

Aus der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik – Plastische Operationen
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

ZnO-Nanopartikel als Radiosensitizer in epithelialen Tumorzellen der Linie A549

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Judith Fiona Theresa Hill
aus Herne

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion.....	3
2.1 Kopf-Hals-Tumoren.....	3
2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	3
2.1.2 Pathogenese	4
2.1.3 Aktuelle Therapiemöglichkeiten.....	4
2.1.4 Prognose	6
2.2 Strahlentherapie.....	7
2.2.1 Grundlagen	7
2.2.2 Strahlensensibilität	8
2.3 Zink	9
2.4 Nanotechnologie.....	10
2.4.1 Vorkommen und Verwendung von Nanopartikeln	10
2.4.2 Potenzielle Eintrittspforten in den menschlichen Organismus.....	11
2.4.3 Zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln	12
2.5 Toxizitätsmechanismen von Nanopartikeln	14
2.5.1 Schädigung von Zellmembran und Zellorganellen	14
2.5.2 Inflammatorisches Potential	15
2.5.3 Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	16
2.5.4 Schädigung durch Ionenfreisetzung.....	18
2.5.5 Genotoxizität.....	19
2.6 Apoptose.....	20
2.7 Nanopartikel in der Krebsforschung.....	22
2.7.1 Nanopartikel in der Therapie	22
2.7.1.1 Direkte Toxizität der Nanopartikel.....	22
2.7.1.2 Nanopartikel zur zielgerichteten Therapie und als Wirkstoffträger	22
2.7.2 Nanopartikel in der Diagnosefindung	24
2.8 Das Chorioallantoismembran-Modell.....	25
2.8.1 Die Chorioallantoismembran	26
2.8.2 Funktion der Chorioallantoismembran.....	27
3. Material und Methoden.....	28
3.1 Material	28
3.1.1 Zellen.....	28
3.1.2 Eier	28

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Laborgeräte	28
3.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.5	Zellkulturmedien, Zusätze, Puffer.....	30
3.1.6	Chemikalien.....	30
3.1.7	Reagenzien der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	31
3.1.8	Software	31
3.2	Methoden.....	32
3.2.1	Herstellung und Charakterisierung der ZnO-Nanopartikel (15nm).....	32
3.2.2	Zellkultur	32
3.2.2.1	Zellzahlbestimmung.....	32
3.2.3	Durchführung des Kolonie-Assays	33
3.2.3.1	Behandlungsschema	33
3.2.3.2	Zellaussaat.....	34
3.2.3.3	ZnO-Nanopartikelinkubation	35
3.2.3.4	Bestimmung der Zellvitalität durch CASY TT® und Bestrahlung.....	35
3.2.3.5	Kultivierung	36
3.2.3.6	Fixieren und Färben.....	37
3.2.4	Auswertung des Kolonie-Assays	37
3.2.4.1	Bestimmung der Koloniezahl mittels des Colcount-Scanners	37
3.2.4.2	Bestimmung der Überlebensfraktion.....	38
3.2.5	Untersuchung der Zellmorphologie	39
3.2.6	Durchführung des CAM-Assays	39
3.2.6.1	Inkubation der Eier.....	39
3.2.6.2	Öffnen der Eier.....	39
3.2.6.3	Aufbringen der Tumorzellen.....	40
3.2.6.4	Fixieren und Färben der CAM.....	41
3.2.6.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	41
3.2.7	Statistische Auswertung	42
4.	Ergebnisse.....	43
4.1	Kolonie-Assay.....	43
4.1.1	Untersuchung der Einflussfaktoren Nanopartikel-Konzentration, Inkubationszeit und Bestrahlung mittels multipler linearer Regression	44
4.1.2	Der Einfluss der Bestrahlungsdosis auf die Überlebensfraktion.....	45
4.1.3	Der Einfluss der ZnO-Nanopartikel-Konzentration auf die Überlebensfraktion	46
4.1.4	Der Einfluss der ZnO-Nanopartikel-Inkubationszeit auf die Überlebensfraktion	47
4.1.5	Evaluation der Strahleneffizienz in der kombinierten Behandlung mit Nanopartikeln	48
4.1.5.1	Veränderung der Überlebensfraktion abhängig von Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel ohne anschließende Bestrahlung.....	49
4.1.5.2	Veränderung der Überlebensfraktion abhängig von Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel mit anschließender Bestrahlung von 2 Gy	51

Inhaltsverzeichnis

4.1.5.3	Veränderung der Überlebensfraktion abhängig von Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel mit anschließender Bestrahlung von 4 Gy	53
4.1.5.4	Veränderung der Überlebensfraktion abhängig von Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel mit anschließender Bestrahlung von 8 Gy	55
4.2	Zellmorphologie nach ZnO-Inkubation und fraktionierter Bestrahlung	58
4.2.1	Zellmorphologie nach ZnO-Inkubation ohne Bestrahlung	59
4.2.2	Zellmorphologie nach ZnO-Inkubation und fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy	60
4.2.3	Zellmorphologie nach ZnO-Inkubation und fraktionierter Bestrahlung mit 4 Gy	61
4.3	Auswertung des CAM-Modells	62
4.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	63
5.	Diskussion	64
5.1	Kolonie-Assay	65
5.1.1	Die Bestrahlungsdosis beeinflusst das Zellüberleben der Tumorzellen	65
5.1.2	Die Exposition der Tumorzellen mit ZnO-Nanopartikeln beeinflusst das Zellüberleben ..	68
5.1.3	ZnO-Nanopartikel als Radiosensitizer – die Kombinationstherapie verstärkt die Reduktion des Zellüberlebens der Tumorzellen	69
5.2	Morphologische Veränderungen der Tumorzellen nach der kombinierten Behandlung aus ZnO-Nanopartikeln und fraktionierter Bestrahlung	73
5.3	Das Chorioallantoismembran (CAM)-Modell	75
5.3.1	Hintergrund	75
5.3.2	Durchführung des Chorioallantoismembran (CAM)-Modells	75
5.3.3	Ergebnisse und Auswertung des CAM-Modells	76
5.3.3.1	Die erfolgreiche Implantation von Tumoren auf der CAM	76
5.3.3.2	Mögliche Optimierungen der Versuchsbedingungen	77
5.4	Ausblick	78
6.	Zusammenfassung	79
7.	Literaturverzeichnis	81
8.	Anhang	91
8.1	Modelzusammenfassung	91
8.2	Regressionskoeffizienten	91
8.3	Anova	91
8.4	Explorative Datenanalyse der Einflussgröße Bestrahlungsdosis	92
8.5	Explorative Datenanalyse der Einflussgröße ZnO-NP-Konzentration	93
8.6	Explorative Datenanalyse der Einflussgröße ZnO-NP-Inkubationsdauer	94
8.7	Nicht parametrische Testung (Kruskal-Wallis-Tests)	95
8.7.1	Einflussgröße Bestrahlungsdosis [Gy]	95
8.7.2	Einflussgröße ZnO-Nanopartikel-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	95
8.7.3	Einflussgröße ZnO-Nanopartikel-Inkubationsdauer [h]	95

Inhaltsverzeichnis

8.8	Mittelwerte und Standardabweichung der Surviving Fraction.....	96
8.9	Auswertung Colcount-Scanner und Berechnungen.....	97
8.9.1	Ansatz 1: 0,1µg/ml ZnO-NP.....	97
8.9.2	Ansatz 2: 0,1µg/ml ZnO-NP.....	98
8.9.3	Ansatz 3: 0,1µg/ml ZnO-NP.....	99
8.9.4	Ansatz 4: 0,1µg/ml ZnO-NP.....	100
8.9.5	Ansatz 5: 0,1µg/ml ZnO-NP.....	101
8.9.6	Ansatz 1: 10µg/ml ZnO-NP.....	102
8.9.7	Ansatz 2: 10µg/ml ZnO-NP.....	103
8.9.8	Ansatz 3: 10µg/ml ZnO-NP.....	104
8.9.9	Ansatz 4: 10µg/ml ZnO-NP.....	105
8.9.10	Ansatz 5: 10µg/ml ZnO-NP.....	106
8.9.11	Ansatz 1: 100µg/ml ZnO-NP.....	107
8.9.12	Ansatz 2: 100µg/ml ZnO-NP.....	108
8.9.13	Ansatz 3: 100µg/ml ZnO-NP.....	109
8.9.14	Ansatz 4: 100µg/ml ZnO-NP.....	110
8.9.15	Ansatz 5: 100µg/ml ZnO-NP.....	111
	Danksagung.....	112
	Lebenslauf.....	113

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
ALT	-	Alanin-Aminotransferase
APAF1	-	<i>apoptotic peptidase activator factor 1</i>
AST	-	Aspartat-Aminotransferase
ATP	-	Adenosintriphosphat
BAK	-	<i>Bcl-2 homologous antagonist/ killer</i>
BAX	-	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	-	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSI	-	Bundesamt für Sicherheit und Informationstechnik
Bzw.	-	Beziehungsweise
Ca ²⁺	-	Calcium
CAM	-	Chorioallantoismembran
CT	-	Computertomographie
dATP	-	Desoxyadenosintriphosphat
DIN	-	Deutsches Institut für Normung
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DSB	-	Doppelstrangbrüche
EBV	-	Eppstein-Barr-Virus
EGF	-	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EPR	-	<i>Enhanced Permeation Retention</i>
Fas	-	Todesrezeptor Fas
FBS	-	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Fe	-	Eisen
FGF	-	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
G2-Phase	-	Gap-2-Phase
GSH	-	Glutathion
HIF-1	-	Hypoxie-induzierter Faktor 1/ <i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>
HNSCC	-	<i>Head and Neck squamous cell cancer</i>
HPV	-	Humane Papillomaviren
IACUC	-	<i>American Association for Laboratory Animal Science</i>
IL-1	-	Interleukin-1
IL-12	-	Interleukin-12

Abkürzungsverzeichnis

INF- γ	-	Interferon- γ
ISO	-	<i>International Organization of Standardization</i>
LDH	-	Laktatdehydrogenase
M-Phase	-	Mitose-Phase
MDA	-	Malondialdehyd
MAP-Kinase	-	<i>Mitogen-activated Protein-Kinase</i>
MRT	-	Magnetresonanztomographie
MVC	-	Multivesikuläre Körperchen
NF- κ B	-	<i>Nuclear Factor κB</i>
NiO	-	Nickel(II)-oxid
NO	-	Stickstoffmonoxid
NP	-	Nanopartikel
Nrf 2/ NFE2L2	-	<i>Nuclear factor (erythroid- derived 2)-like 2</i>
\bullet O ₂ ⁻	-	Hyperoxid-Anion
OECD	-	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
ONOO ⁻	-	Peroxynitrit
p53	-	Protein 53
PEG	-	Polyethylenglycol
PBS	-	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pRB	-	Retinoblastom-Protein
RCT	-	Radiochemotherapie
RES	-	Retikuloendotheliales System
RNS	-	Reaktive Stickstoffspezies / <i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	-	Reaktive Sauerstoffspezies / <i>Reactive oxygen species</i>
SiO ₂	-	Siliciumdioxid
S-Phase	-	Synthesephase
STIKO	-	Ständige Impfkommision
Tab.	-	Tabelle
TEOS	-	Tetraethylorthosilicate
TGF	-	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF(-a)	-	Tumornekrosefaktor / <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR1	-	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TRAIL-R1	-	<i>TNF-related-apoptosis-inducing-ligand receptor 1</i>
UV	-	Ultraviolett
VEGF	-	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Abkürzungsverzeichnis

Zn ²⁺	-	Zink
ZnO	-	Zinkoxid
ZnO-NP	-	Zinkoxid-Nanopartikel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2. 1	modifizierte schematische Darstellung der verschiedenen Endo- und Exozytosemechanismen von Nanopartikeln nach Oh and Park (2014)	14
Abb. 2. 2	modifizierte schematische Darstellung des 3-Stufen-Modells nach Nel et al. (2006).....	18
Abb. 2. 3	Signalwege der Apoptose modifiziert nach Brenner et al. (2009)	21
Abb. 2. 4	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	26
Abb. 2. 5	Aufbau der CAM modifiziert nach Valdes et al. (2002).....	27
Abb. 3. 1	Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl	33
Abb. 3. 2	Skizziertes Behandlungsschema des Kolonie-Assays	34
Abb. 3. 3	Beispielhafte Auswertung mittels Colcount-Scanner	38
Abb. 3. 4	Formel zur Berechnung der Surviving Fraction	38
Abb. 3. 5	Blick in ovo auf die Blutgefäße der CAM und den Hühnerembryo an Tag 10	40
Abb. 3. 6	Blick in ovo auf die Blutgefäße der CAM und den Tumor an Tag 12	41
Abb. 3. 7	Formel der Linearen Regression	42
Abb. 4. 1	Formel nach Cohen zur Berechnung der Effektstärke	45
Abb. 4. 2	Boxplots zur Illustration des Einflussfaktors Bestrahlung auf die Überlebensfraktion der Zellen, dargestellt als Surviving Fraction	45
Abb. 4. 3	Boxplots zur Illustration des Einflussfaktors Konzentration auf die Überlebensfraktion der Zellen, dargestellt als Surviving Fraction	46
Abb. 4. 4	Boxplots zur Illustration des Einflussfaktors Inkubationszeit mit ZnO-Nanopartikeln auf die Überlebensfraktion der Zellen, dargestellt als Surviving Fraction	47
Abb. 4. 5	Überlebensfraktion (Surviving Fraction) der A 549-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 0,1µg/ml (links) und 100µg/ml (rechts) ZnO-NP aufgetragen gegen die Bestrahlungsdosis.	48
Abb. 4. 6	Einfluss der Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel auf die Mittelwerte der Überlebensfraktion (Surviving Fraction) ohne anschließende Bestrahlung.....	49
Abb. 4. 7	Liniendiagramme zur Illustration der Überlebensfraktion (Surviving Fraction) im direkten Vergleich von Kontrolle ohne ZnO-NP und mit ZnO-NP für die Behandlungsreihe ohne anschließende Bestrahlung.....	50
Abb. 4. 8	Einfluss der Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel auf die Mittelwerte der Überlebensfraktion (Surviving Fraction) mit anschließender Bestrahlung von 2 Gy	51
Abb. 4. 9	Liniendiagramme zur Illustration der Überlebensfraktion (Surviving Fraction) im direkten Vergleich von Kontrolle ohne ZnO-NP und mit ZnO-NP für die Behandlungsreihe mit anschließender Bestrahlung von 2 Gy	52
Abb. 4. 10	Einfluss der Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel auf die Mittelwerte der Überlebensfraktion (Surviving Fraction) mit anschließender Bestrahlung von 4 Gy	53
Abb. 4. 11	Liniendiagramme zur Illustration der Überlebensfraktion (Surviving Fraction) im direkten Vergleich von Kontrolle ohne ZnO-NP und mit ZnO-NP für die Behandlungsreihe mit anschließender Bestrahlung von 4 Gy	54

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4. 12	Einfluss der Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel auf die Mittelwerte der Überlebensfraktion (Surviving Fraction) bei anschließender Bestrahlung mit 8 Gy	55
Abb. 4. 13	Liniendiagramme zur Illustration der Überlebensfraktion (Surviving Fraction) im direkten Vergleich von Kontrolle ohne ZnO-NP und mit ZnO-NP für die Behandlungsreihe mit anschließender Bestrahlung von 8 Gy	56
Abb. 4. 14	Morphologie der Zellen nach einstündiger Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln ohne anschließende Bestrahlung (0 Gy)	59
Abb. 4. 15	Morphologie der Zellen nach einstündiger Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln und anschließender fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy.	60
Abb. 4. 16	Morphologie der Zellen nach einstündiger Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln und anschließender fraktionierter Bestrahlung mit 4 Gy.	61
Abb. 4. 17	CAM-Präparate in H.E.-Färbung	63
Abb. 5. 1	modifizierte schematische Darstellung nach Halliwell (2006): zelluläre Antwort auf oxidativen Stress	67

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tab. 3. 1	Auflistung der Laborgeräte.....	29
Tab. 3. 2	Auflistung der Verbrauchsmaterialien.....	29
Tab. 3. 3	Auflistung der Zellkulturmedien, Zusätze und Puffer.....	30
Tab. 3. 4	Auflistung der Chemikalien.....	30
Tab. 3. 5	Auflistung der Reagenzien der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	31
Tab. 3. 6	Auflistung der Software.....	31
Tab. 3. 7	Zielzellzahl der 32 zu bestrahlenden Falcons.....	36
Tab. 3. 8	Ausgesäte Zellzahl der 64 zu kultivierenden Mini-Zellkulturflaschen.....	36
Tab. 4. 1	Ergebnisse der Multiplen Linearen Regression.....	44
Tab. 4. 2	Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf die Konzentration und die Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikeln.....	49
Tab. 4. 3	Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf die Konzentration und die Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikeln.....	52
Tab. 4. 4	Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf die Konzentration und die Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikeln.....	54
Tab. 4. 5	Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf die Konzentration und die Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikeln.....	56
Tab. 8. 1	Modellzusammenfassung.....	91
Tab. 8. 2	Regressionskoeffizienten.....	91
Tab. 8. 3	Anova.....	91
Tab. 8. 4	Explorative Datenanalyse der Einflussgröße Bestrahlungsdosis [Gy].....	92
Tab. 8. 5	Explorative Datenanalyse der Einflussgröße ZnO-Nanopartikel-Konzentration [µg/ml].....	93
Tab. 8. 6	Explorative Datenanalyse der Einflussgröße ZnO-Nanopartikel-Inkubationsdauer [h].....	94
Tab. 8. 7	Nicht parametrische Testung der Einflussgröße Bestrahlungsdosis.....	95
Tab. 8. 8	Nicht parametrische Testung der Einflussgröße Konzentration.....	95
Tab. 8. 9	Nicht parametrische Testung der Einflussgröße Inkubationsdauer.....	95
Tab. 8. 10	Mittelwerte und Standardabweichung der Surviving Fraction.....	96
Tab. 8. 11	Excel-Tabelle: Auswertung 1. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel.....	97
Tab. 8. 12	Excel-Tabelle: Auswertung 2. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel.....	98
Tab. 8. 13	Excel-Tabelle: Auswertung 3. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel.....	99
Tab. 8. 14	Excel-Tabelle: Auswertung 4. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel.....	100
Tab. 8. 15	Excel-Tabelle: Auswertung 5. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel.....	101

Tabellenverzeichnis

Tab. 8. 16	Excel-Tabelle: Auswertung 1. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel.	102
Tab. 8. 17	Excel-Tabelle: Auswertung 2. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel.	103
Tab. 8. 18	Excel-Tabelle: Auswertung 3. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel.	104
Tab. 8. 19	Excel-Tabelle: Auswertung 4. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel.	105
Tab. 8. 20	Excel-Tabelle: Auswertung 5. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel.	106
Tab. 8. 21	Excel-Tabelle: Auswertung 1. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel.	107
Tab. 8. 22	Excel-Tabelle: Auswertung 2. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel.	108
Tab. 8. 23	Excel-Tabelle: Auswertung 3. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel.	109
Tab. 8. 24	Excel-Tabelle: Auswertung 4. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel.	110
Tab. 8. 25	Excel-Tabelle: Auswertung 5. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel.	111

1. Einleitung

Kopf-Hals-Tumoren sind weltweit die sechsthäufigste Krebserkrankung mit einer Inzidenz von mehr als 550.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Parkin et al., 2005, Jemal et al., 2011). Den größten Anteil an bösartigen Kopf-Hals-Tumoren bilden Plattenepithelkarzinome. Die aktuellen Therapiemöglichkeiten bieten oftmals keine ausreichende Heilungschance. Die Tumoren werden häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und die bisher angewandten therapeutischen Optionen wie Chemotherapeutika und Bestrahlung sind aufgrund eigener Toxizität und unerwünschter Nebenwirkungen, sowie möglicher Folgeerkrankungen in der Anwendung limitiert. Zudem erschweren Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegenüber der Bestrahlung die Therapie zusätzlich. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig neue Therapieansätze zu erforschen und zu etablieren.

In den vergangenen Jahren ist dabei die Verwendung von Nanopartikeln in der Krebstherapie in den Fokus von Medizin und Forschung gerückt. Der Verwendung von Metalloxid-Nanopartikeln kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu, da sie aufgrund ihrer geringen Größe und physikalischen und chemischen Oberflächeneigenschaften vielseitig einsetzbare Trägerstoffe für die gezielte Applikation von Medikamenten darstellen und somit unerwünschte Nebeneffekte bei der Therapie verringern können (Rasmussen et al., 2010). In bisherigen *in vitro* Studien konnte bereits gezeigt werden, dass gewisse Metalloxid-Nanopartikel, wie die in meiner Arbeit vorrangig untersuchten Zinkoxid-Nanopartikel, auch eigenes toxisches Potential besitzen und sogar bevorzugt Krebszellen schädigen, während gesundes Gewebe größtenteils verschont wird (Rasmussen et al., 2010, Hanley et al., 2008). Dabei scheinen verschiedene Toxizitätsmechanismen der Nanopartikel eine entscheidende Rolle zu spielen. Von früheren Arbeitsgruppen wurden diese Toxizitätsmechanismen bereits untersucht (Heim et al., 2015, Hanley et al., 2009).

Zum Einen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der *in vitro* Untersuchung der kombinierten Toxizität von Zinkoxid-Nanopartikeln und Bestrahlung auf das Zellüberleben epithelialer Tumorzellen der Linie A 549 im Hinblick auf eine mögliche Effizienzsteigerung der bisherigen Strahlentherapie durch die additive, therapeutische Verwendung von Zinkoxid-Nanopartikeln. Hierbei soll besonders der Einfluss der Nanopartikel-Konzentration, der Nanopartikel-Inkubationsdauer und der angewandten Strahlendosis auf die Tumorzellschädigung bzw. das Tumorzellüberleben untersucht und ausgewertet werden. Dazu wurde mittels Kolonie-Assay ein Behandlungsschema

etabliert, das die vorherige Nanopartikel-Inkubation und eine anschließende Bestrahlung umfasst. Zehn Tage nach der abgeschlossenen Behandlung wurde die Überlebensfraktion (engl. *Surviving Fraction*) als Maß für das Zellüberleben untersucht. Zum Anderen beschäftigt sich diese Arbeit mit der Möglichkeit der Übertragung der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse auf das Chorioallantoismembran-Modell, vor dem Hintergrund der geplanten Injektion von Nanopartikeln in vaskularisiertes Tumorgewebe *in vivo* und der anschließenden Bestrahlung der Tumoren und der möglichen Visualisierung unter dem Mikroskop. Mittels histologischer Aufarbeitung und verschiedener Färbungen sollen die Angiogenese der implantierten Tumoren, sowie die Tumoren selbst, untersucht werden. Die dieser *in vivo* Untersuchung zugrundeliegende Konzeption basiert auf der verstärkten Tumor-assoziierten Angiogenese und der erhöhten EGF-Rezeptor-Expression. Das CAM-Modell eignet sich hier besonders gut, da es sich um ein besonders gut vaskularisiertes, transparentes und immundefizientes System handelt, welches die Implantation von Tumorgewebe toleriert (Kunzi-Rapp et al., 2001).

Im Detail sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Wie wirken sich die Einflussgrößen Nanopartikel-Inkubationsdauer, Nanopartikel-Konzentration und Bestrahlungsdosis auf das Zellüberleben epithelialer Tumorzellen aus?
- Kann die kombinierte Anwendung von Zinkoxid-Nanopartikeln und Bestrahlung die therapeutische Effizienz der Strahlentherapie gegenüber der alleinigen Strahlentherapie steigern?
- Lassen sich nach Einwirkung von ZnO-Nanopartikeln und fraktionierter Bestrahlung morphologische Veränderungen der A549-Zellen beobachten?
- Lässt sich der Versuchsaufbau in der komplexeren *in vivo* Situation im Chorioallantoismembran-Modell reproduzieren? Lassen sich dazu auf der CAM solide, epitheliale Tumore (A549) implantieren?

Ziel der Arbeit war die Evaluierung einer additiven Verwendung von ZnO-Nanopartikeln zur Verbesserung der bestehenden Strahlentherapie *in vitro* sowie die Untersuchung der Übertragungsmöglichkeit auf das Chorioallantoismembran-Modell, als eine mögliche *in vivo* Testung. Im weiteren Sinne ist es das Ziel die Therapieoptionen bei Kopf-Hals-Tumoren zu verbessern.

2. Literaturdiskussion

2.1 Kopf-Hals-Tumoren

2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Im Jahr 2015 stellten Kopf-Hals-Malignome in Deutschland die vierthäufigste Krebserkrankung bei Männern (den nicht melanotischen Hautkrebs ausgenommen) und die 15-häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar (Bayer et al., 2015). Die weltweite Inzidenz beträgt mehr als 550.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Jemal et al., 2011). Die Entität der Kopf-Hals-Tumoren umfasst eine Gruppe von bösartigen Tumoren der Mundhöhle, des Oro- und Hypopharynx und des Larynx, im weiteren Sinne auch maligne Speicheldrüsen-, Nasopharynx- und Nasennebenhöhle-tumoren (Bayer et al., 2015). Es ist bekannt, dass die Ursachen multifaktoriell bedingt sind. Rauchen und Alkoholkonsum stellen die Hauptrisikofaktoren von Kopf-Hals-Tumoren, besonders des Plattenepithelkarzinoms, dar. Die Kombination aus Tabak- und Alkoholkonsum scheint einen synergistischen Effekt zu haben und das Risiko erheblich zu steigern (Blot et al., 1988). Aber auch das Epstein-Barr-Virus (EBV) und Humane Papillomaviren (HPV), beides Onkoviren, werden als Risikofaktoren speziell für Nasopharynx- und Oropharynxkarzinome betrachtet (Pezzuto et al., 2015). Besonders HPV spielt als Risikofaktor eine inzwischen immer größere Rolle. Es sind > 80 HPV Subtypen bekannt, aber vor allem die Serotypen 16 und 18 sind bei der Entstehung maligner Tumoren von Bedeutung (Munger and Howley, 2002). Aus dem Fachbereich der gynäkologischen Onkologie ist die Assoziation von HPV-Infektionen mit der Entstehung von Zervixkarzinomen bereits bekannt.

Histologisch bilden Plattenepithelkarzinome, im Englischen *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC), mit über 90% den größten Anteil (Pai and Westra, 2009). Während epidemiologische Studien aber in den vergangenen Jahren einen Rückgang der Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms in westlichen Ländern aufzeigen konnten, vermutlich aufgrund des sinkenden Tabakkonsums, nimmt die Inzidenz von HPV-assoziierten Oropharynx-tumoren weiter zu (Sturgis and Cinciripini, 2007, Bayer et al., 2015). Im Gegensatz zu den HPV-negativen Tumoren, welche vor allem eine ältere Kohorte betreffen, finden sich HPV-positive Tumoren auch in jüngeren Patienten (Marur et al., 2010). Betrachtet man die verschiedenen Entitäten, so ist die HPV-

Inzidenz bei Oropharynxlokalisationen, insbesondere bei Tonsillen und Zungengrund, am höchsten verglichen mit der anderer Lokalisationen wie Mundhöhle oder Larynx (Argiris et al., 2008, Hobbs et al., 2006). Studien konnten allerdings auch zeigen, dass HPV-assoziierte Tumoren selbst bei Patienten mit den „traditionellen“ Risikofaktoren, sprich mit positiver Tabak- und Alkoholanamnese, entstehen (Marur et al., 2010).

2.1.2 Pathogenese

Im Hinblick auf die Pathogenese unterscheiden sich HPV-negative von HPV-positiven Tumoren. Für den karzinogenen Effekt der HPV-Hochrisikotypen 16 und 18 sind die Onkoproteine E6 und E7 verantwortlich, welche die Tumorsuppressorgene p53 und pRB inhibieren (Munger and Howley, 2002).

Dahingegen findet man bei HPV-negativen Kopf-/ Halstumoren eine Fülle genetischer Veränderungen und erhöhter Proteinexpressionen (Klein and Grandis, 2010). Eine p53-Mutation ist in über 50% der HNSCC nachweisbar und die häufigste Mutation bei Kopf-/Halstumoren (Brachman et al., 1992). Eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens (p53) führt zu einer unkontrollierten Proliferation ungeachtet von DNA-Schäden (Vogelstein et al., 2000).

