158. Lee, J.S., Lytton-Jean, A.K., Hurst, S.J. & Mirkin, C.A. Silver nanoparticle-oligonucleotide conjugates based on DNA with triple cyclic disulfide moieties. *Nano Lett* **7**, 2112-2115 (2007).
159. Thompson, C.M., Markesbery, W.R., Ehmann, W.D., Mao, Y.X. & Vance, D.E. Regional brain trace-element studies in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* **9**, 1-7 (1988).
160. Dexter, D.T., *et al.* Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* **52**, 1830-1836 (1989).
161. Wilhelmi, V., *et al.* Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS One* **8**, e65704 (2013).
162. persönliche Mitteilung von Dr. Søren Thor Larsen (National Institute of Occupational Health, Dänemark).
163. Eisen und Eisenproteine in Neuronen mit perineuronalem Netz. Dissertation Anja Fiedler 2009, Universität Leipzig
164. Battley, E.H. An apparent anomaly in the calculation of ash-free dry weights for the determination of cellular yields. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1655-1657 (1995).
165. Cortassa, S. *An introduction to metabolic and cellular Engineering.*, (2002).
166. Gardner, E.C., J.; McClellan, R. Toxicology of the Lung; ISBN 978-0881679663 (2000).
167. Melgert, B.N., *et al.* Macrophages: regulators of sex differences in asthma? *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 595-603 (2010).
168. Antal-Szalmas, P., Strijp, J.A., Weersink, A.J., Verhoef, J. & Van Kessel, K.P. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* **61**, 721-728 (1997).
169. Krombach, F., *et al.* Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environ Health Perspect* **105 Suppl 5**, 1261-1263 (1997).
170. Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Muhlfeld, C. & Gehr, P. In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **4**, 1075-1089 (2008).
171. Krezel, A. & Maret, W. Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**, 1049-1062 (2006).
172. Andree, K.B., *et al.* Investigation of lymphocyte gene expression for use as biomarkers for zinc status in humans. *Journal of Nutrition* **134**, 1716-1723 (2004).
173. Nicolas, G. Advantages of fast-freeze fixation followed by freeze-substitution for the preservation of cell integrity. *J Electron Microsc Tech* **18**, 395-405 (1991).
174. Fernandez-Segura, E., Canizares, F.J., Cubero, M.A., Warley, A. & Campos, A. Changes in

- elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res* **253**, 454-462 (1999).
175. Sobota, A., Burovina, I.V., Pogorelov, A.G. & Solus, A.A. Correlation between Potassium and Phosphorus-Content and Their Nonuniform Distribution in *Acanthamoeba-Castellanii*. *Histochemistry* **81**, 201-204 (1984).
176. Stys, P.K. & Lopachin, R.M. Elemental composition and water content of rat optic nerve myelinated axons during in vitro post-anoxia reoxygenation. *Neuroscience* **73**, 1081-1090 (1996).
177. Eckenhoff, R.G. & Somlyo, A.P. Rat Lung Type-II Cell and Lamellar Body - Elemental Composition Insitu. *American Journal of Physiology* **254**, C614-C620 (1988).
178. Cameron, I.L., Smith, N.K.R., Pool, T.B. & Sparks, R.L. Intracellular Concentration of Sodium and Other Elements as Related to Mitogenesis and Oncogenesis In vivo. *Cancer Research* **40**, 1493-1500 (1980).
179. Ren, M., *et al.* Nuclear microscopy of rat colon epithelial cells. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **269**, 2264 - 2268 (2011).
180. Rajendran, R., *et al.* A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits-Insights into the pathology of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **382**, 91-95 (2009).
181. O'Grady, S.M. & Lee, S.Y. Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **284**, L689-L700 (2003).
182. Mulware, S.J. Comparative Trace Elemental Analysis in Cancerous and Noncancerous Human Tissues Using PIXE. *J Biophys* **2013**, 192026 (2013).
183. Roomans, G.M. Quantitative X-ray microanalysis of biological specimens. *J Electron Microscop Tech* **9**, 19-43 (1988).
184. Singh, S., *et al.* A phosphate-dependent shift in redox state of cerium oxide nanoparticles and its effects on catalytic properties. *Biomaterials* **32**, 6745-6753 (2011).
185. Chou, Y.F., Huang, W., Dunn, J.C., Miller, T.A. & Wu, B.M. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. *Biomaterials* **26**, 285-295 (2005).
186. Eda, G., *et al.* Transparent and conducting electrodes for organic electronics from reduced graphene oxide. *Applied Physics Letters* **92**(2008).
187. Tozzini, V. & Pellegrini, V. Prospects for hydrogen storage in graphene. *Physical Chemistry*

- Chemical Physics* **15**, 80-89 (2013).
188. Liu, Y., Yu, D.S., Zeng, C., Miao, Z.C. & Dai, L.M. Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. *Langmuir* **26**, 6158-6160 (2010).
189. Jung, J.H., Cheon, D.S., Liu, F., Lee, K.B. & Seo, T.S. A Graphene Oxide Based Immuno-biosensor for Pathogen Detection. *Angewandte Chemie-International Edition* **49**, 5708-5711 (2010).
190. Chang, Y.L., *et al.* In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology Letters* **200**, 201-210 (2011).
191. Sen, N., Weprin, S. & Peter, Y. Discrimination Between Lung Homeostatic and Injury-Induced Epithelial Progenitor Subsets by Cell-Density Properties. *Stem Cells and Development* **22**, 2036-2046 (2013).
192. Jones, G.S., Miles, P.R., Lantz, R.C., Hinton, D.E. & Castranova, V. Ionic Content and Regulation of Cellular-Volume in Rat Alveolar Type-Ii Cells. *Federation Proceedings* **41**, 1601-1601 (1982).
193. Wang, K., *et al.* Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters* **6**(2011).
194. Wilhelm, C., *et al.* Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* **24**, 1001-1011 (2003).
195. Zhang, Y., Kohler, N. & Zhang, M.Q. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **23**, 1553-1561 (2002).
196. Sakhtianchi, R., *et al.* Exocytosis of nanoparticles from cells: role in cellular retention and toxicity. *Adv Colloid Interface Sci* **201-202**, 18-29 (2013).
197. Ollivier, H., *et al.* Effects of hypo-osmotic stress on ATP release in isolated turbot (*Scophthalmus maximus*) hepatocytes. *Biol Cell* **98**, 427-437 (2006).
198. Wang, Y., Roman, R., Lidofsky, S.D. & Fitz, J.G. Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 12020-12025 (1996).
199. Zheng, L.M., Zychlinsky, A., Liu, C.C., Ojcius, D.M. & Young, J.D.E. Extracellular Atp as a Trigger for Apoptosis or Programmed Cell-Death. *Journal of Cell Biology* **112**, 279-288 (1991).
200. Rounds, S., *et al.* Mechanism of extracellular ATP- and adenosine-induced apoptosis of cultured pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol-Lung C* **275**, L379-L388 (1998).
201. Heckert, E.G., Karakoti, A.S., Seal, S. & Self, W.T. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials* **29**, 2705-2709 (2008).
202. Lin, W.S., Huang, Y.W., Zhou, X.D. & Ma, Y.F. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in

- human lung cancer cells. *International Journal of Toxicology* **25**, 451-457 (2006).
203. Suzuki, H., Toyooka, T. & Ibuki, Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ Sci Technol* **41**, 3018-3024 (2007).
204. Christoph Sandner - Dissertation: Veränderung der intra- und extrazellulären Zinkionenkonzentration infolge Zinkoxidnanopartikelexposition in Abhängigkeit von FKS-Supplementierung., Universität Leipzig.
205. Kao, Y.Y., Chen, Y.C., Cheng, T.J., Chiung, Y.M. & Liu, P.S. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicol Sci* **125**, 462-472 (2012).
206. Shen, C., *et al.* Relating cytotoxicity, zinc ions, and reactive oxygen in ZnO nanoparticle-exposed human immune cells. *Toxicol Sci* **136**, 120-130 (2013).
207. Reed, R.B., Ladner, D.A., Higgins, C.P., Westerhoff, P. & Ranville, J.F. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environ Toxicol Chem* **31**, 93-99 (2012).
208. Gilbert, B., *et al.* The fate of ZnO nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells. *ACS Nano* **6**, 4921-4930 (2012).
209. Eguchi, Y., Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Research* **57**, 1835-1840 (1997).
210. Zhu, T., *et al.* Zinc ions bind to and inhibit activated protein C. *Thromb Haemost* **104**, 544-553 (2010).
211. Wilson, M., Hogstrand, C. & Maret, W. Picomolar concentrations of free zinc(II) ions regulate receptor protein-tyrosine phosphatase beta activity. *J Biol Chem* **287**, 9322-9326 (2012).
212. Rahman, Q., *et al.* Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environmental Health Perspectives* **110**, 797-800 (2002).
213. Bhattacharya, S., Zhang, Q., Carmichael, P.L., Boekelheide, K. & Andersen, M.E. Toxicity Testing in the 21(st) Century: Defining New Risk Assessment Approaches Based on Perturbation of Intracellular Toxicity Pathways. *PLoS One* **6**(2011).
214. Spielmann, H. The EU Commission's Draft Report on Alternative (Non-animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects-2010: A Missed Opportunity. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **38**, 339-343 (2010).

Danksagung

Professor Edwin Donath und Professor Sergio Moya danke ich für die Realisierung zahlreicher internationaler Projekte, wie z.B. HINAMOX und TRANSDADE, die es ermöglicht haben an interessanten Themen der Nanowissenschaften zu forschen.