Außerdem liegt bei 90% der HNSCC die Telomerase in reaktiver Form vor und stabilisiert die Telomere, schützt vor dem Zelltod und bewahrt so die genetischen Veränderungen der Tumorzellen (Argiris et al., 2008, McCaul et al., 2002).

2.1.3 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Ist die Diagnose gestellt, bieten sich nach aktuellen Leitlinien drei verschiedene Therapiemodalitäten: Operation, Chemotherapie und Strahlentherapie. Je nach Lage des Tumors, seiner TNM-Klassifikation, besonders im Hinblick auf N- (Nodus) und M- (Metastase) Status, sowie den notwendigen Resektionsgrenzen, dem Alter des Patienten, dem allgemeinem Gesundheitszustand und eventuellen Komorbiditäten wird interdisziplinär eine Therapieentscheidung getroffen (Argiris et al., 2008).

Wenn der Primärtumor bei Diagnosestellung begrenzt ist, stellt die chirurgische Resektion mit ausreichendem Sicherheitsabstand den Goldstandard dar. Durch die enge topografische Beziehung zu vielen lebenswichtigen Strukturen im Kopf-Hals-Bereich gestaltet sich eine Operation aber oftmals schwierig. Kann der geforderte Sicherheitsabstand (5 mm) zum gesunden Gewebe bei der Resektion nicht

eingehalten werden, muss bei kurativer Therapie anschließend eine adjuvante Radiochemotherapie erfolgen (Peters et al., 1993, Argiris et al., 2008). Dies gilt ebenfalls bei kapselüberschreitendem Wachstum (Argiris et al., 2008). Trotz erhöhter Toxizität hat die simultane Anwendung von Radiatio und Chemotherapie in Studien ein verbessertes Überleben zeigen können (Adelstein et al., 2003). Stellt sich ein Tumor hingegen als nicht primär operabel und lokal fortgeschritten heraus, ist die kombinierte Radiochemotherapie der Behandlungsstandard (Argiris et al., 2008, Adelstein et al., 2003). Bei der Auswahl der Substanzen unterscheiden sich die Schemata. Sowohl Platinverbindungen (Cisplatin, Carboplatin), als auch Antimetabolite (5-Fluorouracil, Methotrexat) oder Taxane (Docetaxel, Paclitaxel) zeigen in der alleinigen Anwendung eine gute Ansprechrate (Colevas, 2006). Das weltweit häufigste Regime der verwendeten Chemotherapeutika besteht aus Cisplatin allein oder in Kombination mit 5-Fluorouracil (Argiris et al., 2008).

Es ist bekannt, dass nahezu 90% aller HNSCC den EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*) exprimieren (Fulcher et al., 2018, Grandis and Twardy, 1993) und die erhöhte Expression mit einem verminderten Überleben einhergeht (Rubin Grandis et al., 1998). Diese Tatsache bietet einen weiteren therapeutischen Angriffspunkt und so hat sich Cetuximab als monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor in der Therapie etabliert (Karamouzis et al., 2007). In Kombination mit Bestrahlung zeigt sich in der Studie von Bonner et al. (2006) ein erhöhtes Gesamtüberleben der Patienten, verglichen mit alleiniger Radiatio ohne Cetuximab (Bonner et al., 2006). Neben der bereits genannten Radiochemotherapie mit Cisplatin stellt die Kombination aus Radiatio und Cetuximab eine Alternative für Patienten dar, die eine Chemotherapie aufgrund der Nebenwirkungen wie Knochenmarkssuppression oder Mukositis nicht tolerieren können (Argiris et al., 2008).

Mindestens die Hälfte aller Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Befund eines HNSCC entwickeln innerhalb der ersten 2 Jahre nach Behandlung ein Rezidiv (Argiris et al., 2008). Auch dann stellt sich zunächst die Frage der Operabilität und der erneuten Bestrahlung. Insgesamt ist die Chemotherapie aber auch in einer Rezidivsituation der Therapiestandard (Argiris et al., 2008) und Methotrexat, Bleomycin, Carboplatin und Fluorouracil stellen wirksame Substanzen bei Rezidiv oder Fernmetastasierung dar (Colevas, 2006). Das allgemein akzeptierte Referenz-Schema basiert auch auf einer Kombination von Cisplatin und 5-Fluorouracil (Argiris et al., 2008). Allerdings wurde bei der in Europa durchgeführten EXTREME-Studie die zusätzliche Gabe von Cetuximab zur bestehenden Therapie mit Cisplatin und 5-

Fluorouracil bei rezidivierten oder metastasierten HNSCC untersucht und positiv bewertet (Vermorken et al., 2008, Keilholz, 07/2012). Laut Studienergebnissen verlängert die Kombination der drei Wirkstoffe als Erstlinientherapie bei Rezidiv oder metastasiertem HNSCC das Gesamtüberleben von 7,4 Monate auf 10,1 Monate (Vermorken et al., 2008). Fernmetastasen treten am häufigsten in der Lunge auf, gefolgt von mediastinalen Lymphknoten, Leber und Knochen (Argiris et al., 2008). Viele Studien zu weiteren Behandlungsmöglichkeiten beschäftigen sich mit EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren, Angionese-Inhibitoren und anderen molekular zielgerichteten Wirkstoffen (Argiris et al., 2008).

2.1.4 Prognose

Laut einer Studie zur Veränderung der Inzidenz und Mortalität von Kopf-Hals-Malignomen starben im Beobachtungszeitraum von 2000 bis 2009 allein in Rheinland-Pfalz insgesamt 2527 Männer und 650 Frauen an Malignomen des Kopf-Hals-Bereiches (Bayer et al., 2015). Viele Patienten werden aufgrund unspezifischer und spät einsetzender Symptomatik erst in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium vorstellig und häufig sind dann bereits regionale Lymphknoten betroffen (Argiris et al., 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Stadien beträgt circa 60% (Argiris et al., 2008, Ries LAG et al., 2006).

HPV-assoziierte Kopf-Hals-Tumoren sprechen besonders gut auf Bestrahlung und Chemotherapie an und haben daher eine günstigere Prognose (Licitra et al., 2006). Deshalb ist die Bestimmung des HPV-Status ein wichtiger prädiktiver Marker in der Therapie (Argiris et al., 2008). In der Gynäkologie werden jungen Mädchen Schutzimpfungen gegen HPV zur Prävention von Zervixkarzinomen bereits empfohlen. Seit 2018 empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) die HPV-Impfung nun auch für Jungen (Robert Koch-Institut, 2018).

Patienten mit HNSCC entwickeln häufig akute und späte Komplikationen aufgrund ihrer Erkrankung und der aggressiven Behandlung. Zu den akuten Komplikationen zählen unter anderem Mukositis, Dysphagie, Geschmacksverlust oder Dermatitis (Trotti et al., 2003, Rosenthal et al., 2006, Argiris et al., 2008). Späte Probleme ergeben sich beispielsweise durch das Auftreten von Osteonekrosen, subkutaner Fibrose, Karies, Schilddrüsendysfunktion oder Stenosen (Argiris et al., 2008). Aufgrund der hohen Toxizität der etablierten Therapieformen muss bei multimorbiden

Patienten oftmals vom Therapiestandard abgewichen werden, was das Outcome der Patienten zusätzlich verschlechtert.

2.2 Strahlentherapie

2.2.1 Grundlagen

Neben der Möglichkeit der Operation und Chemotherapie stellt die Strahlentherapie den dritten entscheidenden Ansatz in der Krebstherapie dar. Man unterscheidet die neoadjuvante Strahlentherapie zum (präoperativen) Downstaging von Tumoren von der intra- oder postoperativen adjuvanten Strahlentherapie. In der Therapie gibt es zudem Konzepte der alleinigen Strahlentherapie oder der Kombination aus Radiotherapie und Chemotherapie (Radiochemotherapie, RCT).

Die zugrunde liegende Wirkweise der Strahlentherapie beruht auf dem Einsatz ionisierender Strahlung und der dadurch bedingten Induktion von DNA-Schäden und letztlich Zellzyklusarrest oder Zelluntergang durch Apoptose oder Nekrose (Pawlik and Keyomarsi, 2004). Die internationale Einheit der absorbierten Strahlung (Strahlendosis) ist Gray (Gy), definiert als $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule/ Kilogramm}$ (Kirthi Koushik et al., 2013, Reisz et al., 2014). Die Schädigung der DNA durch Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Crosslinks oder Basenschäden kann direkt durch die ionisierende Strahlung oder indirekt durch die Induktion reaktiver oxidativer Spezies (ROS) entstehen (Kirthi Koushik et al., 2013, Tepper, 2016). Dabei schädigt vor allem das Hydroxyl-Radikal ($\text{HO}\cdot$) die DNA (Reisz et al., 2014). DNA-Doppelstrangbrüche stellen die schwerwiegendste Form der DNA-Schädigung dar. Die ROS-Produktion wird durch endogene Mechanismen noch weiter verstärkt. Studien haben gezeigt, dass ionisierende Strahlung die mitochondrien-abhängige Generierung von ROS in Tumorzellen der Linie A549 verstärkt, das Membranpotential der Mitochondrien erhöht und die ATP-Produktion fördert (Yamamori et al., 2012). Die ROS-Entstehung bedingt zudem die Induktion reaktiver Stickstoffspezies (RNS, *reactive nitrogen species*). Durch die Reaktion des Hyperoxid-Anions ($\cdot\text{O}_2^-$) mit Stickstoffmonoxid (NO) entsteht Peroxynitrit (ONOO^-), eine ebenfalls hoch reaktive Verbindung, die zu den reaktiven Stickstoffspezies zählt (Reisz et al., 2014).

In der Klinik wird vor allem das Prinzip der fraktionierten Bestrahlung angewandt. Dabei wird die Gesamtstrahlendosis in kleinere tägliche Einheiten bzw. „Fraktionen“ eingeteilt, in der Regel in Dosen zwischen 1,8 - 2,2 Gy (Kirthi Koushik et al., 2013).

Die Reparaturmechanismen gesunder Zellen sind effizienter als die der Tumorzellen und sie können dementsprechend schneller regenerieren. Durch einen Abstand zwischen den Bestrahlungseinheiten von minimal 6 Stunden kann das gesunde Gewebe also die entstandenen Schäden zwischen den Fraktionen im Gegensatz zu den Tumorzellen reparieren (Kirthi Koushik et al., 2013). Auf diese Weise können Nebenwirkungen im gesunden Gewebe bei gleichzeitig höherer Gesamtstrahlendosis in der Therapie reduziert werden. Ein weiterer Vorteil der fraktionierten Bestrahlung besteht in der Zeitspanne der Therapie. So ist es möglich, dass Tumorzellen, die sich anfangs in einer strahlenresistenten Zyklusphase befanden, in eine strahlensensitive Phase übergehen können (Kirthi Koushik et al., 2013).

2.2.2 Strahlensensibilität

Die Ergebnisse einer Strahlentherapie sind nicht bei allen Patienten gleich. Bei einigen Patienten kann eine erfolgreiche Rückbildung des Tumors erreicht werden, bei anderen nicht. Als mögliche Ursachen für diese Unterschiede in der Strahlensensibilität werden verschiedene Faktoren diskutiert. Der bekannteste Mechanismus ist der sogenannte Sauerstoffeffekt (*oxygen effect*). Nach diesem Effekt wirkt die Anwesenheit von Sauerstoff im Tumor als Strahlensensitizer. Das heißt, wenn viel Sauerstoff vorhanden ist, ist die Strahlensensibilität erhöht. Hypoxie hingegen führt zu einer erhöhten Strahlenresistenz der Tumoren. Sauerstoff erhöht die Strahlensensibilität durch die Generierung von Peroxiden (zytotoxischer Radikale) in der bereits durch ionisierende Strahlen geschädigten DNA (Tepper, 2016). In Abwesenheit von Sauerstoff kann die DNA mittels endogener Reduktionsmittel, wie beispielsweise durch den Radikalfänger Glutathion (GSH), regenerieren (Tepper, 2016). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Strahlenresistenz epithelialer Tumorzellen durch eine vermehrte Expression des EGF-Rezeptors (Liang et al., 2003), sowie eine erhöhte VEGF-Expression bedingt ist (Brieger et al., 2007). Besonders für Kopf-Hals-Tumoren ist eine vermehrte Expression von EGFR bekannt (Fulcher et al., 2018, Grandis and Tweardy, 1993). Durch die Etablierung der Kombinationstherapie aus Bestrahlung und dem EGFR-Antikörper Cetuximab konnte die Strahlenempfindlichkeit der HNSCC und das Gesamtüberleben der Patienten gesteigert werden (Huang et al., 1999, Bonner et al., 2006). Darüber hinaus scheinen auch die Phasen des Zellzyklus einen Einfluss auf die Strahlensensibilität der Tumorzellen zu haben. Am effektivsten ist die Strahlentherapie in der Gap-2-Phase

(G2-Phase) und der Mitose-Phase (M-Phase), während die Synthesephase (S-Phase) als strahlenresistenteste Phase beschrieben wird (Pawlik and Keyomarsi, 2004, Kirthi Koushik et al., 2013).

In der Therapie der Kopf-Hals-Tumore beeinflusst der HPV-Status ebenfalls den Bestrahlungserfolg. Durch HPV induzierte Tumore sprechen besonders gut auf Bestrahlung an (Licitra et al., 2006).

2.3 Zink

Unter physiologischen Bedingungen liegt Zink in der Zelle in hohen Konzentrationen (ca. 99%) gebunden an verschiedene Proteine vor (Georg Löffler, 2006). Die Konzentration freier Zink-Ionen dagegen ist gering und streng reguliert (Rasmussen et al., 2010, Shankar and Prasad, 1998). Im Plasma wird Zink an Albumin gebunden (Georg Löffler, 2006). Der Plasmazinkspiegel (15-20µmol/l) unterliegt einer zirkadianen Rhythmik und wird durch Hormone und Zytokine reguliert. Der Bedarf eines Erwachsenen beträgt 10-15mg pro Tag. Bei der Nahrungszufuhr stellen Fisch und rotes Fleisch hohe Zink-Quellen dar. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über den Stuhl (Georg Löffler, 2006).

Zink ist als wichtiges Spurenelement an vielen Vorgängen in unserem Körper beteiligt. Es ist Bestandteil bzw. Cofaktor von über 300 Enzymen, wie zum Beispiel der Carboanhydrase, der Alkalischen Phosphatase oder der Metalloproteinasen (Georg Löffler, 2006). Zink besitzt hier sowohl eine strukturunterstützende als auch eine katalytische Funktion (Georg Löffler, 2006). Als Bestandteil klinisch wichtiger Enzyme ist Zink an einer Vielzahl systemischer Regulationen beteiligt, wie beispielsweise der Blutdruck-Regulation oder der Knochenmineralisierung (Kambe, 2011, Turner and Hooper, 2002, Zurutuza et al., 1999). Des Weiteren wirkt es in biologischen Membranen stabilisierend und ist Bestandteil genregulatorischer Transkriptionsfaktoren (Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren) (Georg Löffler, 2006). Außerdem spielt Zink eine entscheidende Rolle für das Immunsystem, angefangen bei der Hautbarriere bis hin zur Genregulation von Lymphozyten (Shankar and Prasad, 1998). In den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse ist es an der Speicherform des Insulins beteiligt, welches als Zink-Insulin-Komplex vorliegt (Georg Löffler, 2006). Zudem ist Zink an der Androgensynthese beteiligt. Ein erworbener Zinkmangel kann einerseits akut durch Infektionen, als Teil der Akutphaseantwort, oder Stresssituationen ausgelöst werden oder andererseits chronisch durch einen

Mangelernährungszustand, eine Leberzirrhose oder ein Malabsorptionssyndrom und führt je nach Ausprägungsgrad zu Wundheilungsstörungen, Infektanfälligkeit, Diarrhoe und/ oder Alopezie (Georg Löffler, 2006).

2.4 Nanotechnologie

2.4.1 Vorkommen und Verwendung von Nanopartikeln

Der Entwicklung von Nanotechnologie kommt eine immer größere Bedeutung zu. In Deutschland ist man vor allem im Bereich der Nanomaterialien, Nanobeschichtungen, Nanoanalytik und Nanobiotechnologie aktiv (Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), 2013). Die Hauptanwendungsfelder sind die Chemie, der Maschinen- und Gerätebau, der Dienstleistungssektor und die Gesundheits- und Pharmaindustrie (Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), 2013). In unserem Alltag begegnen wir Nanopartikeln beispielsweise gehäuft in Kosmetik- und Hygieneprodukten. Aufgrund ihrer transparenten Eigenschaft und der dadurch erhöhten Compliance werden ZnO-Nanopartikel in einem Größenbereich von 20-30nm beispielsweise vielfach zur UV-Absorption in Sonnencremes oder anderen Kosmetikprodukten verwendet. ZnO ist sehr effizient, da es sowohl UVA- als auch UVB-Strahlen absorbiert und die Haut dadurch vor möglichen UV-Schäden und deren Folgeerkrankungen schützt (Zvyagin et al., 2008). Durch die spezifischen antibakteriellen Eigenschaften finden Zinkoxid-Nanopartikel ebenfalls Anwendung in der Wundbehandlung als wirksame Inhaltstoffe medizinischer Salben zur topischen Applikation (DeLouise, 2012).

In der Nanotechnologie wird generell zwischen Nanoobjekten und nanostrukturierten Materialien unterschieden. Während vor einigen Jahren der Begriff „Nano“ allgemein genutzt wurde, um Partikel im Mikrometer-Bereich zu beschreiben, definieren verschiedene nationale und internationale Organisationen (ISO, OECD, BSI, DIN) Nanopartikel inzwischen als Partikel mit einer Größe zwischen 1-100nm in allen drei Dimensionen (Krug and Wick, 2011). Durch die Reduzierung der Partikelgröße in den Nanobereich entstehen neue Eigenschaften der Materialien im Vergleich zu ihrem ursprünglichen Massengut. Es besteht ein inverses Verhältnis zwischen der Partikelgröße und der Anzahl an Oberflächenmolekülen (Nel et al., 2006). Ein 30nm großer Partikel trägt insgesamt nur 5% seiner Atome an der Oberfläche, während ein 3nm großer Partikel bereits die Hälfte (50%) seiner Atome an der Oberfläche trägt

(Lanone and Boczkowski, 2006). Dies bedeutet, dass auch die Anzahl reaktiver Gruppen auf der Oberfläche der Nanopartikel erhöht ist, was wiederum zu einer erhöhten Oberflächenreaktivität und Interaktionsfähigkeit mit anderen diagnostischen und therapeutischen Agenzien führt (Nel et al., 2006) und Nanopartikel in ihrer Anwendung so interessant macht. Die große Anzahl der Atome an der Partikeloberfläche maximiert außerdem ihre Fähigkeit, mit therapeutischen Wirkstoffen beladen zu werden und diese Wirkstoffe gezielt an Zellen und Gewebe abzugeben (Rasmussen et al., 2010).

2.4.2 Potenzielle Eintrittspforten in den menschlichen Organismus

Die vermehrte Anwendung und Produktion von Nanomaterialien durch Industrie und Forschung bedingen eine gesteigerte Freisetzung und Präsenz dieser in unserer Umwelt. Es werden verschiedene Aufnahmewege von Nanopartikeln in den menschlichen Organismus beschrieben. Hauptsächlich spielen die Inhalation über die Lunge, die Ingestion über den Gastrointestinaltrakt sowie die Deposition über die Haut eine Rolle (Rasmussen et al., 2010). Der Respirationstrakt stellt ein primäres Kontaktorgan mit der Umwelt dar und eine Haupteintrittspforte für Partikel im Nanobereich. Das respiratorische System kann funktionell in obere, luftleitende und tiefere, am Gasaustausch beteiligte Strukturen eingeteilt werden. Der obere, tracheobronchiale Bereich ist mit Flimmerepithel ausgekleidet, welches Schleim, Mikroorganismen oder inhalierte Partikel mittels koordinierter Bewegung Richtung Pharynx befördert und so eliminiert (mukoziliäre *Clearance*, engl. Reinigung) (Bruinink et al., 2015). Alveolen hingegen sind nicht mit Flimmerepithel ausgekleidet. Inhalierte Partikel von einer Größe $< 2,5\mu\text{m}$ können bis in die Alveolen gelangen und werden dort von Alveolarmakrophagen phagozytiert (Hoet et al., 2004). Diese wiederum induzieren die Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies und anderen inflammatorischen Mediatoren (Hoet et al., 2004). Cho et al. (2011) haben in einem *in vivo* Versuch an Ratten gezeigt, dass die intratracheale Instillation von ZnO-Nanopartikeln pathologische Läsionen in der Lunge hervorruft (Cho et al., 2011). Diese äußerten sich histopathologisch in eosinophiler Entzündung, regenerativer Proliferation, Hyperplasie und möglicher Fibrose (Cho et al., 2011). Der schnelle pH-abhängige Zerfall der phagozytierten ZnO-Nanopartikel zu Zn^{2+} -Ionen in den Lysosomen scheint entscheidend für diese pathologischen Veränderungen zu sein (Cho et al., 2011, Vandebriel and De Jong, 2012). Aber auch die Inhalation von

Nanopartikeln führt zu pulmonaler Inflammation und systemischer Toxizität (Vandebriel and De Jong, 2012). Eine beim Menschen bekannte Entzündungsreaktion auf die ungeschützte Inhalation metallischer Dämpfe wie Zinkoxid ist das sogenannte Metaldampffieber, welches sich mit Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Myalgie und Dyspnoe äußert und selbstlimitierend verläuft (Kaye et al., 2002).

Der Gastrointestinaltrakt stellt einen weiteren Aufnahmeweg von Nanopartikeln aus der Umwelt dar. Abhängig von den Partikeleigenschaften sind verschiedene Stoffwechselwege an der Distribution der Partikel beteiligt. Besonders häufig wird die Transzytose durch die M-Zellen der Peyer'schen Plaques genannt (Florence, 1997). Aber auch die parazelluläre Resorption der Nanopartikel, entweder durch Persorption in Extrusionszonen oder über Tight Junctions, sowie Endozytose über Enterozyten werden als Aufnahmewege postuliert (Florence, 1997, Jahn et al., 2012).

Bezüglich der dermalen Applikation von Nanopartikeln finden sich viele Studien mit der Frage nach der Aufnahme der Partikel über die Haut und einer möglichen resultierenden Zellschädigung. Die menschliche Haut ist aus mehreren Schichten aufgebaut, wobei die äußerste Schicht durch das gefäßlose Stratum corneum gebildet wird, eine Schicht abgestorbener Hornzellen, welche eine Schutzbarriere vor äußeren Einflüssen darstellt (Rassner, 2009). Das Stratum corneum scheint tieferliegende Hautzellen vor dem Kontakt mit Zinkoxid-Nanopartikeln zu schützen (Hackenberg and Kleinsasser, 2012, DeLouise, 2012). Insgesamt sprechen Studien dafür, dass der Anteil der Nanopartikel, der die Haut tatsächlich penetriert, ein geringer Prozentsatz der ursprünglich applizierten Dosis ist und die Verwendung von Zinkoxid-Nanopartikeln in Kosmetikprodukten beispielsweise als weiterhin insgesamt unbedenklich gilt (Nohynek et al., 2008, DeLouise, 2012, Monteiro-Riviere et al., 2011).

2.4.3 Zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln

Ein Verständnis über die Verteilung und Aufnahme der Nanopartikel im menschlichen Organismus ist besonders im Hinblick auf die mögliche medizinische Verwendung beispielsweise in der Krebstherapie, wie weiter unten beschrieben, von großem Interesse. Gelangen Nanopartikel in das Kreislaufsystem, können sie abhängig von ihrer Oberflächenbeschaffenheit und Größe an die Organe des retikuloendothelialen bzw. retikulohistozytären Systems wie Leber, Milz, Lungen und Knochenmark verteilt und über Mechanismen der Endozytose von den Zellen aufgenommen werden

(Baoum et al., 2010, Brannon-Peppas and Blanchette, 2004, Brigger et al., 2002). Es gibt verschiedene Endozytosemechanismen, durch welche die Zelle mit ihrer Umwelt kommuniziert und Substanzen internalisiert: Clathrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose, Phagozytose und (Makro)-Pinozytose (Lanone and Boczkowski, 2006). Die rezeptorvermittelte Endozytose ist definiert als spezifischer, energieabhängiger Prozess, bei dem die Zelle Biomoleküle internalisiert (Iversen et al., 2011). Dieser stellt den bedeutendsten Aufnahmeweg von Nanopartikeln in die Zellen dar, da diese, sobald sie mit physiologischen Lösungen in Kontakt kommen, mit Plasmaproteinen umgeben werden (Oh and Park, 2014). Über Phagozytose durch spezialisierte Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder neutrophile Granulozyten können Partikel mit einer Größe $> 0,5\mu\text{m}$ aufgenommen werden (Iversen et al., 2011, Oh and Park, 2014). Die unspezifischen Aufnahmewege der Makropinozytose und Pinozytose ermöglichen die zelluläre Absorption kleiner Partikel bzw. Moleküle und Flüssigkeiten (Geiser, 2010, Oh and Park, 2014). Diese Aufnahmewege spielen besonders bei der Internalisierung einzelner Nanopartikel $< 10\text{nm}$ eine bedeutende Rolle (Oh and Park, 2014). Studien an Gold-Nanopartikeln haben gezeigt, dass Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50nm im Vergleich schneller und vermehrt von Säugerzellen aufgenommen werden (Chithrani and Chan, 2007, Oh and Park, 2014).

Aber die Aufnahme ist nicht nur abhängig von der Größe der Partikel, sondern auch von der Oberflächenbeschaffenheit bzw. -ladung (Lu et al., 2009, Lu et al., 2010). Besonders die Internalisierung über Makrophagen wird hierdurch beeinflusst (Oh and Park, 2014). Vor allem positiv und auch negativ geladene Nanopartikel werden schneller phagozytiert als neutral geladene oder von Polyethylenglycol (PEG) umgebene Nanopartikel (Oh and Park, 2014). PEG schützt die Nanopartikel insgesamt vor Ionenstärke, begünstigt die Partikeldispersion und reduziert die Absorption im Blut (Oh and Park, 2014). Darüber hinaus hat auch die Form der Nanopartikel einen entscheidenden Einfluss auf die Art und Geschwindigkeit der zellulären Aufnahme (Qiu et al., 2010, Oh and Park, 2014). Kugelförmige Gold-Nanopartikel werden beispielsweise gegenüber zylindrischen Nanopartikeln favorisiert (Qiu et al., 2010, Chithrani et al., 2006, Oh and Park, 2014). Der transzelluläre Transport erfolgt über Endosomen bzw. Lysosomen oder multivesikuläre Körperchen (MVC). Auch das Verlassen der Zelle, die Exozytose der Nanopartikel, kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: Lysosomale Sekretion, Vesikel-Sekretion oder freie, nicht vesikuläre Sekretion (Oh and Park, 2014). Die folgende Skizze, modifiziert nach Oh und Park

(2014), gibt einen anschaulichen Überblick über die verschiedenen genannten Endo- und Exozytosemechanismen:

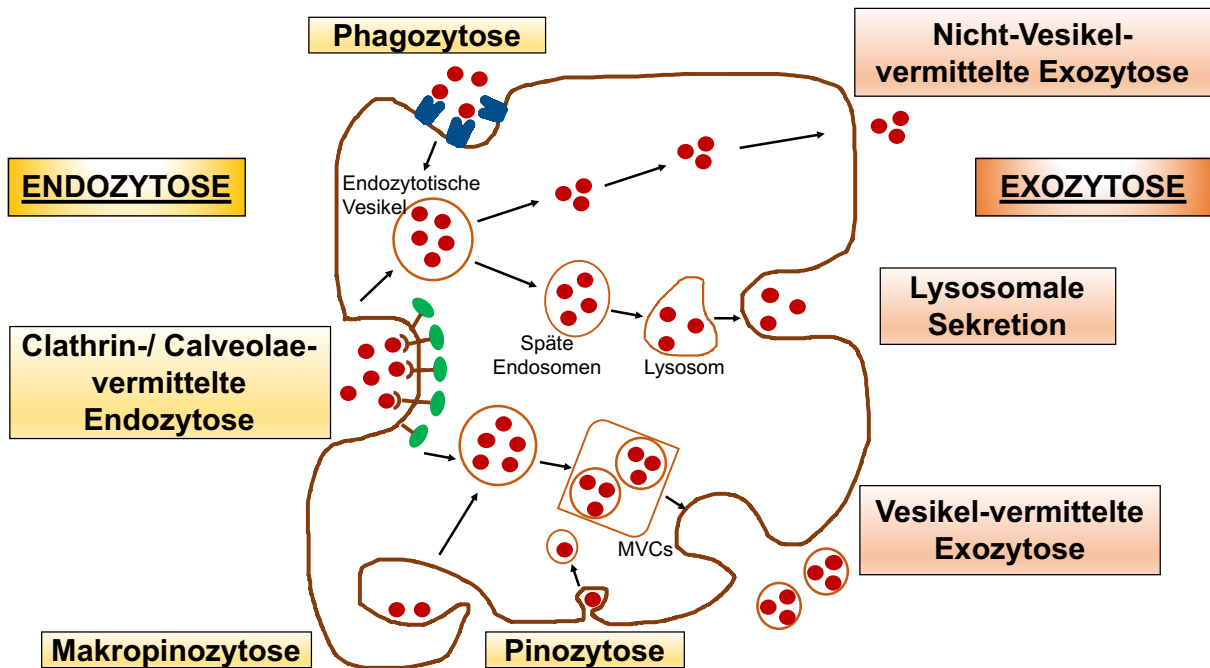


Abb. 2. 1 modifizierte schematische Darstellung der verschiedenen Endo- und Exozytosemechanismen von Nanopartikeln nach Oh and Park (2014): Clathrin-vermittelte Endozytose, Phagozytose, Makropinozytose und Pinozytose sowie Vesikel-vermittelte Exozytose, nicht-Vesikel-vermittelte Exozytose und lysosomale Sekretion. „MVCs“ = Multivesikuläre Körperchen. (Oh and Park, 2014).

2.5 Toxizitätsmechanismen von Nanopartikeln

Neben ihrem potentiellen Nutzen bergen Nanopartikel auch gesundheitliche Risiken, welche aktueller Gegenstand der Forschung im Bereich der Nanotoxikologie sind. Die Zellschädigung ist letztlich auf verschiedene Vorgänge wie Schädigung von Zellmembran und Zellorganellen, Inflammation, Induktion reaktiver Sauerstoffspezies, Ionenfreisetzung, DNA-Schäden und Apoptose zurückzuführen (Horie et al., 2012). Die Studienlage, welcher Mechanismus die Hauptkomponente der Toxizität der Nanopartikel bedingt, ist uneinig.

2.5.1 Schädigung von Zellmembran und Zellorganellen

Bereits die Zellmembran stellt einen Angriffspunkt für Nanopartikel dar. Yang et al. konnten beispielsweise bereits nach einer Stunde Inkubation mit 100µg/ml ZnO Zellmembranschäden in A549-Zellen demonstrieren (Yang et al., 2012). Sie stellen die

Hypothese auf, dass die akute Toxizität von ZnO-Nanopartikeln durch den frühzeitigen Membranschaden der Zellen bedingt ist (Yang et al., 2012).

Wie bereits erwähnt können Nanopartikel abhängig von ihren physikalischen und biochemischen Eigenschaften wie Größe, Form und Oberflächenladung in die Zellen aufgenommen werden (Oh and Park, 2014). In der Zelle scheinen Nanopartikel besonders die Mitochondrien zu schädigen (Unfried et al., 2009, Salnikov et al., 2007, Yu et al., 2013). Mitochondrien dienen als Energielieferanten der Zelle. Über die Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran wird der Zelle Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt. Salnikov et al. haben in ihrer Arbeit zeigen können, dass internalisierte Gold-Nanopartikel die Mitochondrien schädigen, indem sie zu einer Permeabilitätszunahme der inneren Mitochondrienmembran (*mitochondrial permeability transition, mPT*) und zu einer Schwellung der Mitochondrien führen (Salnikov et al., 2007). Als Folge der mitochondrialen Schädigung kann es zu einer Abnahme des ATP-Gehalts in der Zelle sowie zu einer erhöhten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen.

Durch Schädigung und Permeabilitätserhöhung der äußeren Mitochondrienmembran wird außerdem Cytochrom c freigesetzt und so der intrinsische Apoptoseweg der Zelle eingeleitet (Unfried et al., 2009). Yu et al. konnten für ZnO-Nanopartikel neben der mitochondrialen Schädigung eine verstärkte Akkumulation von Autophagosomen nachweisen (Yu et al., 2013). Das endoplasmatische Retikulum stellt einen weiteren Angriffsort für Nanopartikel dar. Innerhalb der Zelle dienen Mitochondrium und endoplasmatisches Retikulum als Hauptspeicherorte für Ca^{2+} . Eine Schädigung dieser Zellorganellen durch Nanopartikel kann somit in eine Dysregulation des Calciumhaushalts münden (Xia et al., 2006).

Viele Nanopartikel, darunter auch ZnO- und Silica-Nanopartikel, scheinen außerdem zu lysosomalen Schäden zu führen (Cho et al., 2011, Allison et al., 1966). Diese Schäden können unter anderem ebenfalls durch ROS-Induktion, durch Überladung der Lysosomen oder Schädigung der lysosomalen Membran bedingt sein und letztlich auch zum Zelltod durch Apoptose oder Autophagie führen (Stern et al., 2012).

2.5.2 Inflammatorisches Potential

In vielen Studien wird die Expression von Entzündungsmediatoren als Schädigungsmechanismus von Nanopartikeln diskutiert (Lenz et al., 2013, Sayes et al., 2007). ZnO-Nanopartikel haben ein bekanntes inflammatorisches Potential.

Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien zur Auswirkung pulmonaler Inhalation von ZnO-Nanopartikeln konnten zeigen, dass eine Exposition zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokinen wie TNF- α , INF- γ oder IL-12 führt (Rasmussen et al., 2010, Hanley et al., 2009, Sayes et al., 2007). Bekannt ist diese ausgeprägte Entzündungsreaktion auf die Inhalation der Partikel vom bereits beschriebenen Metaldampffieber.

Auch Siliciumoxid ist für sein proinflammatorisches Potential bekannt. Nach Inhalation der Partikel akkumulieren diese in der Lunge und können Pneumokoniosen verursachen, welche sich oftmals als chronische Bronchitis oder Emphysem bis hin zur Lungenfibrose manifestieren (Park et al., 2015). Die Distribution der Partikel ist wie zuvor bereits beschrieben abhängig von Form, Größe und Oberflächenfunktionalisierung. Auch SiO₂-Partikel akkumulieren hauptsächlich in Leber, Lunge und Milz (Retikuloendotheliales System, RES). Souris et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass besonders die Oberflächenladung von SiO₂-Nanopartikeln die *in vivo* Retention der Partikel beeinflusst: Positiv geladene, aminierte Partikel werden beispielsweise schneller über den hepatobiliären Trakt ausgeschieden (Souris et al., 2010).

Zwar konnten Lu et al. (2010) im Mausmodell zeigen, dass hohe Dosen SiO₂-Nanopartikel nicht zwingend gefährlich sind, aber bei Dosen über 100mg/kg konnte ein Anstieg der Konzentration der Aspartat-Aminotransferase (AST) nachgewiesen werden (Lu et al., 2010). Liu et al. (2011) haben in ihrer Studie diese These bekräftigen können. Hohe Dosen > 500mg/kg haben einen Einfluss auf die Leberwertenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) sowie auf die Leukozytenkonzentration (Liu et al., 2011). Ein Anstieg dieser Parameter deutet auf eine vorliegende Leberzellschädigung bzw. -inflammation hin. Dies konnte durch histologische Aufarbeitung anhand der nachgewiesenen degenerativen Nekrose und Granulation belegt werden (Liu et al., 2011).

2.5.3 Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Als eine Hauptkomponente der Toxizität von ZnO-Nanopartikeln wird die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* = ROS) in der Zelle diskutiert (Sabella et al., 2014). Eine kumulative Schädigung durch unphysiologisch hohe ROS-Konzentrationen führt zur Erschöpfung antioxidativer Abwehrmechanismen und letztlich zum Zelltod (Nel et al., 2006, Ryter et al., 2007).

Als freie Sauerstoffradikale werden Radikale bezeichnet, die endogen durch katalytische Prozesse beispielsweise bei der Atmungskette in Mitochondrien und exogen beispielsweise durch Strahlung oder Metalle entstehen können und ein ungepaartes Elektron in einem Orbital beinhalten (Halliwell, 1994, Halliwell, 2006). Die radikalen Sauerstoffspezies umfassen das Hyperoxid-Anion ($\cdot\text{O}_2^-$), Hydroxyl ($\text{HO}\cdot$), Peroxyl ($\text{RO}_2\cdot$), Alkoxy ($\text{RO}\cdot$), Hydrogenperoxid (H_2O_2) und hypochlorige Säure (HOCl). Freie Sauerstoffradikale besitzen eine hohe Reaktivität und können im menschlichen Organismus zu einer Schädigung von DNA, Fetten (inklusive Phospholipiden), Proteinen und Kohlenhydraten führen, sowie zu einer erhöhten Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) und Zelltod durch Apoptose oder Nekrose (Halliwell, 2006, Xia et al., 2006, Ho et al., 2013).

Die Auswirkungen der ROS-Induktion auf zellulärer Ebene zeigen Nel et al. anhand eines adaptierten 3-Stufen-Modells abhängig vom Level des oxidativen Stresses, dem die Zelle ausgesetzt ist: In Phase I, bei geringem oxidativem Stress, produziert die Zelle über den *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* Transkriptionsfaktor (Nrf 2 oder NFE2L2)-Signalweg antioxidative Phase II-Enzyme, um eine möglichst homöostatische Situation in der Zelle aufrecht zu erhalten. Bei weiterer Zunahme von oxidativem Stress kommt es in Phase II über den MAP-Kinase-Signalweg und die NF- κ B-Kaskade zu einem Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adäsionsmolekülen. Phase III, ausgelöst durch sehr hohen oxidativen Stress, mündet durch eine Schädigung der Mitochondrien in Apoptose bzw. Nekrose der Zelle (Nel et al., 2006, Rasmussen et al., 2010, Hsiao and Huang, 2011, Halliwell, 2006).

Die Abnahme von Glutathion (GSH) dient als wichtiger Biomarker für das Verhältnis zwischen den zellulären Schutzmechanismen und dem Level an oxidativem Stress. Glutathion ist ein endogenes Reduktionsmittel und schützt die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies. Bei oxidativem Stress wird GSH verbraucht, während sich oxidiertes Glutathion (GSSG) anreichert (Halliwell, 2006). Dieses Produkt besteht aus zwei durch eine Disulfidbrücke verbundene GSH und kann durch Glutathionreduktaseenzyme wieder in GSH umgewandelt werden (Halliwell, 2006).

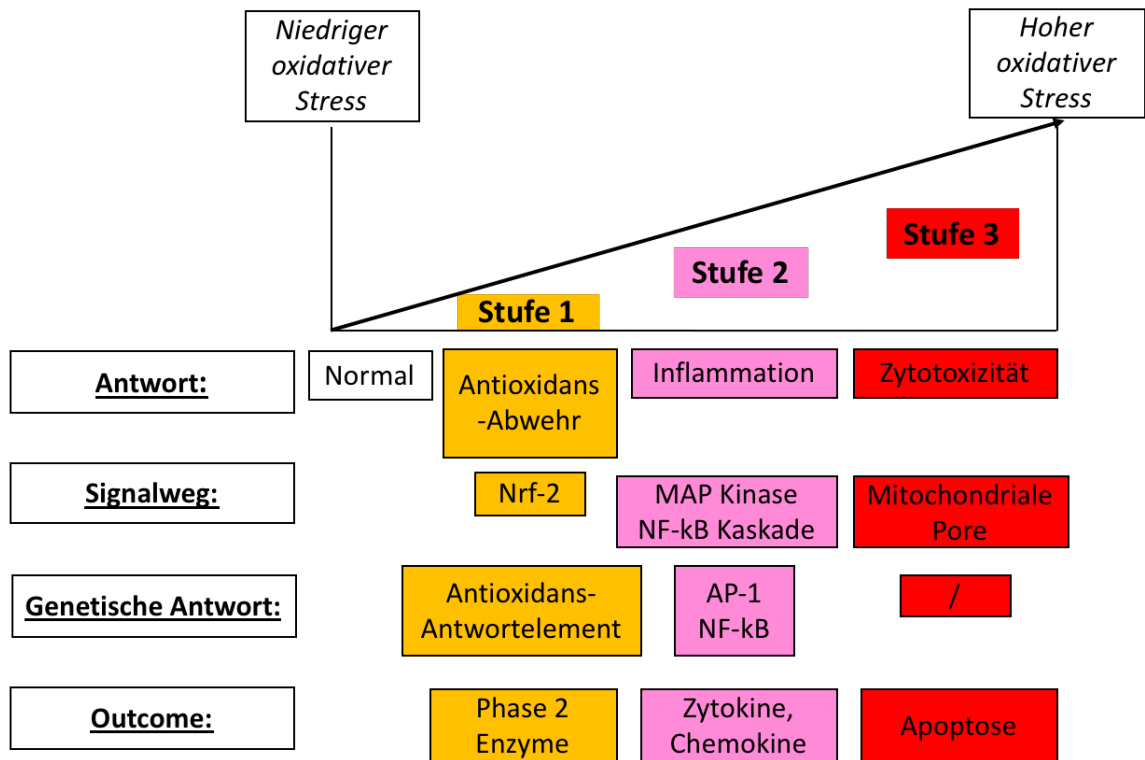


Abb. 2. 2 modifizierte schematische Darstellung des 3-Stufen-Modells nach Nel et al. (2006): Auswirkungen der ROS-Induktion anhand des adaptierten 3-Stufen-Modells in Abhängigkeit vom oxidativen Stresslevel der Zelle (Nel et al., 2006). Nrf-2: nuclear factor (erythroid- derived 2)-like 2; MAP: mitogen-activated protein; NF-kB: nuclear factor-kB; AP-1: activator-protein 1.

2.5.4 Schädigung durch Ionenfreisetzung

Die Möglichkeit der Zellschädigung durch die Freisetzung von Ionen wird in einer Vielzahl an Studien kontrovers diskutiert. Einige Autoren postulieren, dass neben den bereits genannten Mechanismen die Freisetzung metallischer Ionen für die Toxizität der Nanopartikel verantwortlich ist (Horie et al., 2012, Xia et al., 2008). Dabei ist die Intensität der Zytotoxizität abhängig von dem jeweils freigesetzten Metall (Horie et al., 2012). Die Löslichkeit der Partikel und die Geschwindigkeit der Dissoziation scheinen abhängig von verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Partikel, der Oberflächenbeschaffenheit, der Größe oder und dem umgebenden Medium beziehungsweise dem pH-Wert (Misra et al., 2012, Horie et al., 2012, Heim et al., 2015). Zum Beispiel weisen Zinkoxid und Nickel(II)-oxid (NiO) im Zellkulturmedium eine höhere Löslichkeit auf als in Wasser (Horie et al., 2012, Xia et al., 2008, Horie et al., 2009b). Kao et al. haben die Hypothese aufgestellt haben, dass die über Endozytose aufgenommenen Zinkoxid-Nanopartikel erst im sauren Milieu der frühen Endosomen innerhalb der Zelle zu Zink-Ionen dissoziieren (Kao et al., 2012). Andere Arbeitsgruppen postulieren, dass die Nanopartikel bereits vor Internalisierung

in die Zelle zu Zink-Ionen dissoziieren und als solche in die Zellen aufgenommen werden (Hackenberg et al., 2011b, Deng et al., 2009, Heim et al., 2015). Diese Zink-Ionen reichern sich dann intrazellulär, bevorzugt im Nukleus, an und führen dort durch Interkalation in die DNA-Helix, Reaktion mit Phosphatgruppen und chemischen Reaktionen mit den Nitrogen-Basen der Histone zu DNA-Schäden, vornehmlich zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) (Heim et al., 2015, Hackenberg et al., 2011b, Hackenberg et al., 2011a). Wie oben bereits aufgeführt, ist Zink ein wichtiges Spurenelement und an vielen essenziellen Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Die Zink-Homöostase ist sehr streng reguliert, die Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen ist physiologisch gering. Wird die zelluläre Zink-Homöostase gestört, kann dies letztlich zum Zelltod führen (Rasmussen et al., 2010).

Andere Arbeitsgruppen gehen von einer den Partikeln eigentümlichen Toxizität aus und schreiben die Schädigung der Partikel-Zell-Interaktion selbst zu (Moschini et al., 2013, Lin et al., 2009). Dementsprechend beschäftigen sich viele Arbeiten mit verschiedenen Möglichkeiten zur Reduktion ebendieser Ionenfreisetzung aus metallischen Nanopartikeln. Hsiao et al. fanden in ihrer Studie heraus, dass die Zn^{2+} -Ionen Freisetzung durch Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheiten, genauer durch Beschichtung (*engl. Coating*) der ZnO-Nanopartikel mittels Titandioxid (TiO_2), inhibiert und die Zytotoxizität der Partikel somit herabgesetzt werden kann (Hsiao and Huang, 2011). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Studie von Georges et al. (2010), in welcher ZnO-Nanopartikel durch die Zugabe von Eisen (Fe) stabilisiert werden konnten und die Toxizität so ebenfalls gesenkt wurde (George et al., 2010). Dies wiederum spricht gegen eine ausschließlich partikelassoziierte Toxizität.

2.5.5 Genotoxizität

Die Schädigung der DNA durch Nanopartikel kann indirekt durch die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies bedingt sein. Diese führen unter anderem zur oxidativen Modifikation von Basen in der DNA, DNA-Strangbrüchen oder DNA-Quervernetzungen (*crosslinks*) (Risom et al., 2005, Dizdaroglu et al., 2002). Auch die durch Nanopartikel ausgelöste Inflammation birgt das Risiko der DNA-Schädigung: Die durch Zytokine, unter anderem besonders durch TNF- α und INF- γ induzierbare NO-Synthase (iNOS) produziert große Mengen an Stickstoffmonoxid (NO), welches zu oxidativen DNA-Schäden und Inhibierung von DNA-Reparaturenzymen führt (Jaiswal et al., 2000).

Außerdem kann die bereits angeführte oxidative Schädigung von Biomolekülen wie beispielsweise von Fetten, die Lipid-Peroxidation, ebenfalls zu DNA-Schäden und Mutationen führen (Marnett, 2002). Malondialdehyd (MDA), als Endprodukt des oxidativen Fettsäureabbaus, ist ein wichtiger Biomarker für oxidativen Stress. MDA kann mit den Basen der DNA (Adenin, Guanin und Cytosin) unter Bildung von DNA-Addukten reagieren und diese schädigen (Marnett, 1999, Marnett, 2002).

Neben den indirekten Mechanismen können Nanopartikel die DNA auch durch direkte Interaktion schädigen. Die Größe scheint hierbei eine bedeutende Rolle zu spielen. Je kleiner die Nanopartikel, desto leichter können sie in die Zelle diffundieren und dort sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern akkumulieren (Chen et al., 2014). Toyooka et al. postulieren in ihrer Studie, dass TiO₂-Nanopartikel zu DNA-DSB und H2AX-Histonphosphorylierung führen, unabhängig von der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (Toyooka et al., 2012). γ-H2AX-Foci gelten dabei als endogene Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche (Kuo and Yang, 2008). Hackenberg et al. konnten ebenfalls einen deutlichen Anstieg von DNA-Doppelstrangbrüchen in nasalen Mukosazellen nach wiederholter Exposition mit ZnO-Nanopartikeln zeigen (Hackenberg et al., 2011b). Dabei wird neben der DNA-Schädigung durch ROS-Induktion ebenfalls eine ROS-unabhängige, direkte Interaktion der Nanopartikel und der zuvor dissoziierten Ionen mit der DNA diskutiert (Hackenberg et al., 2011b). Diese ROS-unabhängige Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ZnO-Nanopartikel konnte auch in nachfolgenden Studien beobachtet werden. Die bereits erwähnte Dissoziation zu Zn²⁺-Ionen und die direkte Interaktion mit der DNA scheinen dabei eine besonders entscheidende Rolle zu spielen (Heim et al., 2015).

Neben der direkten Interaktion mit der DNA wurden für Nanopartikel auch weitere genotoxische Eigenschaften durch die Schädigung von DNA-Reparaturmechanismen oder Veränderung und Arrest des Zellzyklus entdeckt (Mroz et al., 2008, Valdiglesias et al., 2013).

2.6 Apoptose

Der Begriff Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod. Dieser kann über einen extrinsischen oder intrinsischen Signalweg eingeleitet werden. Der extrinsische Signalweg wird über sogenannte Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche (TNFR1, FAS, TRAIL-R1) eingeleitet (Brenner and Mak, 2009). Der intrinsische Signalweg wird durch DNA-Schäden oder oxidativen Stress innerhalb der Zelle eingeleitet. Sowohl die

Bestrahlung als auch die Exposition mit Nanopartikeln kann zu einer Akkumulation dieser letalen Stimuli führen. In Folge der Schädigung der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum ins Zytosol. Cytochrom c bildet dann gemeinsam mit dATP, APAF1 (*apoptotic peptidase activator factor 1*) und Caspase 9 den Apoptosom-Komplex (Brenner and Mak, 2009). Dieser führt zu einer Aktivierung weiterer Effektor-Caspasen (3, 6, 7) und letztlich zur Apoptose (Brenner and Mak, 2009). Der intrinsische Signalweg wird durch Proteine der Bcl-2-Familie kontrolliert. Diese lassen sich in drei Gruppen einteilen: Gruppe 1 besitzt anti-apoptotische Eigenschaften (Bsp. Bcl-2) während Gruppe 2 und 3 pro-apoptotische Eigenschaften haben (Bsp. BAX; BAK) (Brenner and Mak, 2009). Das Tumorsuppressorgen p53 spielt eine entscheidende Rolle beim programmierten Zelltod. Kann die Zelle den Zellschaden nicht mehr reparieren, führt p53 über die Aktivierung pro-apoptotischer Faktoren wie BAX, die Bindung anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder die Produktion von ROS zum Zelltod.

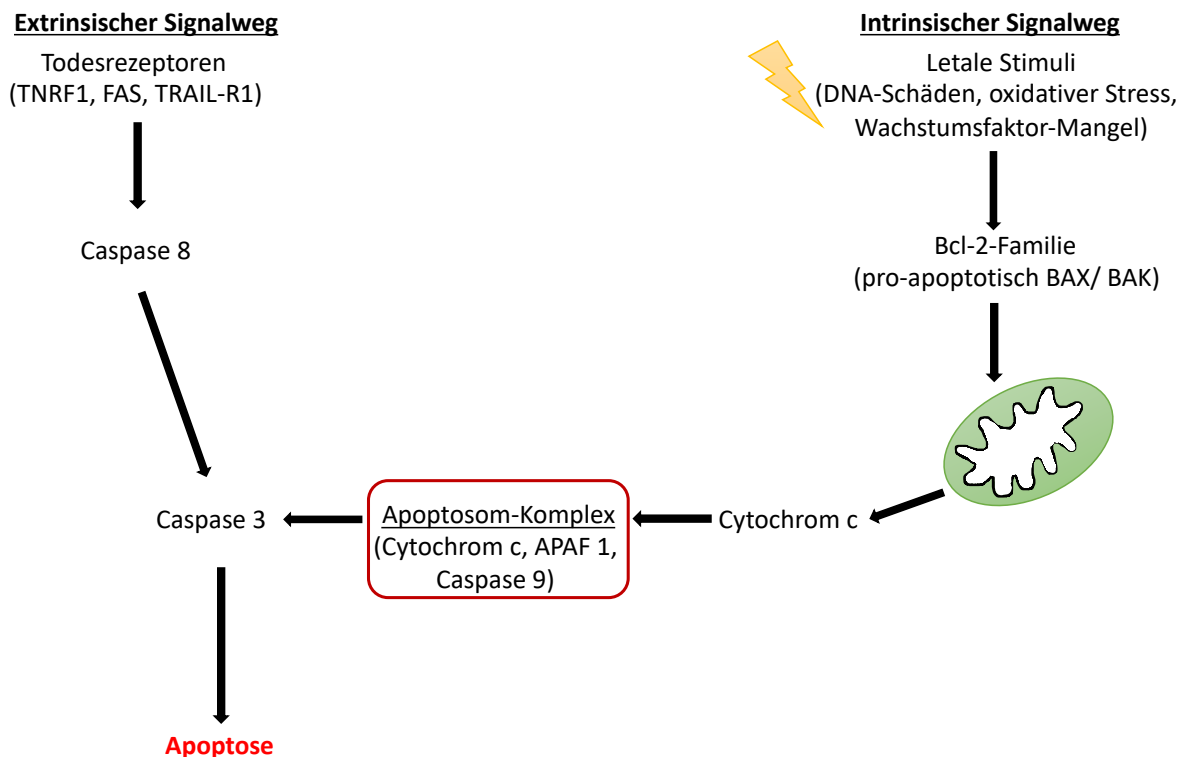


Abb. 2.3 Signalwege der Apoptose modifiziert nach Brenner et al. (2009). Der extrinsische Signalweg wird über Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche (TNRF1, FAS, TRAIL-R1) eingeleitet. Der intrinsische Signalweg wird durch letale Stimuli innerhalb der Zelle eingeleitet (Brenner and Mak, 2009).

2.7 Nanopartikel in der Krebsforschung

2.7.1 Nanopartikel in der Therapie

In der Krebstherapie hat sich in den vergangenen Jahrzehnten viel getan. Doch stoßen auch aktuelle Therapieregime aus Bestrahlung und Chemotherapie häufig an die Grenzen der Möglichkeiten und können oftmals keine 100%ige Tumorreduktion erzielen sowie zuverlässig zwischen gesunden Zellen und Krebszellen differenzieren. Diese Tatsache birgt eine große systemische Toxizität der Medikamente, wie beispielsweise Knochenmarkssuppression, Neurotoxizität oder Kardiomyopathie (Nie et al., 2007). Aufgrund dieser gravierenden Nebenwirkungen ist die Anwendung von Chemotherapeutika oftmals limitiert. Ein Ansatz zur Minimierung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist die Kopplung an kolloidale Nanopartikel mit dem Ziel, bestehende zelluläre Resistenzmechanismen zu umgehen und die Toxizität gegenüber gesunden Gewebe zu minimieren (Brigger et al., 2002). Bereits 1975 beschäftigten sich erste Studien mit Arzneistoffträgern im Nanobereich und zeigten, dass in Liposomen eingeschlossenes Actinomycin D das Überleben von tumortragenden AKR-Mäusen signifikant verlängert (Gregoriadis and Neerunjun, 1975).

2.7.1.1 Direkte Toxizität der Nanopartikel

In neueren *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass gewisse Metalloxid-Nanopartikel wie Zinkoxid-Nanopartikel bevorzugt Krebszellen töten, während sie gesundes Gewebe weitgehend verschonen (Rasmussen et al., 2010, Akhtar et al., 2012). Diese selektive Toxizität macht Nanopartikel besonders interessant für die Verwendung in der Krebsbehandlung, da viele der in der bisherigen Therapie eingesetzten Medikamente nicht ausreichend zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe differenzieren können. Möglicherweise spielt die schnelle Proliferationsrate der Tumorzellen eine entscheidende Rolle bei der Selektivität (Hanley et al., 2008).