Dabei gilt insbesondere Professor Donath einen Dank für die Bereitstellung eines so fruchtbaren Themas, das überlassene Vertrauen, sowie die sehr hochwertige Betreuung. Professor Gerd Poeggel danke ich für die Übernahme der Betreuung an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie und für die Hilfe bei der statistischen Auswertung. Dr. Irina-Estrela-Lopis danke ich für die freundliche tägliche Betreuung, unzählige ergebnisreiche Diskussionen und für die Unterstützung bei physikalischen Fragestellungen. P

Weiterhin gilt meinem Dank Professor Changyou Gao und Professor Zhengwei Mao, welche den Forschungsaufenthalt an der Zhejiang Universität in persönlicher und fachlicher Hinsicht zu einer unvergesslichen Bereicherung gemacht haben. Dr. habil. Marcin Nowicki danke ich für die angenehme und produktive Kooperation sowie für seine Expertise im Umgang mit Lungengewebe.

Jana Fleddermann danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit in den gemeinsamen Projekten und die angenehme Atmosphäre im Büro. Dr. Luis Cuellar danke ich für viele neue Forschungsideen und die stetige Unterstützung bei den Messungen im Lipsion-Labor. Dr. Jürgen Vogt gebührt meinen Dank, da er stets mit einem kompetenten Rat zur Seite stand und diese wie andere Arbeiten zu unterstützt hat. Ralf Wunderlich und Nico Klinger für die Entwicklung und Einführung des Korrektursystems der Totzeit bzw. die Verbesserte Auflösung am RBS-Detektors. Ich danke Dr. Nirav Barapatre für die unzähligen und wertvollen Tipps und Tricks zur Analyse von biologischen Material am Lipsion. Dr. Chris Ryan (Universität Melbourne & CSIRO) für die Bereitstellung und die Expertise zur Software GeoPIXE II. Joachim Starke und Carsten Pahnke danke ich für die freundliche Atmosphäre und ihren unermüdlichen Einsatz bei technischen Schwierigkeiten im Lipsion-Labor. Ohne sie wären einige Messungen nicht in diesem Umfang möglich gewesen. Steffen Jahnkuhn möchte ich für die technische Einweisung in das Lipsion Laboratorium danken. Christoph Sandner danke ich für die selbständige und konstruktive Zusammenarbeit bei der fluorometrischen Quantifizierung freier Zinkionen. Elke Typlt gilt der Dank für zahlreiche Tipps und Tricks im Labor und die vorbildliche Organisation aller technischen Geräte. Ohne sie wären einige Experimente so nicht möglich gewesen.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit selbständig in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Donath und Prof C. Gao angefertigt wurde. Es kamen ausschließlich die angegeben Quellen bzw. Hilfsmittel zum Einsatz. Beiträge die aus Veröffentlichungen übernommen wurden oder experimentelle Beiträge Dritter sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin erkläre ich, dass diese Promotionsarbeit nicht Gegenstand anderer Prüfungsverfahren ist.

Leipzig, 24.03.2014

Marco Dorn

Lebenslauf

Marco Dorn

Willi-Bredel-Straße 14 / 110
04279 Leipzig
Tel.: +49 0178 1670439
Marco.Dorn@web.de

Persönliche Daten

geboren am 13.08.1983 in Dresden
Familienstand ledig

Wissenschaftlicher Werdegang

2003 Abitur, Elsterschloß Gymnasium, Elsterwerda

WS 2003/04 - Grundstudium Biochemie, Universität Halle-Wittenberg
SS 2006

WS 2006/07 - Hauptstudium Biochemie, Universität Leipzig
SS 2009 Diplomarbeit zum Thema „Effekte des Pigmentepithel-abhängigen Faktors (PEDF) auf monozytäre und retinale Endothelzellen: Untersuchungen zu Signaltransduktion und zellulärem Überleben in vitro“ in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Eichler

2008 Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Eichler, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Leipzig

seit 2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Donath, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig,

Auslandsaufenthalt

WS 2012/13 & Zhejiang University, Department of Polymer Science & Engineering,
SS 2014 Hangzhou (China)

Publikationen

X. Zhou, M. Dorn, Jürgen Vogt, W. Yu, Zh. Mao, I. Estrela-Lopis, E. Donath, C. Gao. Uptake of graphene/noble metal nanoparticles composites and their toxicity to cells., is submitted

J. Llop, I. Estrela-Lopis, M. Dorn, J. Fleddermann, R. Ziolo, A. González, V.G. Vallejo, Zw. Mao, E. Donath, C. Gao, S. Moya. Uptake, Biological Fate and Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles. *Particle & Particle Systems Characterization* **31**, 24 – 35 (2013)

Tagungsbeiträge

M. Dorn, D. Spemann, J. Vogt, S. Jahnkuhn, J. Fleddermann, I. Estrela-Lopis and E. Donath. Study of nanoparticle uptake and quantification in lung cells by Ion Beam Microscopy. 10th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2011 – Abstract book (Thiery, J., Beck-Sickinger, A., Arendt, T., Hrsg.) Universität Leipzig 2011.

M. Dorn, Larsen, S. T., J. Fleddermann, I. Estrela-Lopis and E. Donath. Study of Nanoparticle uptake and quantification by Ion Beam Microscopy, 7th Hinamox meeting, Kopenhagen 19. - 20. 04. 2012