2.7.1.2 Nanopartikel zur zielgerichteten Therapie und als Wirkstoffträger

Nanotechnologie kann nicht nur den Transport schwer wasserlöslicher Medikamente ermöglichen, sondern auch den zielgerichteten Transport im Sinne einer „*targeted*

therapy“, den Co-Transport von zwei oder mehr Medikamenten und die Visualisierung des Transports unter Nutzung bildgebender Verfahren (Farokhzad and Langer, 2009, Rasmussen et al., 2010). Neben der direkten, internalen Toxizität der Nanopartikel ist besonders die Möglichkeit der weiteren Therapiespezialisierung im Sinne einer zielgerichteten Krebstherapie von Interesse (Brannon-Peppas and Blanchette, 2004). Um die Zirkulationszeit und damit die Möglichkeit des zielgerichteten Transports zum tumortragenden Gewebe zu verbessern, sollten die verwendeten Nanopartikel eine Größe von 10nm bis 100nm Durchmesser haben und eine hydrophile Oberfläche aufweisen, um der Beseitigung durch Makrophagen zu entgehen (Vinogradov et al., 2002, Nie et al., 2007). Eine hydrophile Oberflächenbeschaffenheit kann durch Kopplung mit hydrophilen Polymeren wie PEG erreicht werden (Nie et al., 2007). Im Gegensatz dazu werden Partikel mit einer überwiegend hydrophoben Oberfläche bevorzugt von Leber, Milz und Lunge aufgenommen (Brannon-Peppas and Blanchette, 2004).

Die geringe Größe der Nanopartikel und der zuvor beschriebene hyperpermeable, instabile Wandaufbau der Tumorgefäße, sowie der reduzierte lymphatische Abfluss aus der Tumorumgebung ermöglichen den sogenannten EPR-Effekt (*engl. enhanced permeability and retention*), welcher eine erhöhte Permeabilität und Retention von Substanzen im Tumorgewebe beschreibt und einen Mechanismus des passiven Targetings darstellt (Rasmussen et al., 2010, Cho et al., 2008, Hashizume et al., 2000). Die Möglichkeit der gezielten Veränderung der Partikelgröße von ZnO-Nanopartikeln erhöht den Nutzen des EPR-Effekts und es können erhöhte Nanopartikel-Konzentrationen im Tumor erzielt werden (Rasmussen et al., 2010, Guo et al., 2008). Außerdem unterscheidet sich das Mikromilieu um den Tumor verglichen mit gesunden eukaryotischen Zellen. Während normale eukaryotische Zellen nach außen hin aufgrund ihrer Phospholipid-Doppelschicht neutral geladen erscheinen und ein geringes Membranpotenzial aufweisen, besitzen Krebszellen eine hohe Konzentration anionischer Phospholipide und große Membranpotenziale (Papo et al., 2003). Zudem wird aufgrund der hohen Proliferationsrate und des schnellen Wachstums des Tumors viel Energie benötigt, welche durch erhöhte Glycolyseraten gewonnen wird. Dies führt wiederum zu einem pH-Abfall und dadurch zu einer sauren Tumorumgebung (Swietach et al., 2014). Diese genannten Besonderheiten des Mikromilieus der Krebszellen in Kombination mit den elektrostatischen Eigenschaften der Nanopartikel stellen einen weiteren Vorteil für Anwendung und medizinische Applikation von Nanopartikeln dar (Rasmussen et al., 2010). Der isoelektrische Punkt

von ZnO-Nanopartikeln liegt bei einem pH-Wert von 9-10, sodass angenommen werden kann, dass die Oberflächenladung der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen (pH 7,35-7,45) stark positiv ist und diese deshalb besonders mit Krebszellen interagieren (Rasmussen et al., 2010). ZnO-Nanopartikel besitzen außerdem die Eigenschaft Proteine zu adsorbieren, wodurch sich biologische Interaktionen, Metabolismus und auch Zytotoxizität der Partikel ändern können (Horie et al., 2009a).

Ein weiterer interessanter Aspekt der Verwendung von Nanopartikeln vor dem Hintergrund der zielgerichteten Krebstherapie ist die Möglichkeit des Medikamententransports. Durch Veränderung der Oberflächeneigenschaften oder spezielle Kopplung können Nanopartikel gezielt bestimmte Zelltypen angreifen oder physiologische Barrieren durchdringen und tief in Tumorgewebe eindringen (Rasmussen et al., 2010). Durch einen zielgerichteten Transport von Chemotherapeutika kann eine Dosisreduktion der Medikamente und somit auch eine Reduktion der relevanten Nebenwirkungen ermöglicht werden (Rasmussen et al., 2010).

2.7.2 Nanopartikel in der Diagnosefindung

Neben der Verwendung in der Therapie finden Nanopartikel auch einen großen Anwendungsbereich in der Diagnosefindung, vor allem bei bildgebenden Verfahren wie der Computertomographie (CT) und der Magnetresonanztomographie (MRT) (Brigger 2002). Wisner et al. konnten bereits 1996 in ihren Studien an Schweinen zum malignen Melanom beispielsweise eine hohe Kontrastauflösung in der CT durch subkutan applizierte Nanopartikel erzielen und so befallene Lymphknoten detektieren (Brigger et al., 2002, Wisner et al., 1996). Beim MRT können paramagnetische Nanopartikel ebenfalls als Kontrastverstärker benutzt werden. Studien am Mausmodell haben gezeigt, dass sich supraparamagnetische Nanopartikel unter Nutzung des EPR-Effekts im Tumorgewebe anreichern und mittels MRT darstellbar sind (Lee et al., 2006, Rasmussen et al., 2010). Weissleder et al. konnten sogar zeigen, dass lymphotrope paramagnetische Nanopartikel die Darstellung klinisch okkult, mittels anderer nicht-invasiver Diagnostik nicht darstellbarer Lymphknotenmetastasen bei Prostatakrebs im hochauflösenden MRT ermöglichen (Brannon-Peppas and Blanchette, 2004, Harisinghani et al., 2003).

2.8 Das Chorioallantoismembran-Modell

Das Modell der Chorionallantoismembran, kurz CAM-Modell, hat sich in den vergangenen Jahrzehnten als Zwischenmodell zwischen Zellversuch und Tierversuch etabliert. Anstatt mit dem Hühnerembryo selbst arbeitet dieses Versuchsmodell mit der gefäßreichen Chorioallantoismembran, welche sozusagen die Plazenta des befruchteten Hühnereis darstellt. Die *American Association for Laboratory Animal Science* (IACUC) hat festgelegt, dass ein Hühnerembryo vor dem 14. Tag der Gestationsperiode schmerzempfindlich ist und das CAM-Modell somit ohne speziellen Ethikantrag für Experimente zugelassen (Kue et al., 2015). In der Virologie hat es sich bereits als häufig verwendetes Modell etabliert. Außerdem ist es als *in vivo* System zur Untersuchung der Angiogenese und Anti-Angiogenese von großem Interesse (Ribatti et al., 1996). Im Vergleich zu anderen *in vivo* Systemen ist das CAM-Modell insgesamt schnell reproduzierbar, kostengünstiger und simpler in der Handhabung (Kue et al., 2015). Durch das im Versuchsprotokoll beinhaltete Eröffnen der Eierschale und Schaffen eines Fensters, bietet das CAM-Modell den Vorteil einer kontinuierlichen Visualisierung des Experiments (Valdes et al., 2002). Das noch unreife Immunsystem, vergleichbar mit beispielsweise immuninkompetenten Mäusen, macht es außerdem besonders für Xenograft-Studien zur Untersuchung von Invasions- und Metastasierungsverhalten humaner Tumorzellen interessant (Lokman et al., 2012, Ossowski, 1988, Deryugina and Quigley, 2008). Die Verwendung der Chorioallantoismembran zur Untersuchung des Tumorwachstums geht bereits zurück bis ins Jahr 1912 (Harris, 1958, Murphy and Rous, 1912), als Rous und Murphy zeigen konnten, dass das Beimpfen der Membran mit dem Rous-Sarkom-Virus zur Tumorentstehung an der beimpften Stelle führt (Dhaliwal, 1959, Murphy and Rous, 1912). Jedoch gibt es auch Problemstellungen und Limitationen beim CAM-Modell: Das zuvor bereits genannte unreife Immunsystem macht die Hühnereier während der Versuchszeit anfällig für Pilzinfektionen oder führt zu unspezifischen Immunreaktionen im Verlauf der Versuche; der Beobachtungszeitraum ist aufgrund der vergleichsweise kurzen Gestationsperiode des Hühnerembryos auf wenige Tage limitiert; das Modell unterliegt schnellen morphologischen Veränderungen und es ist bisher nur eine begrenzte Anzahl geeigneter Antikörper für das Hühnergewebe bekannt (Lokman et al., 2012, Cimpean et al., 2008). Die relativ hohe Mortalitätsrate der Hühnerembryos von 25-50% nach Manipulation am Ei stellt ein Hauptproblem während der Versuche

dar (Li et al., 2015, Dohle et al., 2009, Sys et al., 2013). Die folgende Abbildung stellt schematisch den Versuchsaufbau dar:

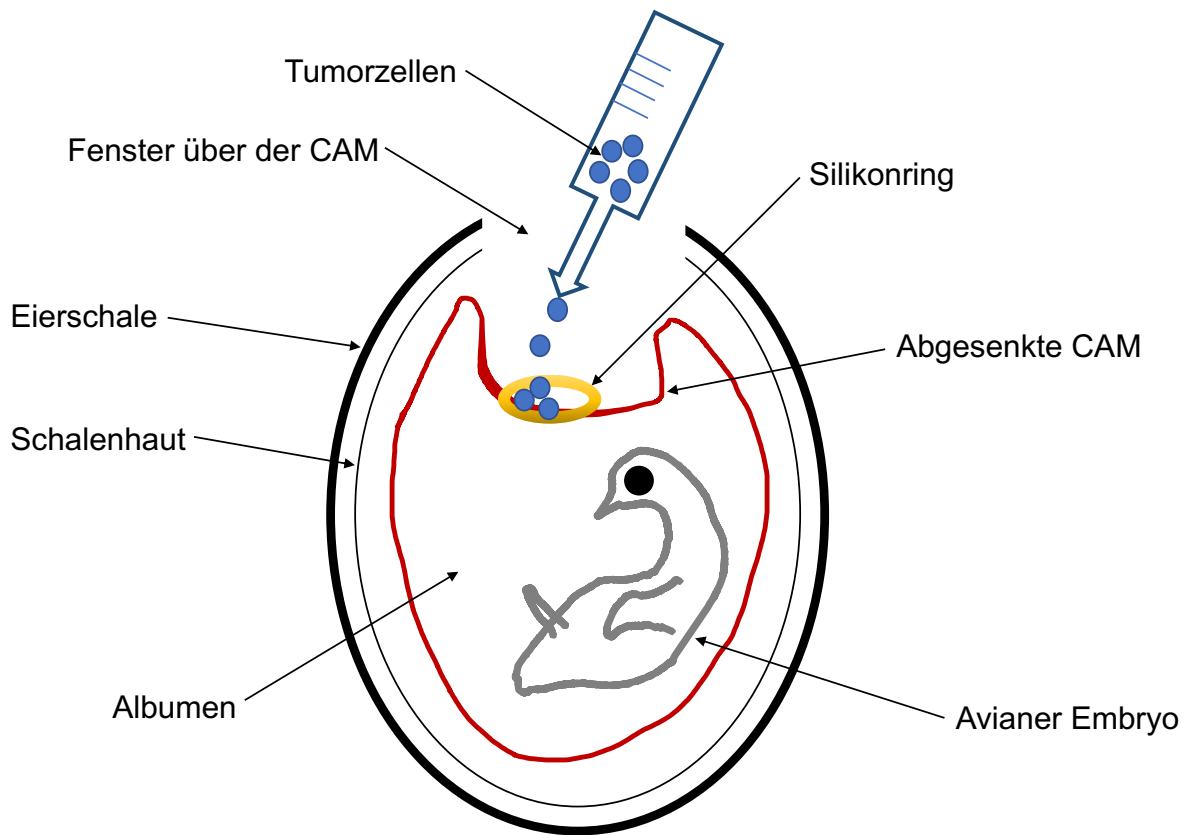


Abb. 2.4 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die Skizze zeigt vereinfacht den Vorgang der Implantation von Tumorzellen im CAM-Modell.

2.8.1 Die Chorioallantoismembran

Es gibt insgesamt vier fetale Membranen im Hühnerei: Das Amnion, welches den Embryo umgibt und eine mechanische Schutzfunktion einnimmt, den Dottersack, die Allantois (Verlängerung der embryonischen Blase) und das extraembryonische Chorion (Mohammed et al., 2015, Renfree et al., 2013). Die Chorioallantoismembran bildet sich am 4.-5. Tag, wie der Name andeutet, durch Fusion des somatischen Mesoderms des Chorions mit dem vaskularisierten Mesoderm der Allantois (Fuchs and Lindenbaum, 1988). Die Gefäße migrieren durch das Mesenchym in die Epithelschicht des Ektoderms und nach einer Woche Inkubation hat der Großteil der CAM Kontakt zur Schalenmembran des Hühnereies (Fuchs and Lindenbaum, 1988). Die gebildete CAM selbst ist ca. 200µm dick und von außen nach innen aus den folgenden drei Schichten aufgebaut: Ektoderm (Chorion), Mesoderm (oder Stroma) und Endoderm (Allantois) (Valdes et al., 2002, Lokman et al., 2012, Fuchs and

Lindenbaum, 1988). Das Ektoderm bildet dabei die Grenzfläche zur Luft beziehungsweise Eierschale, das Stroma stellt ein locker verbundenes Gewebe dar und das einschichtige Endoderm bildet schließlich die Grenzfläche zur Allantois nach innen (Valdes et al., 2002).

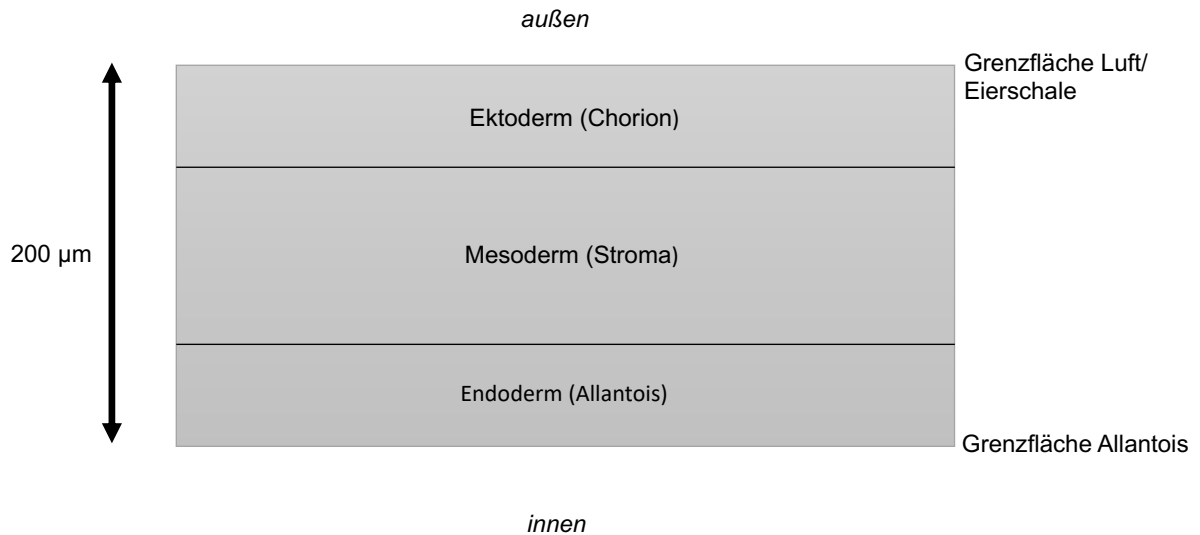


Abb. 2. 5 Aufbau der CAM modifiziert nach Valdes et al. (2002): Die Chorioallantoismembran ist ca. 200 µm dick und von außen nach innen aus drei Schichten aufgebaut: Ektoderm (Chorion), Mesoderm bzw. Stroma und Endoderm (Allantois) (Valdes et al., 2002).

2.8.2 Funktion der Chorioallantoismembran

Die Chorioallantoismembran ist in ihrer Funktion vergleichbar mit der Plazenta eines menschlichen Embryos bzw. Fetus. Sie dient dem Hühnerembryo in erster Linie als respiratorisches Organ und ihre Hauptfunktion ist der Gasaustausch über die Schale (Ausprunk et al., 1975, Rizzo et al., 1995). Außerdem dient die CAM dem Transport von Mineralstoffen wie Kalzium, welches der aviane Embryo während der Entwicklung benötigt. Der Kalziumbedarf wird zu Beginn durch den Dottersack gedeckt, aber im Entwicklungsverlauf reicht dieser als Kalziumquelle nicht mehr aus und das benötigte Kalzium wird dann durch die Eierschale selbst bereitgestellt und über die mit der Schalenmembran in Kontakt stehenden Choriongefäße zum Embryo transportiert (Fuchs and Lindenbaum, 1988, Dunn et al., 1981). Neben den bereits genannten Funktionen dient die Chorioallantoismembran außerdem als Ort für Abbauprodukte.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Sowohl die Versuche des Kolonie-Assays als auch die Versuche des CAM-Modells wurden mit der Zelllinie A549 durchgeführt (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA). A549 sind Zellen eines Adenokarzinoms der Lunge, eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Diese in der Forschung gut etablierten Zellen eignen sich als Modell zur Untersuchung epithelialer Tumore der oberen und unteren Atemwege.

3.1.2 Eier

Für die Versuche mit der Chorioallantoismembran wurden befruchtete, weiße Eier des Leghorns Huhns verwendet (LSL Rhein-Main, Dieburg).

3.1.3 Laborgeräte

Bezeichnung	Herkunft (Firma, Stadt, Land)
CASY® cell counter	Roche Diagnostics International AG, Basel, Schweiz
Colcount-Scanner	Oxford optronix Ltd, Abingdon, UK
Gammacell 2000 (Bestrahlungsquelle)	Mølgaard Medical, Risø, Dänemark
Inkubatoren -HERAcell 150i -Heraeus -Styropor-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Heraeus, Hanau Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg
Kühl- bzw. Gefrierschränke -(+7°C) -(-25°C) -(-30°C)	Liebherr, Bulle, Schweiz Liebherr, Bulle, Schweiz Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroskope -Leitz Orthoplan -Nikon TMS	Leitz, Wetzlar Nikon GmbH, Düsseldorf
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg

Material und Methoden

Ultrafeinwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Zentrifugen -Thermo scientific -Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Heraeus, Hanau

Tab. 3. 1 Auflistung der Laborgeräte

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen - 50ml, 25cm ² - 250ml, 75cm ² - 550ml, 175cm ²	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Falcons - 50ml - 25ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipetten - 2-20µl - 20-200µl - 100-1000µl - Pipetus®	Brand, Wertheim Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettenspitzen - 710 180/ 2ml - 606 180/ 5ml - 607 180/ 10ml - 760 180/ 25ml - 10µl - 200µl - 1000µl	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfgefäße - 2ml - 1,5ml - 0,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
CASY® cups	Roche Diagnostics International AG, Basel, Schweiz
Silikonringe (6,4 mm)	Dentaurum GmbH, Ispringen
Filterpapier	Vogel GmbH, Gießen
Faltenfilter (15cm)	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Skalpell (Nr. 11)	FEATHER® Safety Razor Co., Osaka, Japan
Parafilm M®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

Tab. 3. 2 Auflistung der Verbrauchsmaterialien

3.1.5 Zellkulturmedien, Zusätze, Puffer

Bezeichnung	Herkunft (Firma, Stadt, Land)
Accutase	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Life Technologies, Carlsbad, USA
FBS (Fetal Bovine Serum)	PAA-Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Millipore (doppelt destilliertes Wasser)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Life Technologies, Carlsbad, USA
PenStrep (10.000 Units Penicillin/ml und 10.000µg Streptomycin/ml)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA	PAA-Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Tab. 3. 3 Auflistung der Zellkulturmedien, Zusätze und Puffer

3.1.6 Chemikalien

Bezeichnung	Herkunft (Firma, Stadt, Land)
CASY® ton	Roche Diagnostics International AG, Basel, Schweiz
Terralin® (Flächendesinfektionsmittel)	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ethanol (99%, 2,5L)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aceton (2,5L)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KGaA, Darmstadt

Tab. 3. 4 Auflistung der Chemikalien

3.1.7 Reagenzien der Hämatoxilyn-Eosin-Färbung

Bezeichnung	Herkunft (Firma, Stadt, Land)
Entellan	Merck, Darmstadt
Hämalaunlösung sauer (nach Mayer)	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	Applchem, Darmstadt
Eosin G Lösung (0,5% wässrig)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tab. 3. 5 Auflistung der Reagenzien der Hämatoxilyn-Eosin-Färbung

3.1.8 Software

Bezeichnung	Herkunft (Firma, Stadt, Land)
Word (Microsoft Word 2013)	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Excel (Microsoft Excel 2013)	Microsoft Corporation, Redmont, USA
PowerPoint (Microsoft PowerPoint 2013)	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Image J	NIH, Bethesda, MA, USA
Endnote X8	Clarivate Analytics, Boston, MA, USA
SPSS Version 23	International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, New York, USA

Tab. 3. 6 Auflistung der Software

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung und Charakterisierung der ZnO-Nanopartikel (15nm)

Die in den Versuchen verwendeten Nanopartikel wurden vom Institut für Anorganische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (AG [REDACTED]) zur Verfügung gestellt. In den Zellkulturversuchen wurden ZnO-Nanopartikel mit einer Größe von 15nm verwendet. Die Synthese der Zinkoxid-Nanopartikel erfolgte mittels 5mmol $\text{Zn}(\text{Ac})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, welches in 10ml Methanol gelöst wurde. Anschließend wurden 20ml Tetramethylammoniumhydroxid (Me_4NOH 25% w/w in Methanol) hinzugefügt und bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde dann in einen Stahl-Autoklaven überführt und für 24 Stunden auf 75°C erhitzt. Das weiße Präzipitat wurde mit Wasser gereinigt und letztlich an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet (Cheng et al., 2006). Das Zetapotenzial der Partikel beträgt +40mV. Das Zetapotenzial beschreibt das elektrische Potential der Partikel und ist ein Indikator für die Oberflächenladung bzw. die Partikel-Stabilität.

3.2.2 Zellkultur

Die verwendeten A549 Zellen wurden im Brutschrank in Zellkulturflaschen mit DMEM/5%FBS/2%PenStrep bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert und je nach Konfluenz und Bedarf 3 Mal pro Woche passagiert.

3.2.2.1 Zellzahlbestimmung

Eine Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe der sogenannten Neubauerzählkammer. Zunächst wurde die Kammer präpariert, indem das Deckglas durch Anhauchen auf der Zählkammer befestigt wurde. Anschließend wurden 20µl der zu zählenden Zellsuspension entnommen und mit 20µl Trypanblau gemischt, um ein Verdünnungsverhältnis von 1:1 zu erhalten. Nach möglichst luftblasenfreiem Befüllen der Kammer konnten die vitalen Zellen (ungefärbte Zellen) am Mikroskop ausgezählt werden.

Die Gesamtzellzahl wird anhand folgender Formel errechnet:

$$\text{Gesamt} = \text{MW} \times \text{VF} \times 10^4 \times \text{V}$$

Abb. 3. 1 Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl. MW: Mittelwert der gezählten Zellen; VF: Verdünnungsfaktor; 10⁴: Kammerfaktor; V: Volumen (ml), aus dem die Zellsuspension entnommen wurde.

3.2.3 Durchführung des Kolonie-Assays

3.2.3.1 Behandlungsschema

Der Versuch des Kolonie-Assay wurde je Konzentration (0,1µg/ml; 10µg/ml; 100µg/ml) mit vier verschiedenen Inkubationsdauern mit Zinkoxid-Nanopartikeln und jeweiliger Negativ-Kontrolle ohne Nanopartikelzugabe zu ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst in acht Mini-Zellkulturflaschen aufgeteilt, nämlich 4 Stunden Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikel bzw. ohne ZnO-Nanopartikel, 1 Stunde Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikel bzw. ohne ZnO-Nanopartikel, 15 Minuten Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikel bzw. ohne ZnO-Nanopartikel und 0 Minuten Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikel bzw. ohne ZnO-Nanopartikel.

Anschließend erfolgte eine Aufteilung der Zellkulturflaschen mit den unterschiedlichen Inkubationsdauern in je vier weitere Behandlungsarme entsprechend der geplanten Bestrahlungsdosis von 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 8 Gy, sodass es zu diesem Zeitpunkt insgesamt 32 unterschiedliche Behandlungsarme gab. Die Bestrahlung der Tumorzellen erfolgte in konischen Zentrifugenröhrchen (Falcon™) im abgelösten Zustand.

Zuletzt wurde das Volumen (10ml) der 32 Falcons zu gleichen Teilen auf jeweils zwei Mini-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Somit ergab sich insgesamt eine Anzahl von 64 Zellkulturflaschen pro Ansatz.

Die folgende Abbildung 3.2 zeigt das Behandlungsschema in vereinfachter, skizzierter Form.

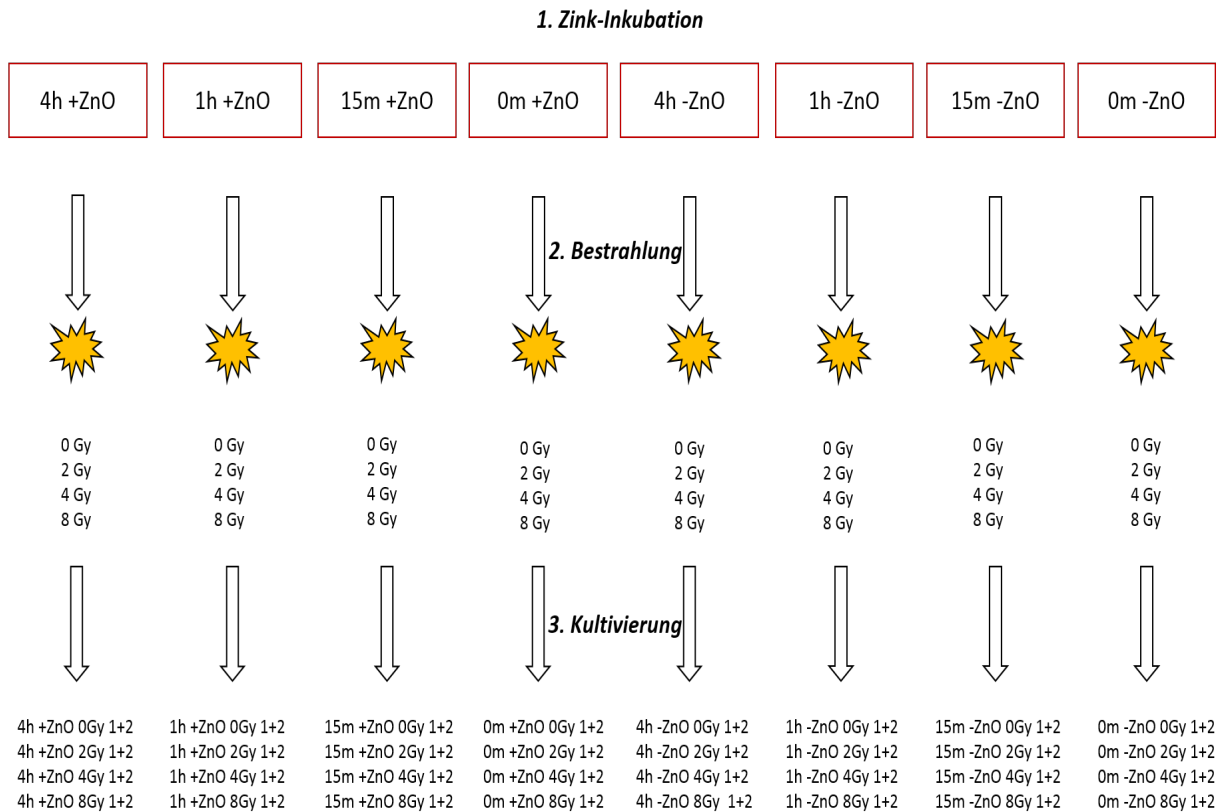


Abb. 3. 2 Skizziertes Behandlungsschema des Kolonie-Assays. 1. Proben mit (+) Zink-Inkubation von je 0 Minuten, 15 Minuten, 1 Stunde und 4 Stunden und Proben ohne (-) Zink-Inkubation von je 0 Minuten, 15 Minuten, 1 Stunde und 4 Stunden. 2. Bestrahlung der Proben mit einer Dosis von 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 8 Gy. 3. Kultivierung der Zellkulturflaschen mit Aussaat der unterschiedlich behandelten Zellen zu jeweils 2 gleichen Proben.

3.2.3.2 Zellaussaat

Zwei Tage vor der Durchführung des Kolonie-Assays wurden die Zellen der A549 Zelllinie passagiert und in 8 Mini-Zellkulturflaschen ausgesät. Dazu wurde das Zellkulturmedium dekantiert und der Zellrasen mit 6ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 4ml Trypsin/EDTA auf die Zellkultur gegeben, sodass der Flaschenboden vollständig bedeckt war. Dann erfolgte die Inkubation der Zellkulturflasche für 5 Minuten im Brutschrank, um das Temperaturoptimum der Enzymreaktion zu gewährleisten.

Danach wurden alle Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden gelöst und die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von 6ml Zellkulturmedium gestoppt. Das gesamte Volumen wurde in ein 15ml-Falcon überführt und im Anschluss für 6 Minuten bei 1400U/min zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in frischem Medium erfolgte die Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauerzählkammer, sodass pro Mini-

Zellkulturflasche ca. 600.000 Zellen ausgesät werden konnten. Zum Schluss wurden die Zellen wieder im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.2.3.3 ZnO-Nanopartikelinkubation

Nach 2 Tagen wurden die zuvor ausgesäten Zellen unterschiedlich lange mit Zinkoxid-Nanopartikeln inkubiert, nämlich 0 Minuten, 15 Minuten, 1 Stunde und 4 Stunden. Dazu wurden die Nanopartikel zunächst mithilfe der Ultrafeinwaage abgewogen und je Gewicht und Zielkonzentration (0,1µg/ml; 10µg/ml; 100µg/ml) mit Millipore verdünnt. Anschließend erfolgte die Dispergierung der Proben für 5 Minuten im Ultraschallbad, bis die Suspension milchig-trüb erschien.

Entsprechend der oben angegebenen Zielkonzentration der Nanopartikel, wurden diese mit Zellkulturmedium verdünnt und auf die zwei Tage zuvor ausgesäten Zellen pipettiert. Die dazugehörigen Negativkontrollen ohne Zinkoxid-Nanopartikel erfolgten durch Verdünnung der entsprechenden Menge Millipore mit Zellkulturmedium und anschließender Gabe auf den Zellrasen. Danach kamen die Zellkulturflaschen je nach Inkubationsdauer für 4 Stunden, 1 Stunde oder 15 Minuten in den Brutschrank. Lediglich die 0 Minuten-Proben wurden direkt gewaschen und gelöst.

Dazu wurde das Medium (mit/ ohne Zinkoxid-Nanopartikel) abpipettiert und die Zellkulturflaschen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde hier Accutase® verwendet, da es sensitiver ist und das Stresslevel der behandelten Zellen nicht stark erhöht. Ansonsten wurde wie in 3.2.3.2 verfahren. Die Zellkulturflaschen wurden für 5 Minuten in den Brutschrank gestellt und anschließend durch leichtes Beklopfen vom Flaschenboden gelöst. Im Anschluss wurde der Boden mit Zellkulturmedium gespült und die gesamte Zellsuspension in ein Falcon überführt. Mit den anderen Proben wurde analog verfahren.

3.2.3.4 Bestimmung der Zellvitalität durch CASY TT® und Bestrahlung

In 8 CASY-Tubes wurden je 10ml CASY-Ton vorgelegt und anschließend je 400µl der Zellsuspension hinzugegeben, sodass ein Verhältnis von 25:1 entstand. Mittels der Software CASY TT® konnte dann die Vitalzellzahl/ ml bzw. die Vitalität der untersuchten Probe in Prozent bestimmt werden. Anhand der errechneten Vitalzellzahl erfolgten entsprechende Zwischenverdünnungen, damit die gewünschte Zielzellzahl für die jeweilige Bestrahlungsdosis erreicht wurde (*siehe Tab. 3.7*). Letztlich wurden

die 32 zu bestrahlenden Falcons mit der entsprechenden Zellzahl befüllt und mit 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy oder 8 Gy bestrahlt. Der Transport aller Falcons, einschließlich der unbestrahlten Kontrollen, zur Bestrahlungsquelle erfolgte in einem Styropor-Isolierbehälter.

	0 Gy -ZnO	0 Gy +ZnO	2 Gy -ZnO	2 Gy +ZnO	4 Gy -ZnO	4 Gy +ZnO	8 Gy -ZnO	8 Gy +ZnO
0 Min	12000	18000	12000	18000	12000	24000	18000	72000
15 Min	12000	18000	12000	18000	12000	24000	18000	72000
1 h	12000	18000	12000	18000	12000	24000	18000	72000
4 h	12000	24000	12000	72000	12000	72000	18000	72000

Tab. 3. 7 Zielzellzahl der 32 zu bestrahlenden Falcons. Bestrahlungsdosis: 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy. Ohne Zink: -ZnO. Mit ZnO: +ZnO. Inkubationszeit: 0 Min, 15 Min, 1 h, 4 h.

3.2.3.5 Kultivierung

Zum Schluss wurde die Zellsuspension der 32 bestrahlten bzw. nicht bestrahlten Falcons auf je zwei Mini-Zellkulturflaschen aufgeteilt (Probe 1, Probe 2). Die Inkubation der 64 Flaschen erfolgte dann für 10 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Anzahl der erforderlichen Zelleinsaaten sind in Vorversuchen ermittelt worden.

		0 Gy -ZnO	0 Gy +ZnO	2 Gy -ZnO	2 Gy +ZnO	4 Gy -ZnO	4 Gy +ZnO	8 Gy -ZnO	8 Gy +ZnO
0 Min	1	6000	9000	6000	9000	6000	12000	9000	36000
	2	6000	9000	6000	9000	6000	12000	9000	36000
15 Min	1	6000	9000	6000	9000	6000	12000	9000	36000
	2	6000	9000	6000	9000	6000	12000	9000	36000
1 h	1	6000	9000	6000	9000	6000	12000	9000	36000
	2	6000	9000	6000	9000	6000	12000	9000	36000
4 h	1	6000	12000	6000	36000	6000	36000	9000	36000
	2	6000	12000	6000	36000	6000	36000	9000	36000

Tab. 3. 8 Ausgesäte Zellzahl der 64 zu kultivierenden Mini-Zellkulturflaschen. Bestrahlungsdosis: 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy. Ohne Zink: -ZnO. Mit ZnO: +ZnO. Inkubationszeit: 0 Min, 15 Min, 1 h, 4 h.

3.2.3.6 Fixieren und Färben

Nach 10 Tagen wurde die weitere Proliferation der Zellen gestoppt und die gebildeten Kolonien mit Giemsa-Farbstoff eingefärbt und so sichtbar gemacht.

Dazu wurden zunächst das Medium abgekippt und die Flaschen jeweils 2x mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Zellen durch ein Aceton/ Ethanol-Gemisch im Verhältnis von 1:1 fixiert. Die Einwirkzeit betrug 5 Minuten. Danach wurden die Flaschen erneut 2x mit Leitungswasser gespült und zum Trocknen über Nacht unter den Rauchabzug gestellt.

Zum Färben wurde 10%-Giemsa-Lösung (filtriert) verwendet. Die Einwirkzeit betrug hier 10 Minuten. Nach Dekantieren des Farbstoffes wurden die Zellkulturflaschen 2x mit Leitungswasser und 1x mit destilliertem Wasser gespült.

Nach vollständigem Trocknen der Zellkulturflaschen konnte die Koloniezahl dann mittels des Colcount-Scanners bestimmt werden.

3.2.4 Auswertung des Kolonie-Assays

3.2.4.1 Bestimmung der Koloniezahl mittels des Colcount-Scanners

Die Anzahl der Kolonien in den Zellkulturflaschen konnte mithilfe des Colcount-Scanners ermittelt werden, da dieser die angefärbten Kolonien am Flaschenboden erkennt und automatisch bestimmt. Dazu wurde zunächst jede Flasche mit einem Terralin®-getränktem Tuch gereinigt, um das Messergebnis nicht durch an der Flasche anhaftende Artefakte zu verfälschen. Auf eine zusätzliche manuelle Korrektur der automatisierten Messung wurde verzichtet, da wir davon ausgingen, dass sich fehlinterpretierte Kolonien und nicht-erkannte Kolonien ausgleichen.

Die folgende Abbildung 3.3 zeigt eine beispielhafte Auswertung einer Zellkulturflasche mittels des Colcount-Scanners.

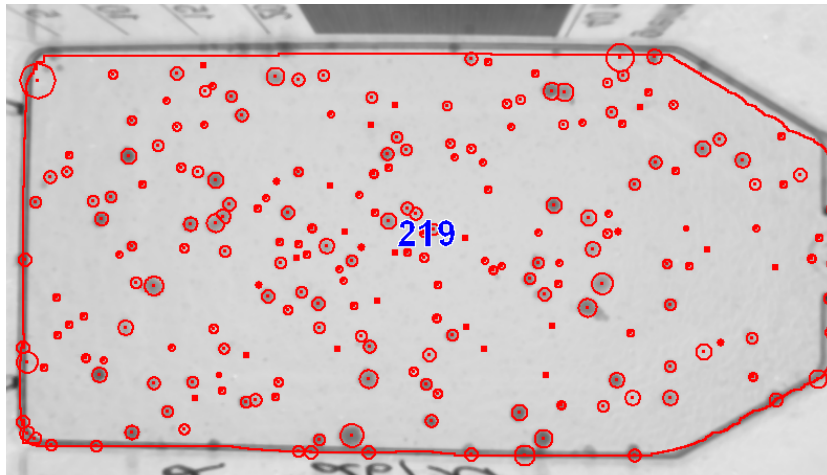


Abb. 3. 3 Beispielhafte Auswertung mittels Colcount-Scanner (13. Ansatz: 8 Gy, kein ZnO, 1h, 2). Die gezählten Kolonien sind rot markiert und der gesamte Flaschenboden ist rot umrandet. Die Anzahl der gezählten Kolonien (*hier*: 219) ist mittig in blauer Schrift angegeben.

3.2.4.2 Bestimmung der Überlebensfraktion

Die Bestimmung der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) dient als Maßzahl für das Zellüberleben einer Population nach Behandlung. Sie setzt die behandelten Proben innerhalb eines Ansatzes in Bezug zu der jeweiligen nicht behandelten Kontrolle, sprich die Probe ohne ZnO-Nanopartikel und ohne Bestrahlung (0 Gy, kein ZnO, 0 min, Probe 1 und 0 Gy, kein ZnO, 0min, Probe 2). Die Kontrolle wurde, wie die gesamten Proben, ebenfalls in zweifacher Ausführung angefertigt, um extreme Schwankungen innerhalb der Messungen zu vermeiden und genauere Werte anzugeben.

Die Überlebensfraktion der A549-Zellen wurde mittels Excel anhand der durch den Colcount-Scanner erhobenen Daten unter Verwendung folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Mean Counts (behandelt)} \times \text{Cells plated (Kontrolle)}}{\text{Cells plated (behandelt)} \times \text{Mean Counts (Kontrolle)}} = \text{surviving fraction}$$

Abb. 3. 4 Formel zur Berechnung der *Surviving Fraction*. Aus dem Quotienten der gezählten Koloniezahl (Mean Counts) und der ausgesäten Zellen (Cells plated) kann die Platteneffizienz (plating efficiency = PE) berechnet werden. Die *Surviving Fraction* lässt sich durch Normierung der Platteneffizienz der behandelten Zellen über die Platteneffizienz der Kontrollen ermitteln.

3.2.5 Untersuchung der Zellmorphologie

Zur Untersuchung morphologischer Veränderungen der Tumorzellen nach einstündiger Nanopartikelinkubation und anschließender fraktionierter Bestrahlung wurden unter dem Mikroskop Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung angefertigt.

Es wurden Zellen der Linie A549 verwendet. Für den Versuch wurden 600.000 Zellen/ 5 ml in zwölf Mini-Zellkulturflaschen ausgesät und zwei Tage im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Am dritten Tag wurden die Nanopartikel in den bekannten Konzentrationen 0,1µg/ml, 10µg/ml und 100µg/ml auf die Zellen appliziert. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellkulturflaschen mit PBS gewaschen und ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen fünf Tage lang (bis einschließlich Tag 7) täglich mit 0 Gy bzw. 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt, was Gesamtstrahlendosen von 0 Gy bzw. 10 Gy oder 20 Gy ergab. Nach Beendigung der Behandlung wurden die Zellkulturflaschen unter dem Mikroskop morphologisch untersucht und entsprechende Bildausschnitte in 20-facher Vergrößerung festgehalten.

3.2.6 Durchführung des CAM-Assays

3.2.6.1 Inkubation der Eier

Für die Versuche wurden weiße Eier des Leghorn Huhns verwendet. Die Lieferung der Eier erfolgte an Tag 0 des Experiments. Noch am selbigen Tag wurden die Eier sortiert, beschädigte Eier entsorgt, grobe Schmutzreste entfernt und die Eier mit dem spitzen Pol nach oben im Karton aufgestellt. Im Anschluss kamen die Eier für 10 Tage in den Inkubator bei 37°C und 60% relativer Feuchte.

3.2.6.2 Öffnen der Eier

Das Öffnen der Eier erfolgte an Tag 10 nach der Lieferung. Bevor die Eier am spitzen Pol geöffnet werden konnten, wurde die Schale mit 70%-er Ethanol-Lösung vorsichtig von restlichen Schmutzpartikeln befreit und anschließend der obere Pol mit Leukosilk abgeklebt, um der porösen Eierschale mehr Stabilität zu verleihen. Dann erfolgte die Inzision mit einem Skalpell der Größe 11, um die anschließende kreisförmige

Eröffnung (Durchmesser 10mm) der Eierschale mit einer Schere zu erleichtern. Nicht erfolgreich befruchtete Eier wurden sofort verworfen und entsorgt.

Die folgende Abbildung 3.5 zeigt ein befruchtetes Ei mit einer gut ausgebildeten Chorioallantoismembran und dem bereits differenzierten Embryo:

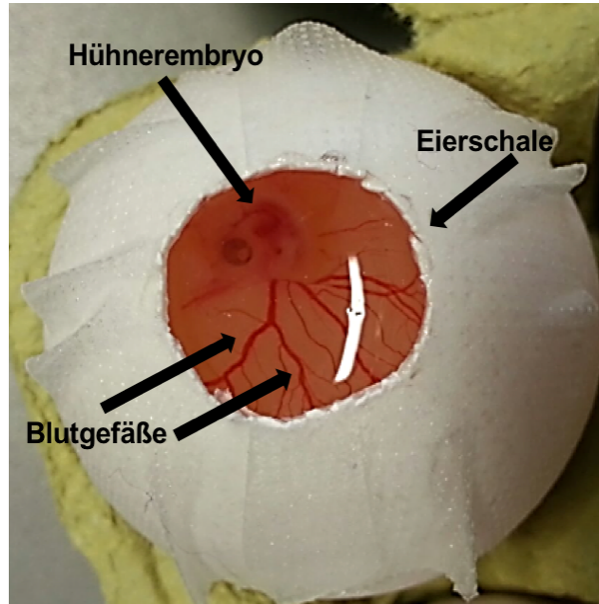


Abb. 3.5 Blick in ovo auf die Blutgefäße der CAM und den Hühnerembryo an Tag 10. Man sieht ein befruchtetes Ei mit einer gut ausgebildeten Chorioallantoismembran und dem bereits differenzierten Embryo.

3.2.6.3 Aufbringen der Tumorzellen

Direkt im Anschluss an das Öffnen der Eier erfolgte das Anbringen der Tumorzellen der Zelllinie A549. Dazu wurden die Zellen zunächst wie in 3.2.3.2 beschrieben aus der Zellkultur gelöst und letztlich in frischem Medium resuspendiert, sodass eine Konzentration von 1.000.000 Zellen/ 10 μ l entstand. Anschließend wurden 1.000.000 Zellen pro Ei entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 10 μ l Matrigel pro Ei vermischt, sodass eine Zielkonzentration von 1.000.000 Zellen/ 20 μ l entstand.

Um die Tumorzellen lokal begrenzen zu können, erfolgte zunächst mithilfe einer Pinzette die Platzierung eines Silikonrings mit einem Durchmesser von 6,4mm auf der Chorioallantoismembran. Anschließend wurden insgesamt 1.000.000 Tumorzellen bzw. ein Volumen von 20 μ l in den Silikonring pipettiert und die ovale Öffnung in der Eierschale letztlich unter Verwendung von Parafilm® verschlossen. Dann erfolgte die weitere Inkubation der beimpften Eier für 2 Tage.

Die folgende Abbildung 3.6 zeigt einen erfolgreich implantierten Tumor auf der Oberfläche der Chorioallantoismembran an Tag 12:

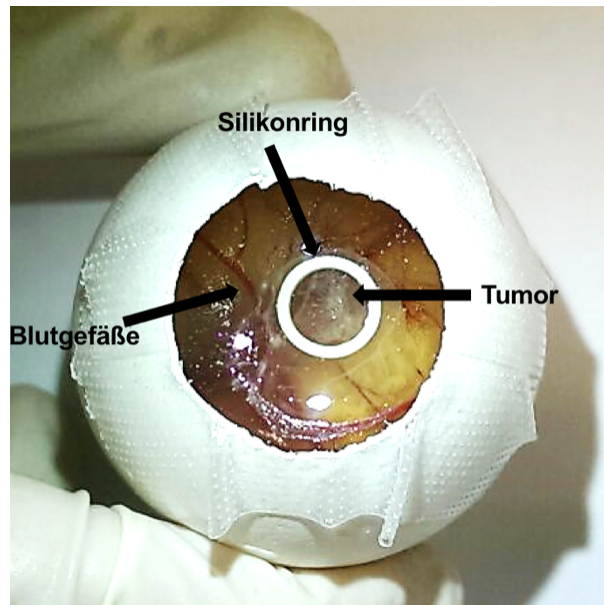


Abb. 3.6 Blick in ovo auf die Blutgefäße der CAM und den Tumor an Tag 12. Der Bereich der implantierten Tumorzellen (A549) ist durch einen 6,4mm durchmessenden Silikonring markiert.

3.2.6.4 Fixieren und Färben der CAM

An Tag 12 erfolgte die Präparation des Tumors. Dazu wurde mithilfe einer Schere die Chorioallantoismembran rund um den implantierten Silikonring herausgeschnitten und das Gewebe mit einer Pinzette in eine zuvor mit Filterpapier ausgelegte Einbettkassette überführt. Anschließend wurden die Kassetten verschlossen und die Präparate über Nacht in einer Küvette mit 4% gepufferter Formalin-Lösung fixiert. Die Herstellung der Paraffinschnitte und histologische Aufarbeitung erfolgte mit der freundlichen Unterstützung von [REDACTED].

3.2.6.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nachdem die zuvor angefertigten Paraffinschnitte entparaffiniert wurden, erfolgte die HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) der Präparate mit Hämalaun nach Mayer (1:1) und Eosin 0,5%. Nach standardisierter Färbung erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung. Diese Färbetechnik ermöglicht eine erste Orientierung. Zellkerne stellen sich blau und Zytoplasma rosa gefärbt dar.

3.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Statistik-Software SPSS Version 23 (IBM® SPSS Statistics®). Die Versuche wurden je Konzentration (0,1µg/ml; 10µg/ml; 100µg/ml) der ZnO-Nanopartikel fünf Mal reproduziert, sodass insgesamt 15 Versuchsansätze vorliegen. Mittels Excel wurde die *Surviving Fraction* für jede Probe nach unter Abbildung 3.4 genannter Formel berechnet. Um herauszufinden, ob es einen Einfluss auf das Zellüberleben (gemessen an der *Surviving Fraction*) abhängig von den verschiedenen Effektgrößen gibt, wurde eine multiple lineare Regression durchgeführt. Das Konzept dieser Untersuchung basiert auf der Grundlage der einfachen Regression. Das Regressionsmodell wird durch die Regressionskoeffizienten beschrieben. Jede unabhängige Variable erhält einen Regressionskoeffizienten. Die Formel zur Berechnung der linearen Regression sieht wie folgt aus:

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \dots + \beta_k \cdot x_k + \varepsilon_i$$

Surviving fraction =

$$\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Konzentration} + \beta_2 \cdot \text{Inkubationszeit} + \beta_3 \cdot \text{Bestrahlungsdosis} + \varepsilon_i$$

Abb. 3.7 Formel der Linearen Regression. Übertragene Formel auf die getestete abhängige Variable und die unabhängigen Variablen: $y = \text{Surviving Fraction}$; $x_1 = \text{ZnO-NP-Konzentration}$; $x_2 = \text{ZnO-NP-Inkubationszeit}$; $x_3 = \text{Bestrahlungsdosis}$

Die unterschiedlichen Effektgrößen Konzentration, Inkubationsdauer und Bestrahlungsdosis wurden anschließend genauer mittels Nicht-parametrischer-Tests, dem Kruskal-Wallis-Test, als Äquivalent der einfaktoriellen Varianzanalyse bei unabhängigen Stichproben, untersucht. Um zu untersuchen, welche Gruppen sich innerhalb der unabhängigen Variablen unterscheiden, wurden Post-hoc-Tests nach Dunn-Bonferroni durchgeführt. So ist ein Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen möglich und es kann eine Aussage getroffen werden, ab wann jeweils signifikante Veränderungen erreicht werden können. Die errechneten p-Werte wurden an das multiple Testen adjustiert.

Ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ werden Unterschiede als „statistisch signifikant“ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Kolonie-Assay

In dem folgenden Teil meiner Doktorarbeit soll die zeit- und dosisabhängige *in vitro*-Toxizität von Zinkoxid-Nanopartikeln in Kombination mit ionisierender Bestrahlung untersucht und ausgewertet werden. Ziel ist die Klärung der Frage, ob eine Steigerung der Bestrahlungseffizienz durch eine vorherige ZnO-Nanopartikelbehandlung der Tumorzellen möglich ist.

Die Untersuchung der Therapieeffizienz erfolgte mittels Kolonie-Assay und der Auswertung des relativen Zellüberlebens. Die Versuche wurden je Konzentration der Zinkoxid-Nanopartikel (0,1µg/ml; 10µg/ml; 100µg/ml) mit vier verschiedenen Inkubationsdauern (0 Minuten, 15 Minuten, 1 Stunde und 4 Stunden) und jeweiliger Negativ-Kontrolle ohne Nanopartikelzugabe zu gleichen Bedingungen durchgeführt. Anschließend blieben die Zellen entweder unbestrahlt (0 Gy) oder wurden mit 2 Gy, 4 Gy oder 8 Gy bestrahlt. Die Experimente wurden für jede Konzentrationsreihe (0,1µg/ml; 10µg/ml; 100µg/ml) 5-fach wiederholt und stets in Duplikaten durchgeführt. Ob durch die additive Behandlung der Tumorzellen mit ZnO-Nanopartikeln der Effekt der Bestrahlung verstärkt werden kann, wurde anhand der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) der Tumorzellen nach 10 Tagen getestet und verglichen.

Als Kontrolle dienten innerhalb eines Ansatzes die jeweils unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt T0 (= 0 Gy, kein ZnO, 0 min). Diese wurde gleich 1 gesetzt (= 100%) und die übrigen Überlebensfraktionen für jede Probe auf diese Kontrolle bezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics® Version 23. Es wurde eine lineare Regression durchgeführt. Die drei unterschiedlichen Effektgrößen Konzentration, Inkubationsdauer und Bestrahlungsdosis wurden mittels Nicht-parametrischer Tests, dem Kruskal-Wallis-Test, als Äquivalent der einfaktoriellen Varianzanalyse bei unabhängigen Stichproben, analysiert. Die errechneten p-Werte wurden schließlich an das multiple Testen adjustiert.

Detailliertere Angaben zu den verwendeten statistischen Verfahren, sowie die Formeln zur Berechnung sind unter Kapitel 3.2.7 Statistische Auswertung (*Seite 42*) zu finden.

4.1.1 Untersuchung der Einflussfaktoren Nanopartikel-Konzentration, Inkubationszeit und Bestrahlung mittels multipler linearer Regression

Zur Untersuchung der Fragestellung ob und wie stark die unabhängigen Variablen ZnO-Nanopartikel-Konzentration, -Inkubationsdauer und Bestrahlungsdosis die abhängige Variable *Surviving Fraction* beeinflussen, wurde eine multiple Regression durchgeführt. Zur Überprüfung der Signifikanz des Regressionsmodells wurde ein F-Test angewendet ($F(3, 476) = 192.270, p < 0,01$). Das Modell ist signifikant.

Lineare Regression

	<u>ZnO-NP Konzentration [µg/ml]</u>	<u>ZnO-NP Inkubationszeit [h]</u>	<u>Bestrahlungsdosis [Gy]</u>
p-Wert	.000	.000	.000
T-Test	-5.917	-5.592	-22.595
β	-.002	-.039	-.085

Tab. 4. 1 Ergebnisse der Multiplen Linearen Regression.

Mit Hilfe der Linearen Regression wurden die Effekte der Einflussgrößen ZnO-Nanopartikel-Konzentration, ZnO-Nanopartikel-Inkubationszeit und Bestrahlungsdosis auf die abhängige Variable *Surviving Fraction* untersucht. Berechnung von p-Werten (Signifikanzniveau $p < 0,05$). Berechnung der Regressionskoeffizienten β .

Die Regressionskoeffizienten β der ZnO-Nanopartikel-Konzentration ($\beta = -.002, p < 0,001$), der ZnO-Nanopartikel-Inkubationszeit ($\beta = -.039, p < 0,001$) und der Bestrahlungsdosis ($\beta = -.085, p < 0,001$) weisen alle ein negatives Vorzeichen auf. Daraus lässt sich ableiten, dass die *Surviving Fraction* um 0,2% sinkt, wenn die Konzentration um 1µg/ml steigt, sofern die übrigen unabhängigen Variablen konstant bleiben. Diesem Prinzip entsprechend sinkt die *Surviving Fraction* um 3,9%, wenn die Inkubationszeit um eine 1 Stunde steigt und um 8,5%, wenn die Bestrahlungsdosis um 1 Gray steigt.

Das korrigierte Bestimmtheitsmaß (R-Quadrat) beträgt 0.545. Es können also 54,5% der Gesamtstreuung der Überlebensfraktion durch die unabhängigen Variablen Konzentration, Inkubationszeit und Bestrahlungsdosis erklärt werden, was sich nach Cohen mit einem starken Effekt deckt (Cohen, 1988).

Effektstärke nach Cohen:

$$f = \sqrt{\frac{R^2}{1 - R^2}} = \sqrt{\frac{R}{1 - R}} = \sqrt{\frac{0.545}{1 - 0.545}} = 1.09$$

Abb. 4. 1 Formel nach Cohen zur Berechnung der Effektstärke.

Die Effektstärke nach Cohen (f) kann wie folgt eingeteilt werden: klein: f = 0,10; mittel: f = 0,25; hoch: f = 0,40. f = 1.09 entspricht damit einer hohen Effektstärke.

4.1.2 Der Einfluss der Bestrahlungsdosis auf die Überlebensfraktion

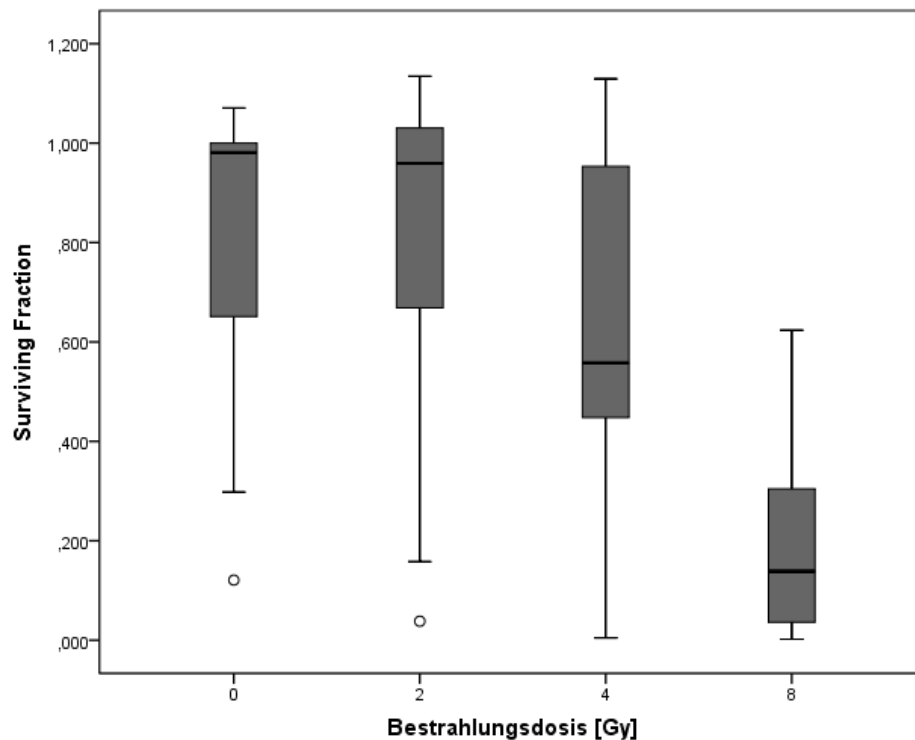


Abb. 4. 2 Boxplots zur Illustration des Einflussfaktors Bestrahlung auf die Überlebensfraktion der Zellen, dargestellt als *Surviving Fraction* (nGesamt = 480). Mit steigender Bestrahlungsdosis sinkt die Überlebensfraktion, ab einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy sinkt sie signifikant. Median: 0 Gy = 0,98; 2 Gy = 0,96; 4 Gy = 0,56; 8 Gy = 0,14. Bei den mittleren Bestrahlungsdosen von 2 Gy und 4 Gy ist eine stärkere Streuung erkennbar. Jeweils ein Ausreißer bei 0 Gy und 2 Gy.

Für den Einflussfaktor Bestrahlung bestätigt der Kruskal-Wallis-Test, dass die Bestrahlungsdosis das Zellüberleben senkt. Die Post-hoc-Tests zeigen ab einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy eine signifikante Abnahme der Überlebensfraktion gegenüber den niedrigeren Bestrahlungsdosen von 0 Gy ($z = 3,650$, $p = 0,002$) und 2 Gy ($z = 3,805$, $p = 0,001$). Der Unterschied zwischen den niedrigeren Bestrahlungsdosen von 0 Gy und 2 Gy ist nicht signifikant ($z = -0,155$, $p > 0,05$). Bei der höchsten angewandten Bestrahlungsdosis von 8 Gy nimmt die Überlebensfraktion

gegenüber allen anderen Bestrahlungsdosen von 0 Gy ($z = 13,318$, $p < 0,001$), 2 Gy ($z = 13,473$, $p < 0,001$) und 4 Gy ($z = 9,668$, $p < 0,001$) signifikant ab.

4.1.3 Der Einfluss der ZnO-Nanopartikel-Konzentration auf die Überlebensfraktion

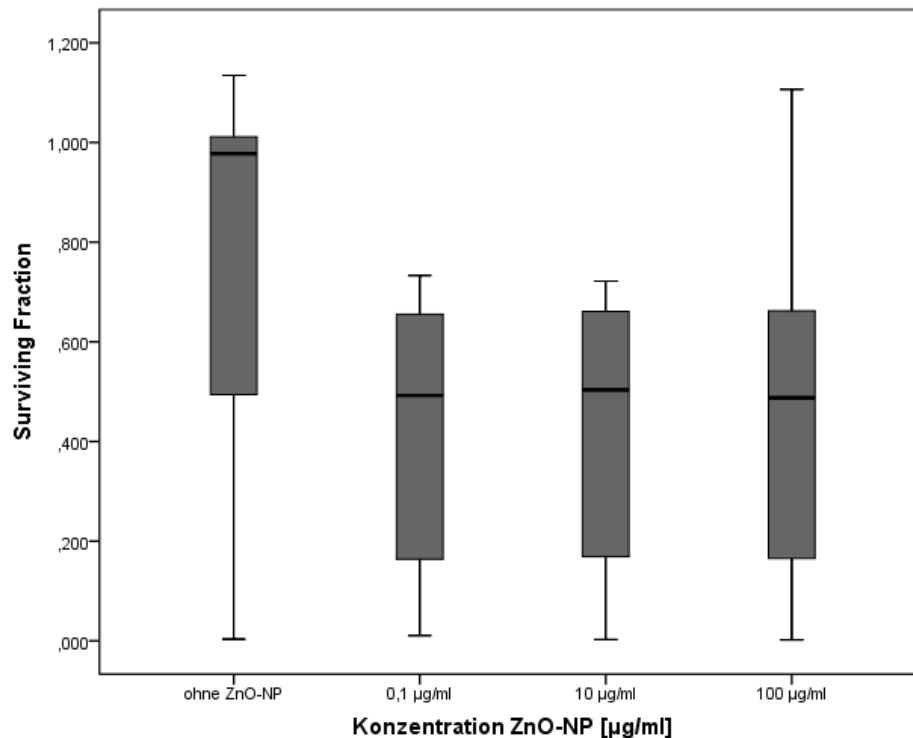


Abb. 4. 3 Boxplots zur Illustration des Einflussfaktors Konzentration auf die Überlebensfraktion der Zellen, dargestellt als *Surviving Fraction* ($n_{\text{Gesamt}} = 480$). Alle angewandten Konzentrationen der ZnO-Nanopartikel (0,1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) zeigen gegenüber der Kontrollgruppe ohne ZnO-Nanopartikel eine signifikante Abnahme der Überlebensfraktion. Median: Ohne ZnO-NP = 0,98; 0,1 µg/ml ZnO-NP = 0,49; 10 µg/ml ZnO-NP = 0,50; 100 µg/ml = 0,49. Keine Ausreißer.

Für den Einflussfaktor Konzentration zeigt der Kruskal-Wallis-Test, dass alle untersuchten ZnO-Konzentrationen das Zellüberleben gegenüber der Kontrolle senken. Die Post-Hoc-Tests ergeben, dass die vorherige Behandlung mit ZnO-Nanopartikeln für die Konzentrationen 0,1µg/ml ($z = 7,731$, $p < 0,001$), 10µg/ml ($z = 7,578$, $p < 0,001$) und 100µg/ml ($z = 6,081$, $p < 0,001$) eine signifikante Abnahme der Überlebensfraktion gegenüber der Kontrollgruppe ohne ZnO-Nanopartikel bewirkt. In der Kontrollgruppe ohne ZnO-Nanopartikel und in der Gruppe mit der höchsten angewandten ZnO-Nanopartikel-Konzentration von 100µg/ml ist eine größere Streuung zu erkennen.

4.1.4 Der Einfluss der ZnO-Nanopartikel-Inkubationszeit auf die Überlebensfraktion

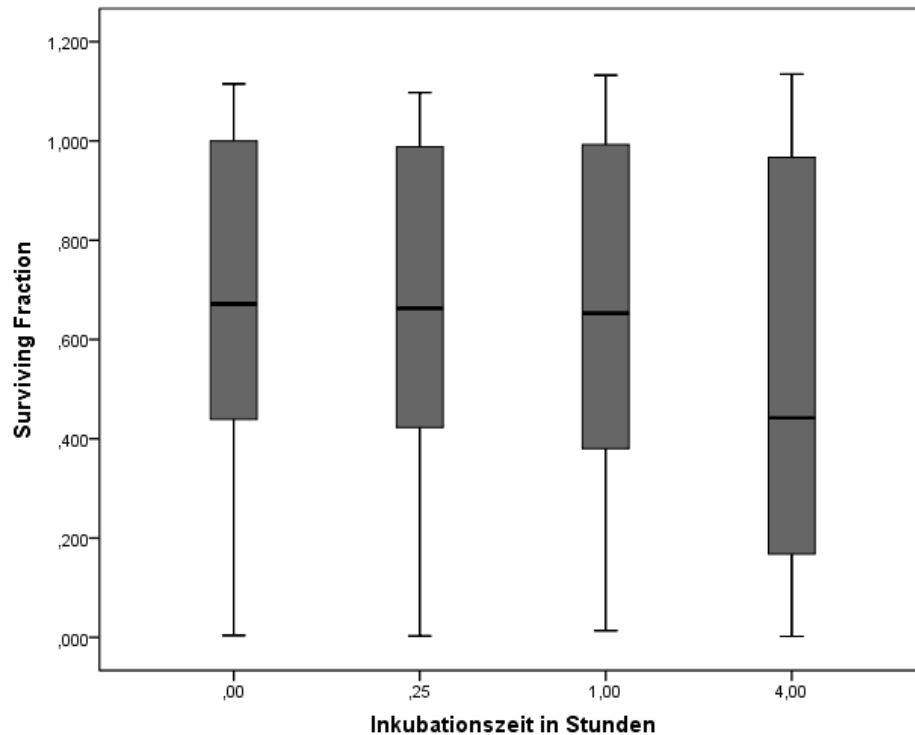


Abb. 4. 4 Boxplots zur Illustration des Einflussfaktors Inkubationszeit mit ZnO-Nanopartikeln auf die Überlebensfraktion der Zellen, dargestellt als *Surviving Fraction* (nGesamt = 480). Die Auswirkungen auf das Zellüberleben unterscheiden sich zwischen den Inkubationszeiten 0 Minuten (Median = 0,67), 15 Minuten (Median = 0,66) und 1 Stunde (Median = 0,65) nicht wesentlich. Erst ab einer Inkubationszeit mit ZnO-Nanopartikeln von 4 Stunden (Median = 0,44) nimmt die Überlebensfraktion signifikant ab. Keine Ausreißer.

Im Hinblick auf den Effekt der Inkubationszeit mit ZnO-Nanopartikeln auf die Überlebensfraktion der Zellen zeigt der Kruskal-Wallis-Test, dass erst bei einer Inkubationsdauer von 4 Stunden das Zellüberleben signifikant gegenüber den anderen angewandten Inkubationszeiten von 0 Minuten ($z = 3,130$, $p = 0,010$), 15 Minuten ($z = 2,742$, $p = 0,037$) und 1 Stunde ($z = 2,753$, $p = 0,035$) gesenkt wird. Zwischen den Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten und 1 Stunde gibt es keine wesentlichen Unterschiede in ihrem Einfluss auf das Zellüberleben ($p > 0,05$). Die Streuung ist für alle Inkubationszeiten annähernd gleich.

4.1.5 Evaluation der Strahleneffizienz in der kombinierten Behandlung mit Nanopartikeln

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass sowohl für die unbestrahlten Zellen als auch für die bestrahlten Zellen eine verstärkte Reduktion des Zellüberlebens durch die vorherige Inkubation mit Nanopartikeln erzielt wird. Dabei ist zwischen den verschiedenen Konzentrationen der Nanopartikel kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Aus den Abbildungen geht hervor, dass nach 4-stündiger ZnO-Inkubation der Tumorzellen das Überleben bei steigender Strahlendosis weitgehend unabhängig von der ZnO-Konzentration sinkt. Durch eine Erhöhung der Konzentration von 0,1µg/ml ZnO-NP auf bis zu 100µg/ml ZnO-NP wird also keine signifikante Effizienzsteigerung erreicht (Abb. 4.5). Insgesamt ist der supportive Effekt der Nanopartikel bei den mittleren Bestrahlungsdosen von 2 Gy und 4 Gy deutlicher zu erkennen, als bei einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy. Bei einer Konzentration von 100µg/ml ZnO-NP und einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy wird eine Reduktion des Zellüberlebens um bis zu 90% erzielt; bei 8 Gy sogar nahezu 100%. Bei Betrachtung der Inkubationsdauer fällt auf, dass ab einer Inkubation von 4 Stunden eine deutliche Verringerung des Tumorzellüberlebens erzielt werden kann. Die Inkubationszeiten von 0 Minuten, 15 Minuten und 1 Stunde unterscheiden sich kaum voneinander.

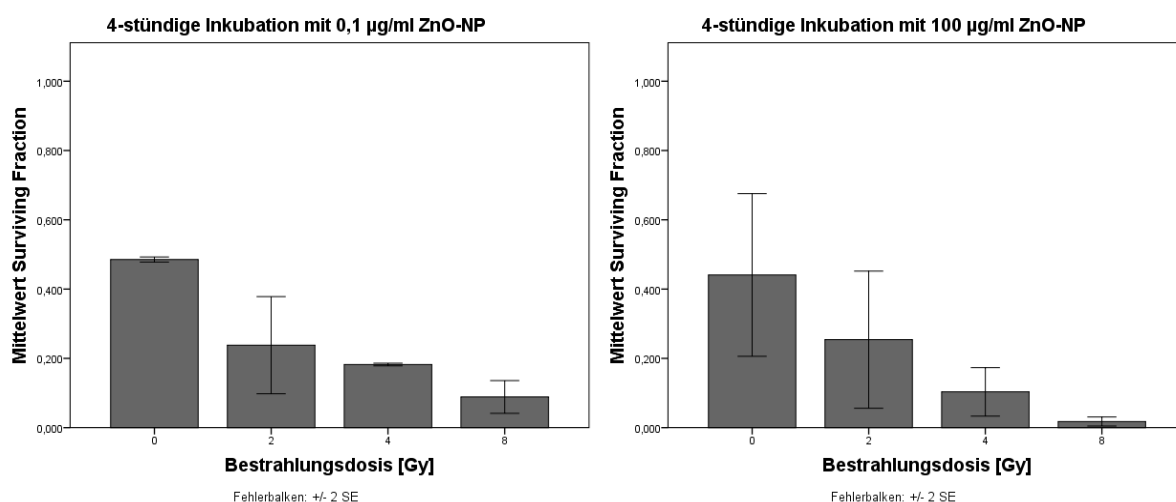


Abb. 4.5 Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) der A 549-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 0,1µg/ml (links) und 100µg/ml (rechts) ZnO-NP aufgetragen gegen die Bestrahlungsdosis. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der *Surviving Fraction* bei einer 4-stündigen Inkubation mit 0,1µg/ml ZnO-NP und einer 4-stündigen Inkubation mit 100µg/ml ZnO-NP zu erkennen.

4.1.5.1 Veränderung der Überlebensfraktion abhängig von Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel ohne anschließende Bestrahlung

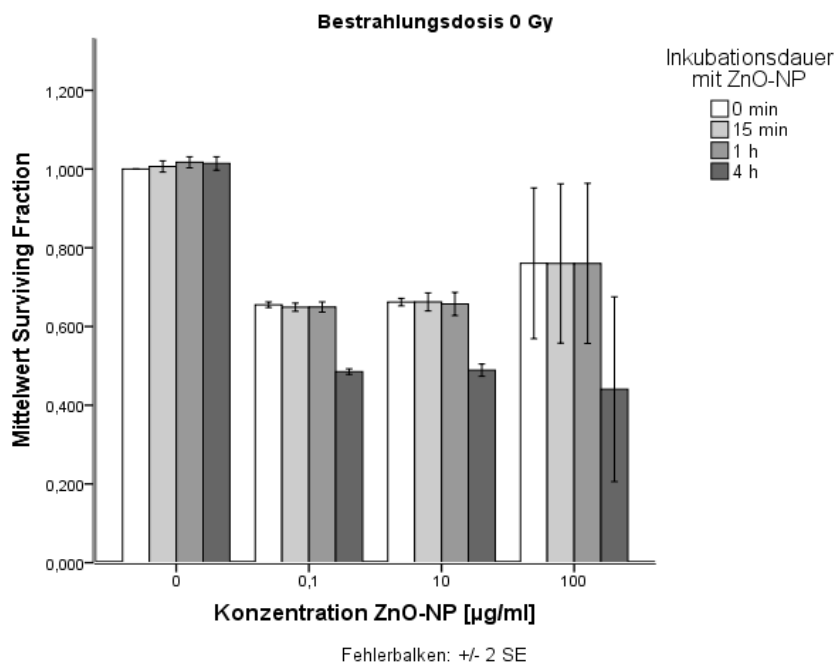


Abb. 4. 6 Einfluss der Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel auf die Mittelwerte der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) ohne anschließende Bestrahlung. (Mittelwerte, Fehlerbalken +/- 2 SE; Rohwerte siehe Anhang 8.9 Auswertung Colcount-Scanner und Berechnungen)

Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf Inkubationszeit & Konzentration ohne Bestrahlung

Inkubation	Konzentration			
	<u>0 µg/ml</u>	<u>0.1 µg/ml</u>	<u>10 µg/ml</u>	<u>100 µg/ml</u>
0 min	100,00% (+/- 0,00)	65,50% (+/- 0,35)	66,20% (+/- 0,50)	76,10% (+/- 9,59)
15 min	100,65% (+/- 0,71)	64,90% (+/- 0,51)	66,30% (+/- 1,15)	76,00% (+/- 10,11)
1 h	101,72% (+/- 0,70)	64,90% (+/- 0,65)	65,70% (+/- 1,50)	76,00% (+/- 10,20)
4 h	101,43% (+/- 0,85)	48,50% (+/- 0,36)	48,90% (+/- 0,80)	44,10% (+/- 11,73)

Tab. 4. 2 Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf die Konzentration und die Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikeln. Mittelwerte angegeben in Prozent. SE in Klammern angegeben.

Ergebnisse

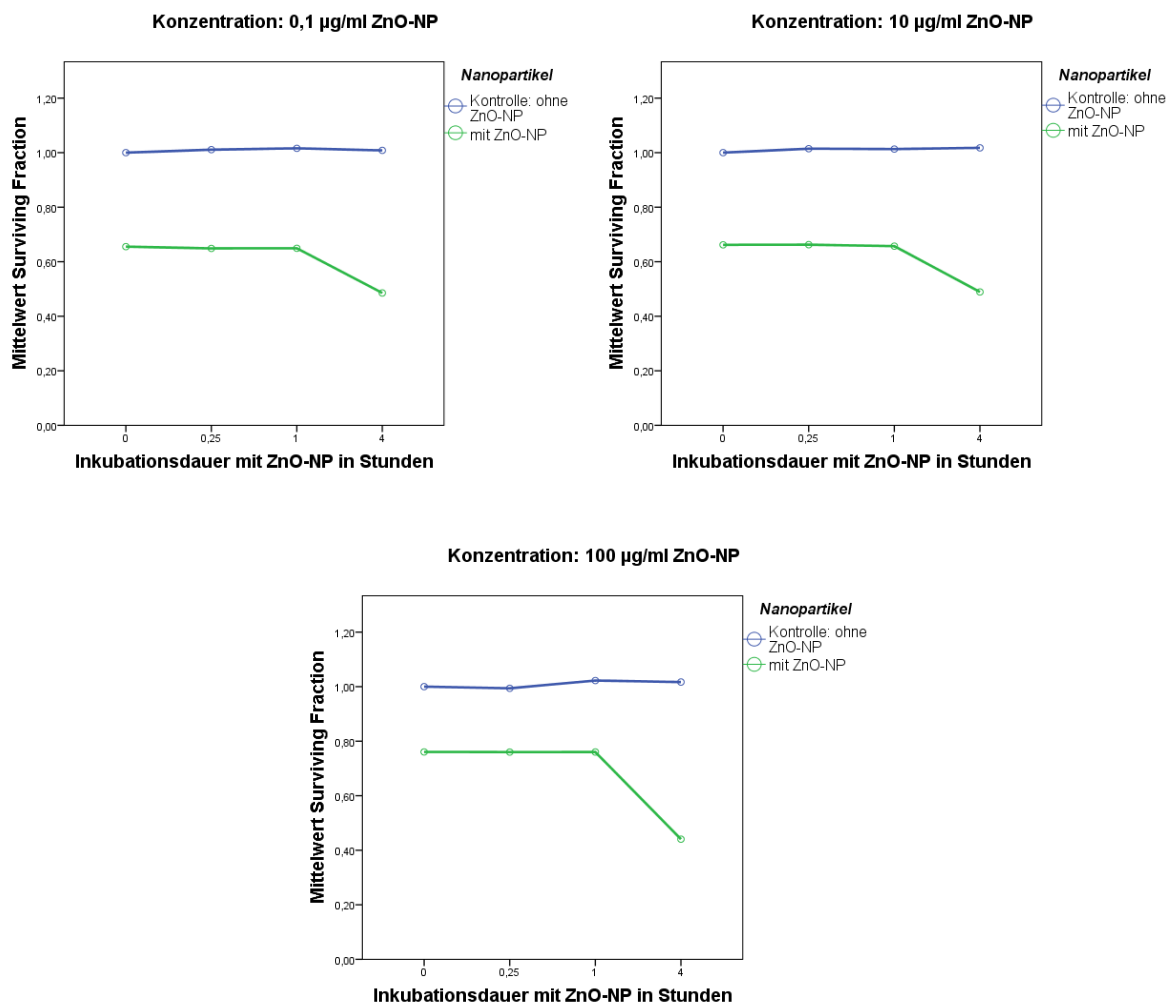


Abb. 4. 7 Liniendiagramme zur Illustration der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) im direkten Vergleich von Kontrolle ohne ZnO-NP und mit ZnO-NP für die Behandlungsreihe ohne anschließende Bestrahlung. Das Zellüberleben der mit ZnO-NP behandelten Zellen ist geringer als das Zellüberleben der Kontrollen. Bei 4-stündiger Inkubation ist eine besonders deutliche Abnahme der Überlebensfraktion für alle angewandten ZnO-NP-Konzentrationen zu erkennen.

In der Behandlungsreihe mit ZnO-Nanopartikeln ohne anschließende Bestrahlung wird deutlich, dass die alleinige Inkubation mit Nanopartikeln eine Reduktion des Zellüberlebens im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (*Surviving Fraction* = 1 bzw. 100%) bewirkt. Bereits nach einer Inkubationsdauer von 0 Minuten bei einer ZnO-NP-Konzentration von 0,1µg/ml ohne anschließende Bestrahlung (0 Gy) wird eine Reduktion der Überlebensfraktion um 34,50% auf 65,50% erreicht. Die Inkubationszeiten 0 Minuten (65,50%), 15 Minuten (64,90%) und 1 Stunde (64,90%) unterscheiden sich dabei nicht wesentlich in der *Surviving Fraction*. Erst ab einer Inkubationsdauer von 4 Stunden fällt eine weitere deutliche Reduktion der Überlebensfraktion um mehr als die Hälfte auf 48,50% auf. In der Konzentrationsreihe von 10µg/ml ZnO-NP werden für die verschiedenen Inkubationszeiten ähnliche Werte

Ergebnisse

der *Surviving Fraction* verzeichnet (66,20%, 66,30%, 65,70%, 48,90%). Bei der Behandlung mit der höchsten Konzentration von 100µg/ml ZnO-NP steigen die Überlebensfraktionen bei den Inkubationszeiten von 0 Minuten (76,10%), 15 Minuten (76,00%) und 1 Stunde (76,00%). Auffällig ist dabei aber ein insgesamt erhöhter Standardfehler von bis zu +/- 11,73.

In den Liniendiagrammen wird der Unterschied in der Überlebensfraktion der Tumorzellen besonders deutlich. Das Zellüberleben der mit ZnO-Nanopartikeln behandelten Zellen ist deutlich geringer als das Zellüberleben der Kontrollen. Nach einer 4-stündigen Inkubation ist eine besonders deutliche Abnahme der Überlebensfraktion für alle angewandten ZnO-NP-Konzentrationen zu erkennen.

4.1.5.2 Veränderung der Überlebensfraktion abhängig von Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel mit anschließender Bestrahlung von 2 Gy

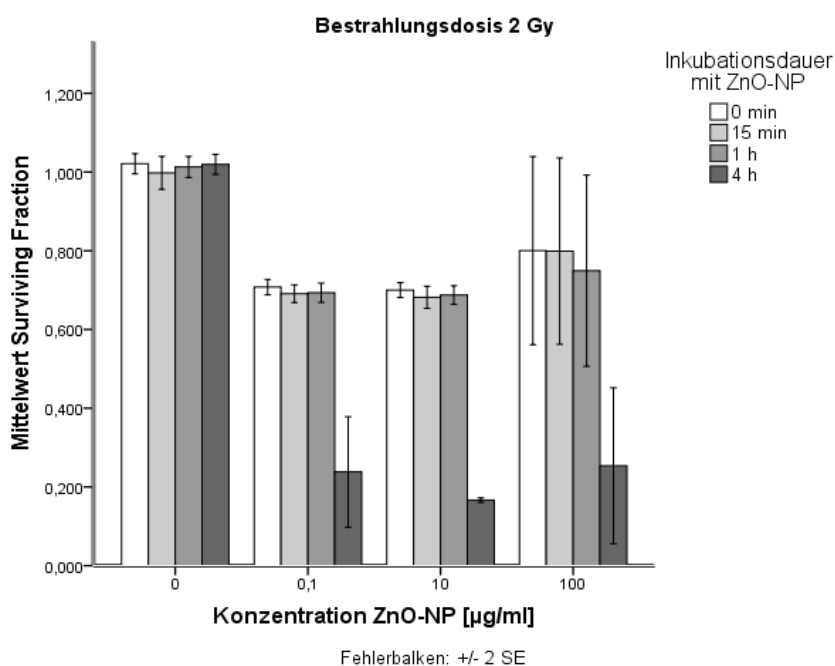


Abb. 4. 8 Einfluss der Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel auf die Mittelwerte der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) mit anschließender Bestrahlung von 2 Gy. (Mittelwerte, Fehlerbalken + / - 2 SE; Rohwerte siehe Anhang 8.9 Auswertungen Colcount-Scanner und Berechnungen)

Ergebnisse

Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf Inkubationszeit & Konzentration bei 2 Gy Bestrahlung

<i>Inkubation</i>	<i>Konzentration</i>			
	<u>0 µg/ml</u>	<u>0,1 µg/ml</u>	<u>10 µg/ml</u>	<u>100 µg/ml</u>
<i>0 min</i>	102,11% (+/- 1,30)	70,80% (+/- 0,98)	70,00% (+/- 0,95)	80,00% (+/- 11,95)
<i>15 min</i>	99,79% (+/- 2,10)	69,10% (+/- 1,13)	68,20% (+/- 1,40)	79,90% (+/- 11,84)
<i>1 h</i>	101,30% (+/- 1,34)	69,30% (+/- 1,22)	68,70% (+/- 1,20)	74,90% (+/- 12,15)
<i>4 h</i>	102,00% (+/- 1,30)	23,80% (+/- 7,01)	16,70% (+/- 0,30)	25,40% (+/- 9,90)

Tab. 4. 3 Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf die Konzentration und die Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikeln. Mittelwerte angegeben in Prozent. SE in Klammern angeben.

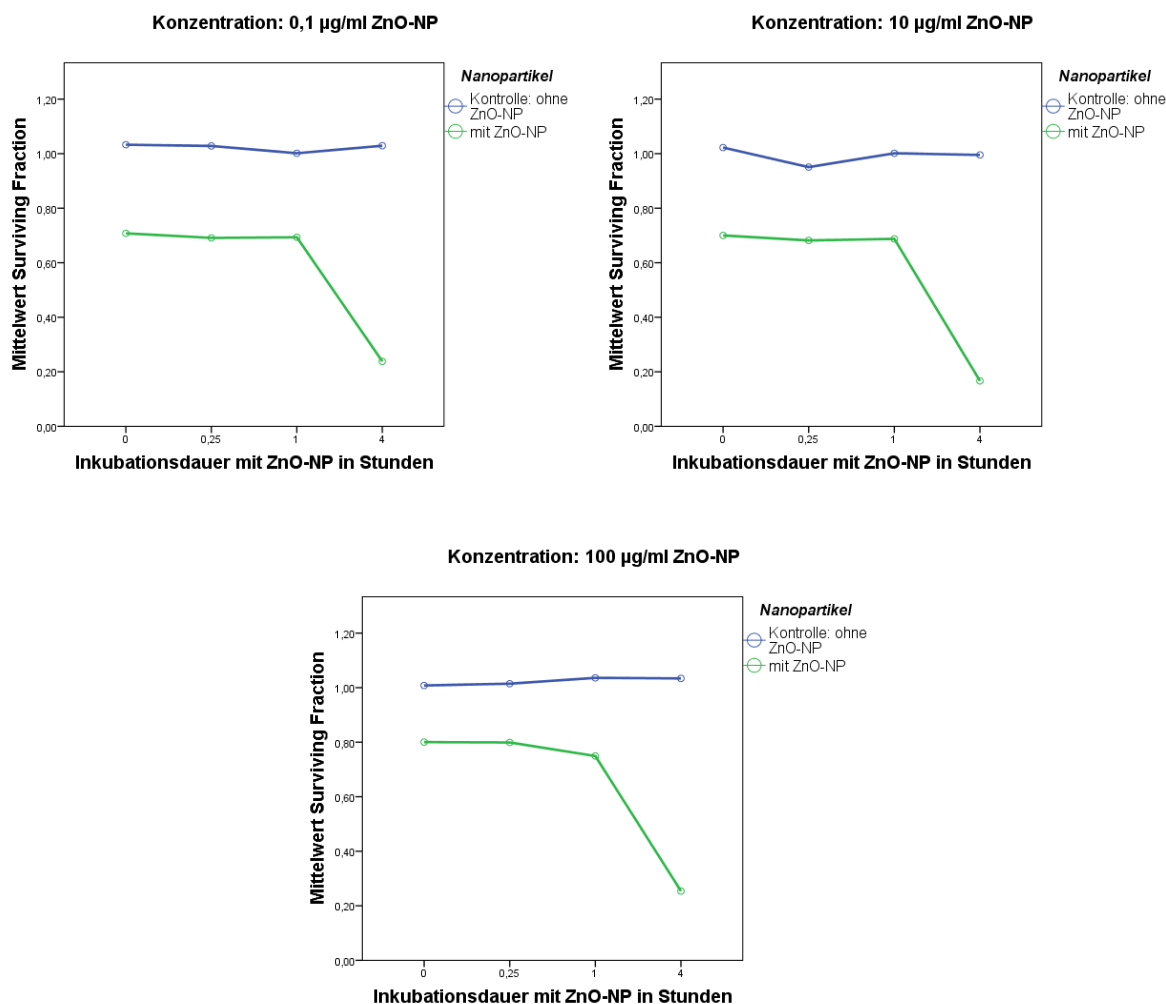


Abb. 4. 9 Liniendiagramme zur Illustration der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) im direkten Vergleich von Kontrolle ohne ZnO-NP und mit ZnO-NP für die Behandlungsreihe mit anschließender Bestrahlung von 2 Gy. Das Zellüberleben der mit ZnO-NP behandelten Zellen ist geringer als das Zellüberleben der Kontrollen ohne ZnO-NP. Bei 4-stündiger Inkubation ist ein besonders deutlicher Abfall der Überlebensfraktion zu erkennen.

Bei der Behandlungsreihe mit einer anschließenden Bestrahlung von 2 Gy ist das Zellüberleben der zusätzlich mit ZnO-NP behandelten Zellen geringer als das Zellüberleben der ausschließlich bestrahlten Tumorzellen. Erst durch die zusätzliche ZnO-Nanopartikelbehandlung nimmt das Zellüberleben ab. In den Graphiken und der Tabelle fällt auf, dass sich die Überlebensfraktionen ohne Bestrahlung (*siehe 4.1.5.1*) bzw. bei einer Bestrahlung von 2 Gy für die Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten und 1 Stunde nicht deutlich unterscheiden, allerdings scheinen die Überlebensraten bei anschließender Bestrahlung mit 2 Gy im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen geringfügig erhöht (*vgl. Tab. 4.2 und Tab. 4.3*). Erst bei einer 4-stündigen Inkubation der Zellen mit ZnO-Nanopartikeln sinkt das Zellüberleben auf 23,80% bei 0,1µg/ml ZnO-NP bzw. auf 16,70% bei 10µg/ml ZnO-NP und auf 25,40% bei 100µg/ml ZnO-NP.

4.1.5.3 Veränderung der Überlebensfraktion abhängig von Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel mit anschließender Bestrahlung von 4 Gy

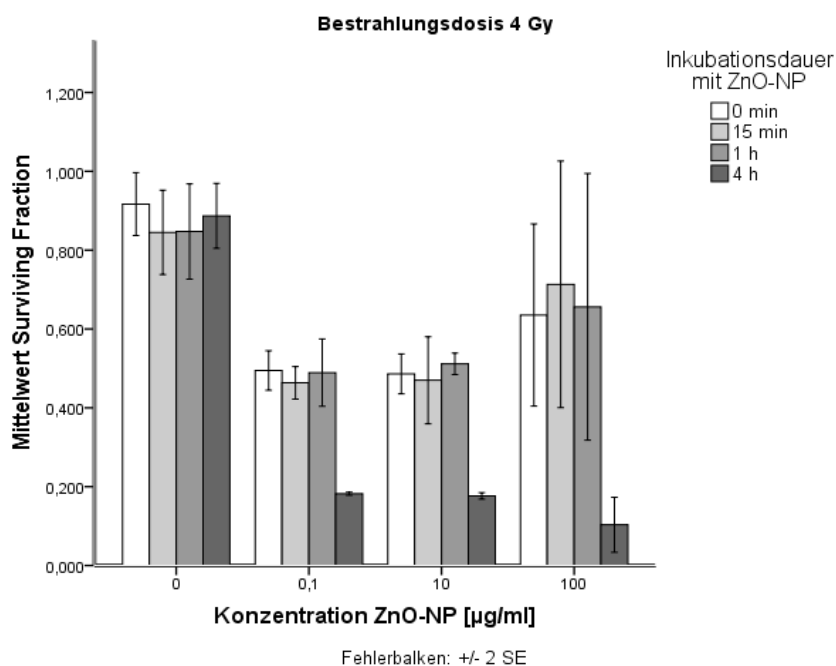


Abb. 4. 10 Einfluss der Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel auf die Mittelwerte der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) mit anschließender Bestrahlung von 4 Gy. (Mittelwerte, Fehlerbalken +/- 2 SE; Rohwerte siehe Anhang 8.9 Auswertungen Colcount-Scanner und Berechnungen)

Ergebnisse

Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf Inkubationszeit & Konzentration bei 4 Gy Bestrahlung

<i>Inkubation</i>	<i>Konzentration</i>			
	<u>0 µg/ml</u>	<u>0,1 µg/ml</u>	<u>10 µg/ml</u>	<u>100 µg/ml</u>
<i>0 min</i>	91,70% (+/- 4,00)	49,50% (+/- 2,51)	48,60% (+/- 2,54)	63,50% (+/- 11,55)
<i>15 min</i>	84,51% (+/- 5,40)	46,40% (+/- 2,10)	47,00% (+/- 5,53)	71,30% (+/- 15,64)
<i>1 h</i>	84,74% (+/- 6,04)	48,90% (+/- 4,30)	51,10% (+/- 1,36)	65,60% (+/- 16,90)
<i>4 h</i>	88,70% (+/- 4,12)	18,20% (+/- 0,20)	17,70% (+/- 0,41)	10,30% (+/- 3,50)

Tab. 4. 4 Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf die Konzentration und die Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikeln. Mittelwerte angegeben in Prozent. SE in Klammern angeben.

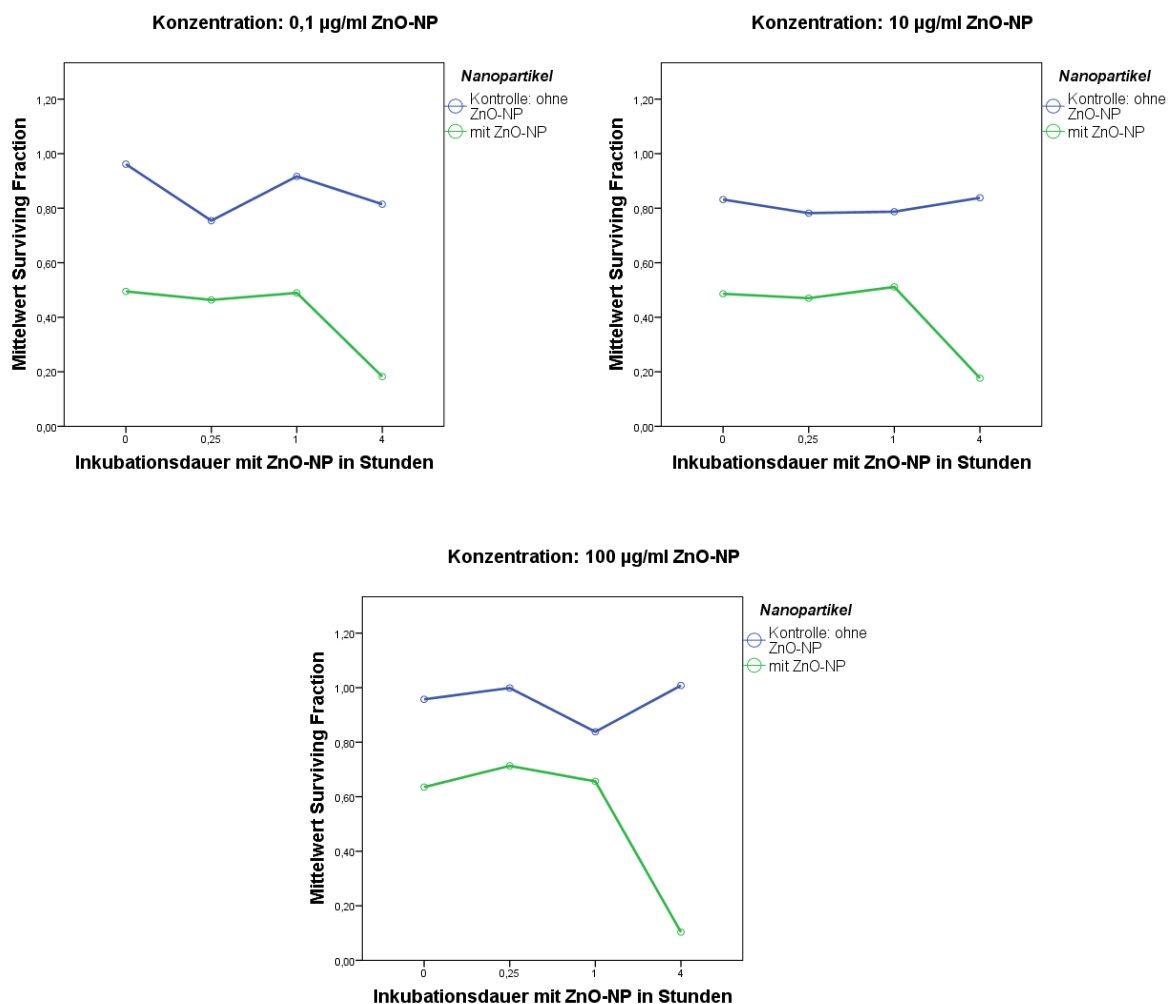


Abb. 4. 11 Liniendiagramme zur Illustration der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) im direkten Vergleich von Kontrolle ohne ZnO-NP und mit ZnO-NP für die Behandlungsreihe mit anschließender Bestrahlung von 4 Gy. Das Zellüberleben der mit ZnO-NP behandelten Zellen ist geringer als das Zellüberleben der Kontrollen. Bei 4-stündiger Inkubation ist ein besonders deutlicher Abfall der Überlebensfraktion zu erkennen.

Ergebnisse

In der graphischen und tabellarischen Darstellung der Mittelwerte der Überlebensfraktion für die Behandlungsreihe mit anschließender Bestrahlung von 4 Gy fällt bereits ohne vorherige Inkubation mit den Nanopartikeln eine leichte Abnahme des Zellüberlebens um bis zu 15,49% auf. Diese Abnahme wird jedoch bei kombinierter Behandlung mit vorheriger Nanopartikel-Inkubation deutlich verstärkt. Das Zellüberleben sinkt auf nur noch 10,30% bei 4-stündiger Inkubation der Zellen mit 100µg/ml ZnO-NP. Auffällig ist bei der angewandten Konzentration von 100µg/ml ZnO-NP wieder der erhöhte Standardfehler, der sich für die Mittelwerte ergibt.

4.1.5.4 Veränderung der Überlebensfraktion abhängig von Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel mit anschließender Bestrahlung von 8 Gy

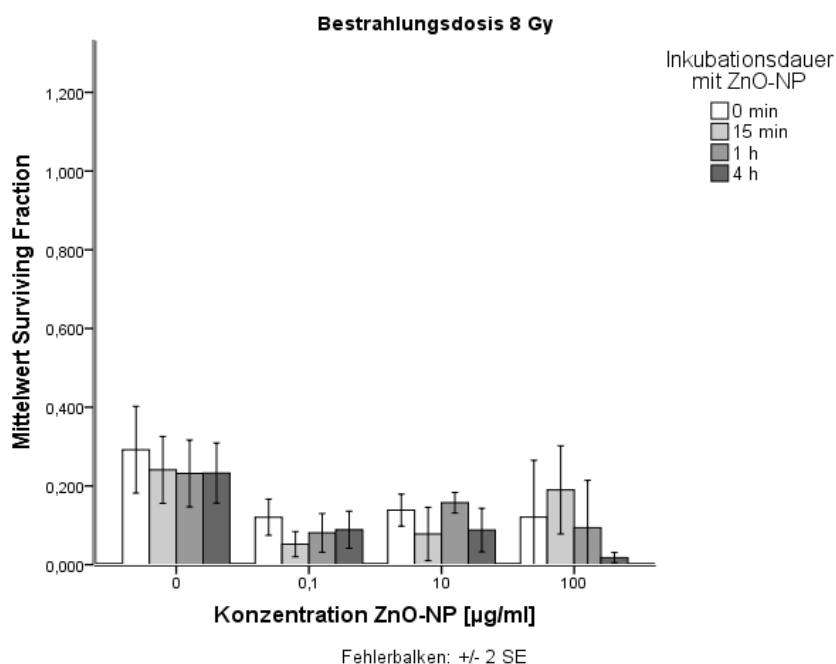


Abb. 4. 12 Einfluss der Konzentration und Inkubationsdauer der Nanopartikel auf die Mittelwerte der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) bei anschließender Bestrahlung mit 8 Gy. (Mittelwerte, Fehlerbalken +/- 2 SE; Rohwerte siehe Anhang 8.9 Auswertungen Colcount-Scanner und Berechnungen)

Ergebnisse

Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf Inkubationszeit & Konzentration bei 8 Gy Bestrahlung

<i>Inkubation</i>	<i>Konzentration</i>			
	<u>0 µg/ml</u>	<u>0,1 µg/ml</u>	<u>10 µg/ml</u>	<u>100 µg/ml</u>
<i>0 min</i>	29,18% (+/- 5,51)	12,10% (+/- 2,30)	13,80% (+/- 2,03)	12,10% (+/- 7,22)
<i>15 min</i>	24,10% (+/- 4,24)	5,20% (+/- 1,60)	7,80% (+/- 3,40)	19,00% (+/- 5,60)
<i>1 h</i>	23,20% (+/- 4,30)	8,10% (+/- 2,50)	15,70% (+/- 1,31)	9,40% (+/- 6,00)
<i>4 h</i>	23,30% (+/- 3,82)	8,90% (+/- 2,40)	8,80% (+/- 2,80)	1,80% (+/- 0,70)

Tab. 4. 5 Vergleich der Mittelwerte der Überlebensfraktion bezogen auf die Konzentration und die Inkubationsdauer mit ZnO-Nanopartikeln. Mittelwerte angegeben in Prozent. SE in Klammern angegeben.

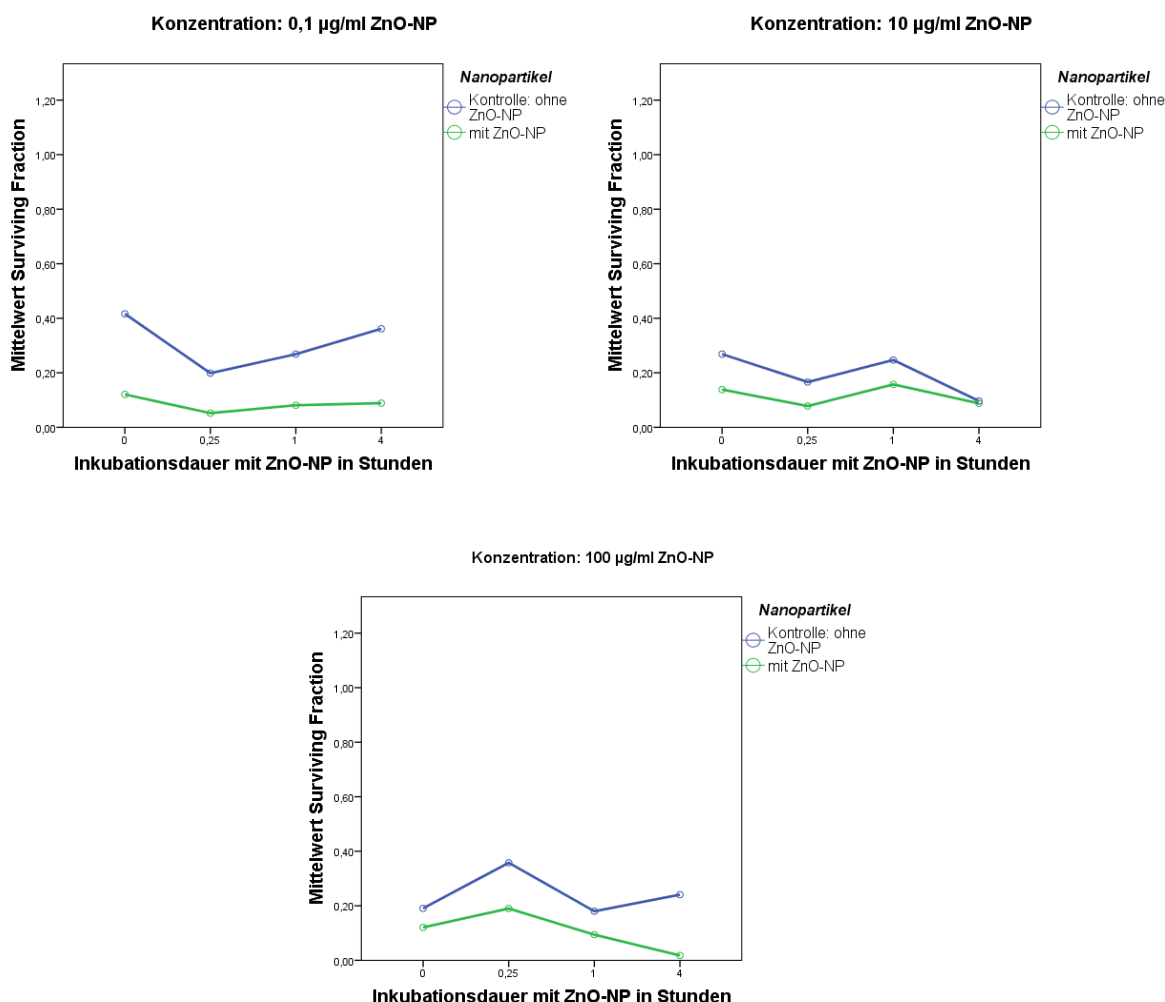


Abb. 4. 13 Liniendiagramme zur Illustration der Überlebensfraktion (*Surviving Fraction*) im direkten Vergleich von Kontrolle ohne ZnO-NP und mit ZnO-NP für die Behandlungsreihe mit anschließender Bestrahlung von 8 Gy. Die *Surviving Fraction* ist nach dieser Behandlungskombination insgesamt kleiner. Das Zellüberleben der mit ZnO-NP behandelten Zellen ist geringer als das Zellüberleben der Kontrollen.

Ergebnisse

Bei einer Bestrahlung der Zellen mit 8 Gy, wird die insgesamt deutlichste Abnahme des Zellüberlebens in dem Kolonie-Assay erreicht. Bereits ohne eine vorherige Nanopartikel-Inkubation sinkt das Zellüberleben auf nur noch 23,30%. Jedoch wird auch hier wieder deutlich, dass das Zellüberleben der zusätzlich mit ZnO-NP behandelten Zellen geringer ist, als das Zellüberleben der Kontrollen (ohne ZnO-NP, mit Millipore). Bei einer vorherigen 4-stündigen Behandlung der Zellen mit 100µg/ml ZnO-Nanopartikeln wird die Überlebensfraktion um 98,20% auf 1,80% gesenkt. Dies ist die niedrigste gemittelte Überlebensfraktion der gesamten Versuchsreihe.

4.2 Zellmorphologie nach ZnO-Inkubation und Fraktionierter Bestrahlung

Dieser Abschnitt der Arbeit untersucht und vergleicht mikroskopisch die Morphologie der A549-Zellen. Die Tumorzellen wurden zuvor eine Stunde lang mit ZnO-Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,1µg/ml, 10µg/ml oder 100µg/ml inkubiert und anschließend über einen Zeitraum von 5 Tagen fraktioniert mit 0 Gy, 2 Gy oder 4 Gy bestrahlt. Dies entspricht einer kumulativen Bestrahlungsdosis von 0 Gy, 10 Gy bzw. 20 Gy.

Die hierbei beobachteten Veränderungen der Tumorzell-Morphologie können im Rahmen einer Zellschädigung durch die jeweilige Behandlung interpretiert werden.

4.2.1 Zellmorphologie nach ZnO-Inkubation ohne Bestrahlung

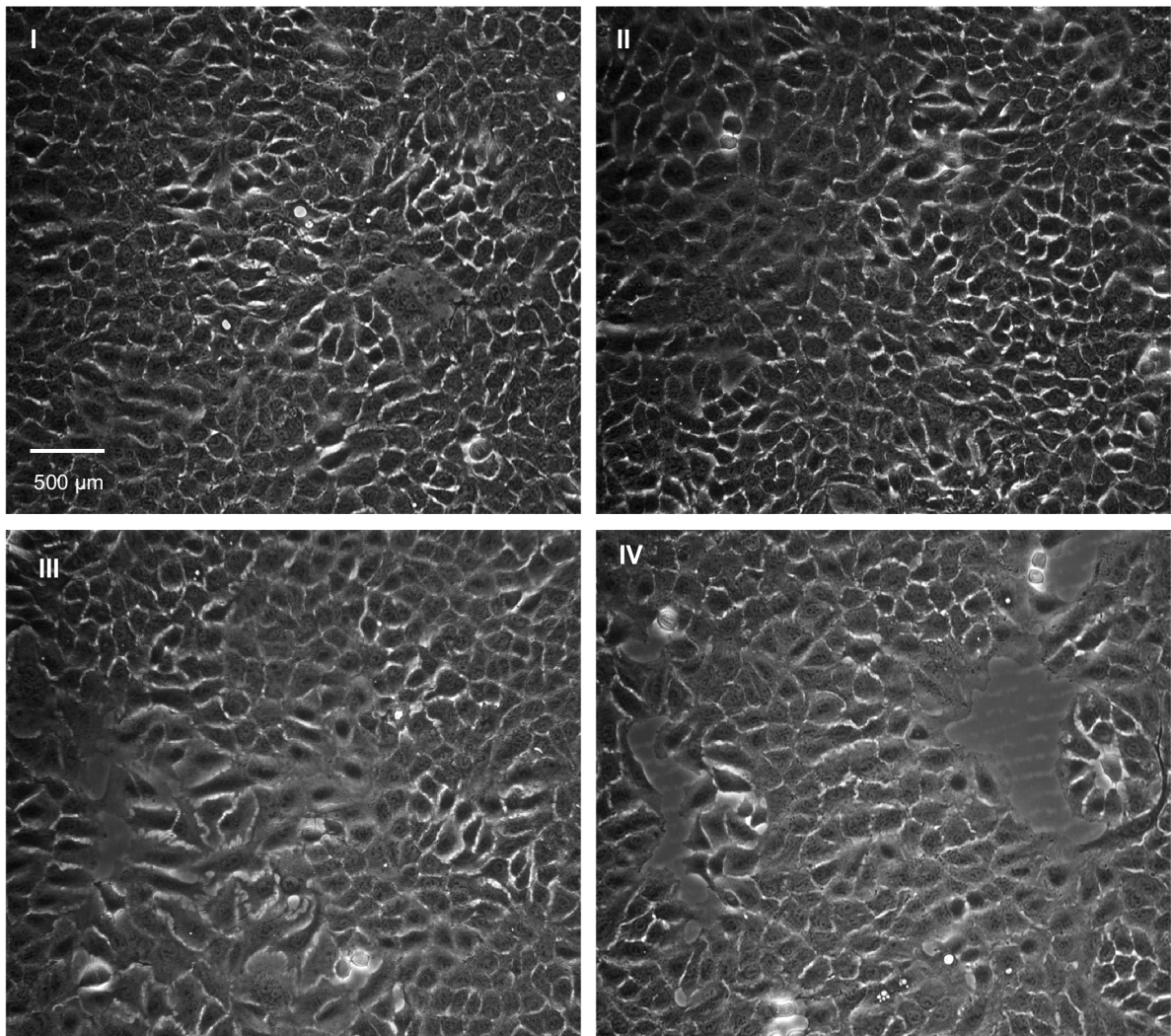


Abb. 4. 14 Morphologie der Zellen nach einstündiger Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln ohne anschließende Bestrahlung (0 Gy). Konzentrationen: I) ohne ZnO-NP, II) 0,1µg/ml ZnO-NP III) 10µg/ml ZnO-NP, IV) 100µg/ml ZnO-NP. Aufnahme in 20-facher Vergrößerung.

Die unbehandelten Zellen (I) zeigen ein homogenes Zellbild. Die Zellen liegen dicht gepackt nebeneinander und ähneln sich in ihrer Größe und Form. Bei vorheriger Inkubation mit 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikeln (II) zeigt sich noch kein wesentlicher Unterschied zum Zellbild der unbehandelten Zellen. Mit steigender Konzentration der ZnO-Nanopartikel (III, IV) ist eine leichte Abnahme der Zelldichte zu erkennen. Es entstehen einzelne, teilweise größere „Lücken“ im Zellrasen. Einige Zellen erscheinen zudem vergrößert und irregulär geformt.

4.2.2 Zellmorphologie nach ZnO-Inkubation und fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy

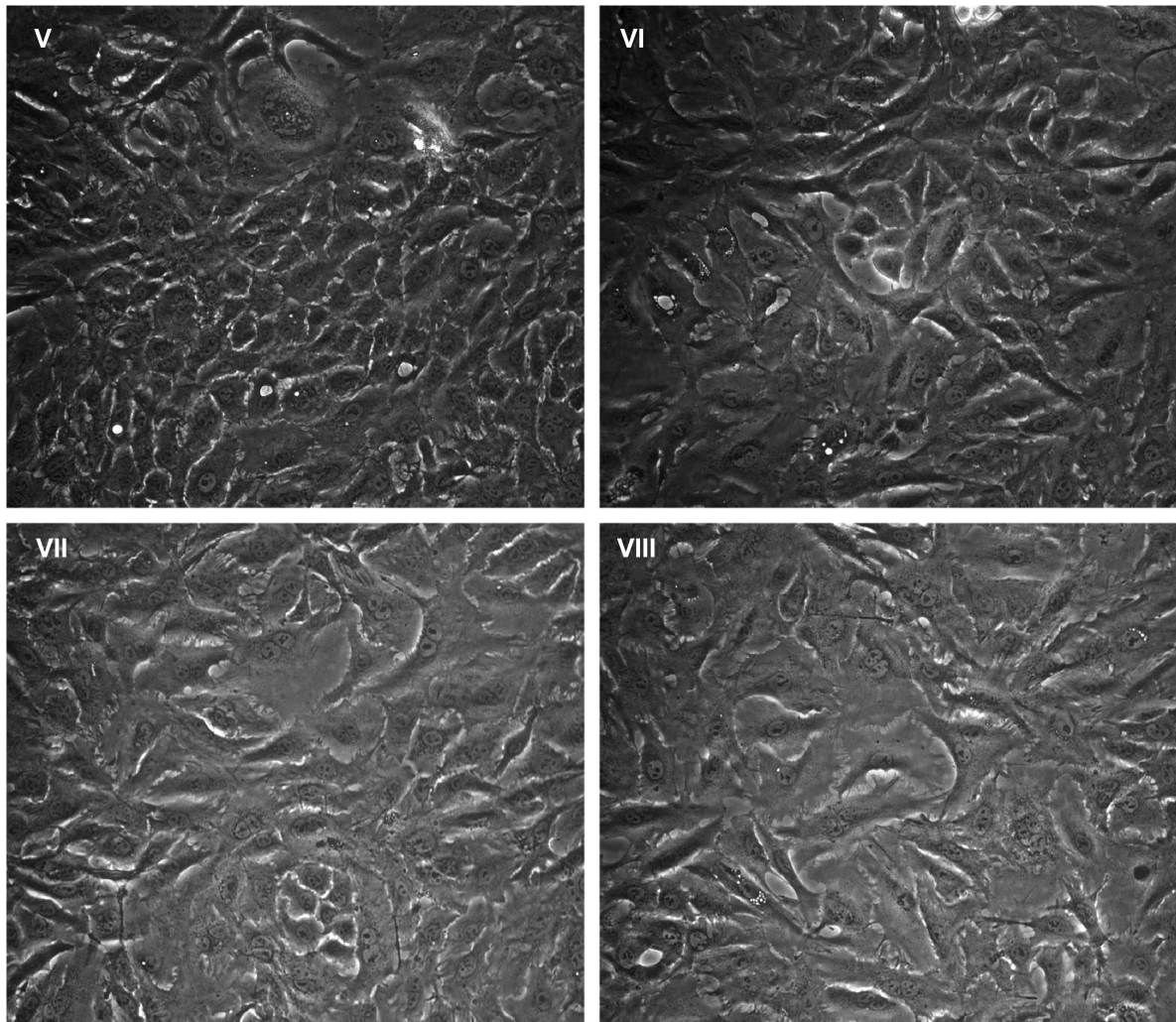


Abb. 4. 15 Morphologie der Zellen nach einstündiger Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln und anschließender fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy. Konzentrationen V) ohne ZnO-NP, VI) 0,1 µg/ml ZnO-NP, VII) 10 µg/ml ZnO-NP, VIII) 100 µg/ml ZnO-NP. Aufnahme in 20-facher Vergrößerung.

Das Zellbild der ausschließlich bestrahlten Zellen (V) weist bereits morphologische Veränderungen auf. Die Zellen erscheinen größer und weisen vermehrt Veränderungen in ihrer Form auf. Bei Kombination aus vorheriger Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln und anschließender Bestrahlung mit 2 Gy scheint der Interzellularraum noch weiter expandiert, sodass weniger Zell-Zell-Kontakte vorliegen. Ein wesentlicher zellmorphologischer Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen (VI – VIII) lässt sich jedoch nicht beschreiben.

4.2.3 Zellmorphologie nach ZnO-Inkubation und fraktionierter Bestrahlung mit 4 Gy

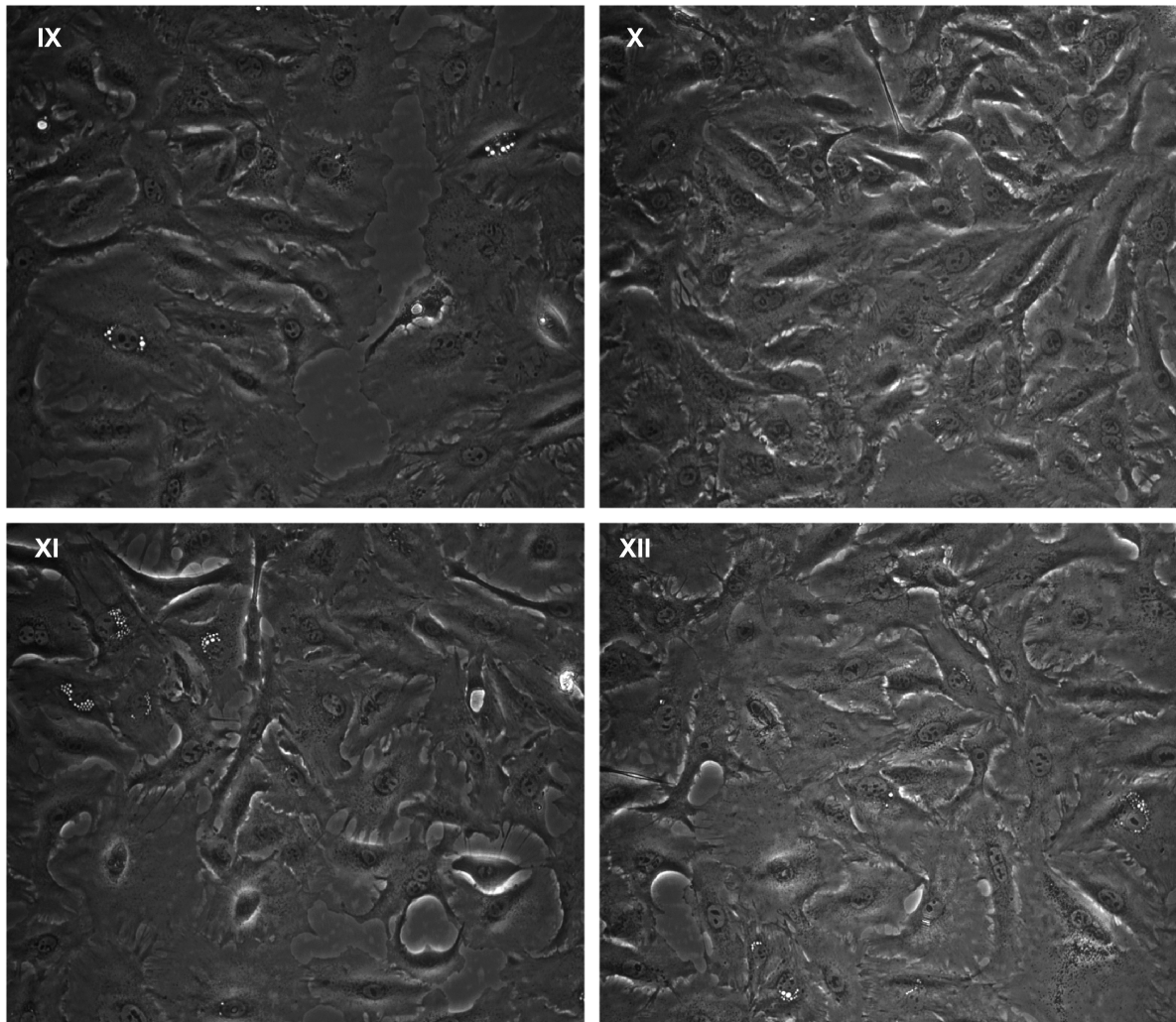


Abb. 4. 16 Morphologie der Zellen nach einstündiger Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln und anschließender fraktionierter Bestrahlung mit 4 Gy. Konzentrationen IX) ohne ZnO-NP, X) 0,1 µg/ml ZnO-NP, XI) 10 µg/ml ZnO-NP, XII) 100 µg/ml ZnO-NP. Aufnahme in 20-facher Vergrößerung.

Nach fraktionierter Bestrahlung mit 4 Gy sind die Unterschiede in der Zellmorphologie gegenüber denen unbehandelter Zellen (I) besonders deutlich zu erkennen. Sowohl im Bildausschnitt der ausschließlich bestrahlten Zellen (IX), als auch in den anderen Bildausschnitten (X – XII) befinden sich deutlich weniger Zellen. Sie weisen nur noch wenige Zell-Zell-Kontakte auf. Die Zellen erscheinen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (I) stark vergrößert und sternförmig verändert. Zwischen ausschließlich bestrahlten Zellen (IX) und Zellen nach kombinierter Behandlung (X-XII), sowie zwischen den verschiedenen Konzentrationen der ZnO-Nanopartikel (X-XII), lassen sich keine wesentlichen bildmorphologischen Unterschiede feststellen.

4.3 Auswertung des CAM-Modells

Das Hühnerei-Chorioallantoismembran-Modell eignet sich gut als Testmodell für *in vivo* Untersuchungen und gilt als Bindeglied zwischen Zellversuch und Tierversuch. Um die erhobenen *in vitro* Daten des Kolonie-Assays zukünftig in einer komplexeren *in vivo* Situation überprüfen zu können, sollte in diesem Teil der Promotionsarbeit versucht werden, durch die Applikation von Tumorzellen der Linie A549 auf die Chorioallantoismembran solide Tumoren zu erzeugen. Die entsprechende Behandlung dieser dreidimensionalen Xenografttumore soll im Verlauf in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe eine *in vivo* Evaluation der Kombinationstherapie aus Nanopartikeln und Radiatio ermöglichen.

Die Auswertung des CAM-Modells erfolgte mikroskopisch mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung. Die HE-Färbung wird als histopathologische Übersichtsfärbung zur genaueren Lokalisation und Darstellung des jeweiligen Tumors genutzt.

Das Wachstum der Tumore konnte bereits makroskopisch beurteilt werden. Dabei stellten sich die Tumore als weißliche Raumforderungen auf der CAM dar. In der lichtmikroskopischen Auswertung konnte die erfolgreiche Tumoretablierung im Modell bestätigt werden.

4.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

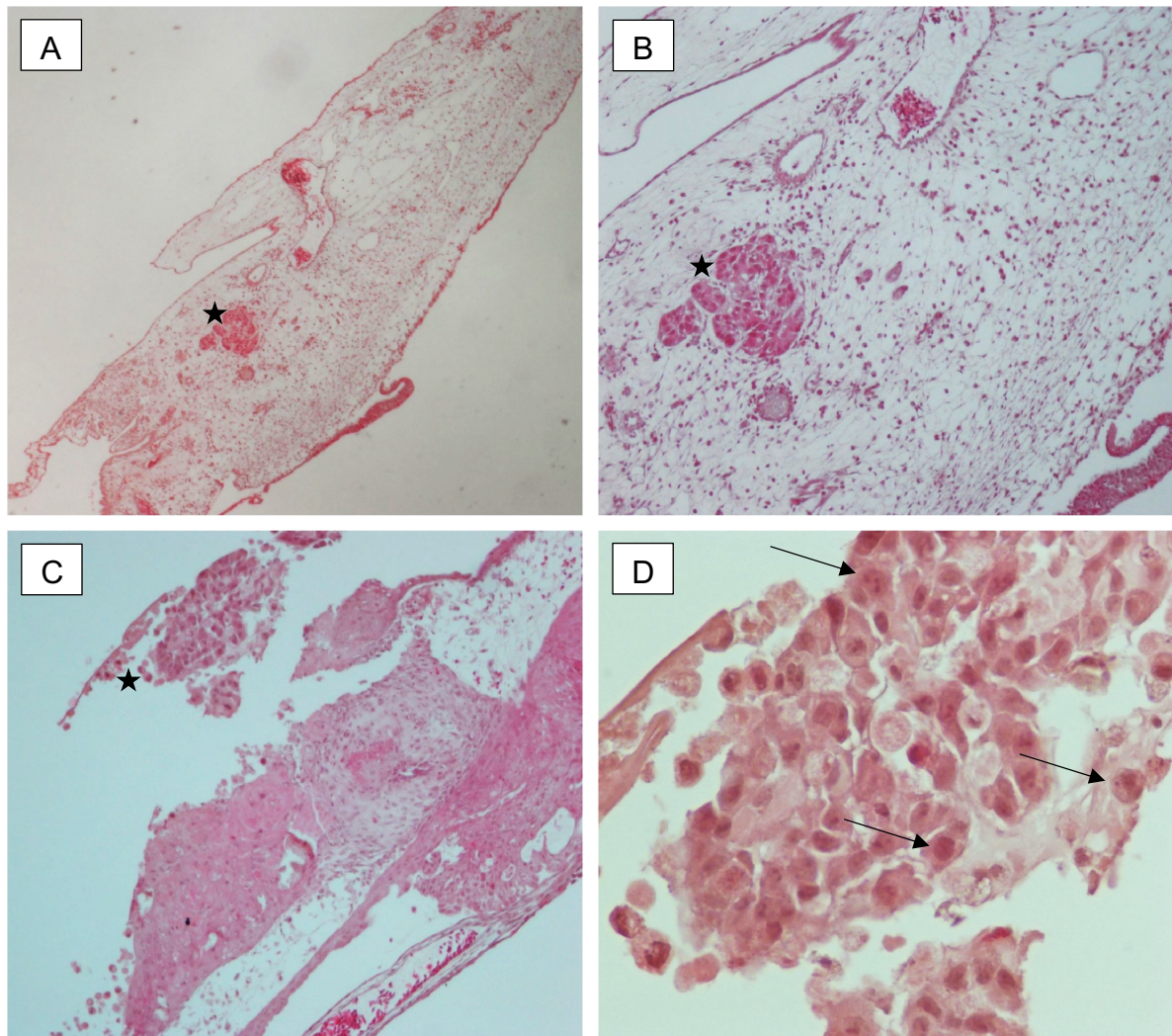


Abb. 4. 17 CAM-Präparate in H.E.-Färbung. A: CAM Nr.13-16, Aufnahme in 40-facher Vergrößerung; B: CAM Nr.13-16, Aufnahme 100-facher Vergrößerung; C: CAM Nr.20-15, Aufnahme in 100-facher Vergrößerung; D: CAM Nr.20-15, Aufnahme in 400-facher Vergrößerung. Tumore mit Sternen markiert. Zelluläre Atypien beispielhaft mit Pfeilen markiert.

Durch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung kann insgesamt ein guter Überblick über Morphologie und Zellstruktur der Präparate gewonnen werden. Die Tumorzellen stellen sich intensiv rot angefärbt dar und sind in diesen Schnitten gut zu detektieren (Tumore mit Sternen markiert). Es zeigt sich eine erfolgreiche Tumordinvasion bis in das Stroma der CAM. In Abbildung D (400-fache Vergrößerung) erkennt man die einzelnen Tumorzellen. Es sind deutliche Zellkernvergrößerungen mit verschobener Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns zu erkennen. Im direkten Vergleich zueinander variieren die Zellkerne in ihrer Größe und es lassen sich außerdem Formunterschiede zwischen den Zellkernen erkennen. Neben den Zellkernen sind auch die Nucleoli (Kernkörperchen) prominent vergrößert.

5. Diskussion

Kopf-Hals-Tumoren sind weltweit die sechsthäufigste Krebserkrankung mit einer Inzidenz von mehr als 550.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Parkin et al., 2005, Jemal et al., 2011). Histologisch bilden Plattenepithelkarzinome (HNSCC) mit über 90% den größten Anteil (Pai and Westra, 2009). Die Ätiologie ist multifaktoriell bedingt, wobei Tabak- und Alkoholkonsum die Hauptrisikofaktoren darstellen. Die bestehenden Therapieregime aus Chemo- und Strahlentherapie sind in ihrer Anwendung häufig limitiert und gehen mit erhöhten Nebenwirkungen für die Patienten einher. Deshalb ist die Forschung an der Erweiterung der Therapiemodalitäten besonders wichtig. In den vergangenen Jahren ist das Feld der Nanobiotechnologie und Nanomedizin immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt und die Möglichkeit der therapeutischen Verwendung von Nanopartikeln ist aktueller Gegenstand der Forschung. Ein besonderes Interesse liegt dabei in der Onkologie. Ihre günstigen biochemischen und physikalischen Eigenschaften, die gute synthetische Verfügbarkeit und die vielfältigen potenziellen Einsatzmöglichkeiten in der Diagnostik und Therapie machen Nanopartikel so interessant. Durch ihre geringe Größe und die physikalischen und chemischen Oberflächeneigenschaften stellen Nanopartikel vielseitig einsetzbare Trägerstoffe für die gezielte Medikamentenapplikation dar und können so unerwünschte Nebeneffekte während der Therapie verringern (Rasmussen et al., 2010). Der Verwendung von Metalloxid-Nanopartikeln kommt eine besondere Bedeutung zu. Neuere Studien konnten beispielsweise belegen, dass gewisse Metalloxid-Nanopartikel, wie Zinkoxid-Nanopartikel, bevorzugt Krebszellen töten, während sie gesundes Gewebe weitgehend verschonen (Rasmussen et al., 2010, Akhtar et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung von ZnO-Nanopartikeln als Radiosensitizer im Hinblick auf das Zellüberleben epithelialer Adenokarzinomzellen (A549) untersucht. Mittels eines Koloniebildungsversuches wurde die Überlebensfraktion der Tumorzellen nach der Behandlung berechnet. In einem weiteren Versuchsteil wurden die morphologischen Veränderungen der Tumorzellen nach einer einstündigen Exposition mit Nanopartikeln und anschließender fraktionierter Bestrahlung unter dem Mikroskop analysiert und festgehalten.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Möglichkeit der Übertragung der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse auf das Chorioallantoismembran-Modell, vor dem Hintergrund der geplanten Injektion von Nanopartikeln in vaskularisiertes

Tumorgewebe *in vivo* und der anschließenden Bestrahlung der Tumore. Dazu sollte im Rahmen meiner Dissertation zunächst eine erfolgreiche Implantation solider Tumore auf der CAM erzielt werden. Mittels anschließender histologischer Aufarbeitung und H.E.-Färbung wurden die Präparate untersucht. Das CAM-Modell stellt sich als geeignetes *in vivo* Testmodell für die weiterführenden Versuche der Arbeitsgruppe dar. Wie in der Literatur bereits beschrieben, handelt es sich um ein besonders gut vaskularisiertes, transparentes und immundefizientes System, welches die Implantation von Tumorgewebe toleriert (Kunzi-Rapp et al., 2001).

In dem folgenden Diskussionsteil sollen nun die zuvor beschriebenen Methoden und Ergebnisse kritisch diskutiert und mit dem aktuellen Stand der Wissenschaft in Zusammenhang gebracht werden.

5.1 Kolonie-Assay

Zu der *in vitro* Untersuchung einer möglichen Effizienzsteigerung der Bestrahlung durch die additive, therapeutische Verwendung von Nanopartikeln wurde ein Kolonie-Assay nach dem unter 3.2.3.1 (Seite 33) aufgeführten Behandlungsschema durchgeführt und die *Surviving Fraction* als Maß für das Zellüberleben zehn Tage später untersucht. Ziel dieses Versuchs war es, den Einfluss einer kombinierten Behandlung aus Nanopartikeln und Bestrahlung auf das Tumorzellüberleben zu untersuchen und mit den Ergebnissen der alleinigen Nanopartikel-Wirkung, sowie der alleinigen Wirkung der Bestrahlung zu vergleichen.

Für diesen Versuch wurden Zellen der etablierten Linie A549 verwendet. Zunächst wurden die einzelnen Effekte der Bestrahlungsdosis (0 Gy; 2 Gy; 4 Gy; 8 Gy), der Nanopartikel-Konzentrationen (ohne ZnO-NP; 0,1µg/ml ZnO-NP; 10µg/ml ZnO-NP; 100µg/ml ZnO-NP) und der Nanopartikel-Inkubationszeiten (0 Minuten; 15 Minuten; 1 Stunde; 4 Stunden) auf die Überlebensfraktion der Tumorzellen analysiert. Anschließend wurde der Effekt der kombinierten Behandlung abhängig von der anschließenden Bestrahlungsdosis ausgewertet.

5.1.1 Die Bestrahlungsdosis beeinflusst das Zellüberleben der Tumorzellen

Aus den Ergebnissen meiner Untersuchungen geht hervor, dass die Bestrahlung das Zellüberleben ab einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy signifikant gegenüber den niedrigeren angewandten Bestrahlungsdosen senkt. Eine Bestrahlungsdosis von 8 Gy

senkt gegenüber allen anderen angewandten Bestrahlungsdosen signifikant die Überlebensfraktion der Zellen (siehe 4. *Ergebnisse Abb. 4.2*).

In der Krebstherapie üblicherweise applizierte kumulative Dosen liegen zwischen ca. 40 und 70 Gy. Häufig findet eine fraktionierten Bestrahlung Anwendung. Nach dem konventionellen Prinzip wird die Gesamtstrahlendosis in kleinere, tägliche Einheiten zwischen 1,8 – 2,3 Gy aufgeteilt (Kirthi Koushik et al., 2013). Der Vorteil der fraktionierten Bestrahlung liegt in einer effizienteren Bestrahlung der Tumore unter Schonung des umgebenden Gewebes. Während das Tumorgewebe nachhaltig geschädigt wird, kann physiologisches Gewebe regenerieren. Die in meinen Versuchen angewandten Dosen von 4 Gy und 8 Gy liegen also über den bei der fraktionierten Bestrahlung angewandten Bestrahlungsdosen pro Sitzung. Bei Bestrahlung mit höheren Gray-Dosen ist von einer erhöhten Zellschädigung auszugehen. Allerdings unterliegen die Behandlungsprotokolle für die verschiedenen Tumorentitäten kontinuierlichen Überarbeitungen und heutzutage werden auch zunehmend höhere Dosen bei insgesamt niedrigerer Gesamtstrahlendosis und kürzerer Therapiedauer eingesetzt. Außerdem sind die Tumorzellen nach dem vorliegenden Behandlungsschema des durchgeführten Kolonie-Assays nicht repetitiv, sondern nur einmalig bestrahlt worden. Es sollte ebenfalls bedacht werden, dass die Bestrahlung der Tumorzellen nach dem von mir angewandten Versuchsprotokoll in einem abgelösten Zustand der Zellen, nämlich in Suspension erfolgte. In diesem Zustand sind die epithelialen Tumorzellen anfälliger für Schädigung, als im adhärenen Zustand in einer *Monolayer*-Kultur.

Der zytotoxische Wirkmechanismus der Bestrahlung beruht auf einer Schädigung der DNA durch Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Crosslinks oder Basenschäden. Diese Schädigung kann entweder direkt durch die ionisierende Strahlung oder indirekt durch die Induktion reaktiver oxidativer Spezies entstehen (Kirthi Koushik et al., 2013, Tepper, 2016). Endogene Mechanismen verstärken diese ROS-Produktion noch zusätzlich. Die Arbeit von Yamamori et al. zeigte, dass ionisierende Strahlung in Tumorzellen der Linie A549 die Mitochondrien-abhängige Generierung von ROS verstärkt, das Membranpotential der Mitochondrien erhöht und die ATP-Produktion fördert (Yamamori et al., 2012).

Andererseits fiel in meinen Ergebnissen auf, dass die *Surviving Fraction* nach einmaliger Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy ohne zusätzliche Nanopartikelinkubation unverändert konstant blieb (siehe 4. *Ergebnisse Abb. 4.8, Tab. 4.3 und Abb. 4.9*). Die Zellen schienen sich sogar wieder zu regenerieren. Es ist

anzunehmen, dass die geringe Bestrahlungsdosis zu einem geringeren Level an oxidativem Stress in den Tumorzellen führt als höhere Bestrahlungsdosen von 4 Gy oder 8 Gy. In der Literatur ist beschrieben, dass durch niedrige Level an oxidativem Stress zelluläre Reparaturmechanismen angestoßen werden und so auch die Proliferation der Zellen stimuliert werden kann (Halliwell, 2006). Es kommt unter anderem zu einem Calcium-Anstieg in den Zellen und zu einer vermehrten Phosphorylierung (Halliwell, 2006). Oxidativer Stress bzw. reaktive Sauerstoffspezies sind also an verschiedenen intrazellulären Signalwegen beteiligt und können sich in geringen Maßen auch positiv auf das Zellüberleben auswirken. Erst durch die zusätzliche Nanopartikelinkubation zeigte sich ein reduziertes Zellüberleben.

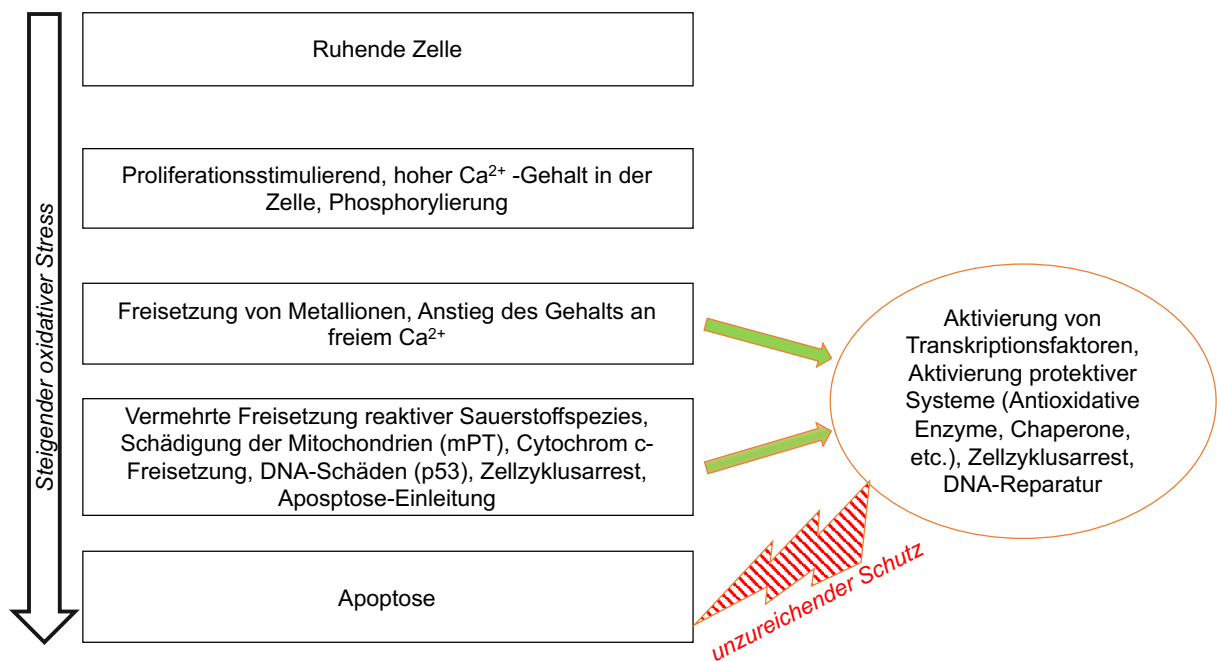


Abb. 5. 1 modifizierte schematische Darstellung nach Halliwell (2006): zelluläre Antwort auf oxidativen Stress. Die Zelle reagiert unterschiedlich abhängig vom Level an oxidativem Stress. Ein niedriges Niveau an oxidativem Stress kann proliferationsstimulierend wirken. Es kommt zu einem Ca^{2+} -Anstieg und zu einer vermehrten Phosphorylierung verschiedener Proteine. Bei weiterer Zunahme können die Zellen sich durch Hochregulierung der Abwehr- und Reparatursysteme an den oxidativen Stress anpassen. Es kommt zu einer Schädigung der Mitochondrien, zu DNA-Schäden und Zellzyklusarrest. Bei der Erschöpfung anti-oxidativer Abwehrmechanismen kommt es letztlich zum Zelltod (Halliwell, 2006).

5.1.2 Die Exposition der Tumorzellen mit ZnO-Nanopartikeln beeinflusst das Zellüberleben

Die Untersuchung des Einflusses der Nanopartikel-Konzentration auf das Zellüberleben hat gezeigt, dass alle angewandten Konzentrationen der ZnO-Nanopartikel (0,1µg/ml; 10µg/ml und 100µg/ml) eine signifikante Verringerung des Zellüberlebens der A549-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe bewirken (*siehe 4. Ergebnisse Abb. 4.3*). Der alleinige Einfluss der Inkubationsdauer wurde erst ab einer ZnO-Exposition von 4 Stunden signifikant (*siehe 4. Ergebnisse Abb. 4.4*).

Die beobachtete Zellschädigung durch die Exposition der Tumorzellen mit ZnO-Nanopartikeln wird bereits in der Literatur beschrieben. Als Ursache dieser Toxizität werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Häufig wird die intrazelluläre Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies durch die Nanopartikel als Ursache angeführt (Fukui et al., 2012). ROS können im menschlichen Organismus zu einer Schädigung von DNA, Fetten, Proteinen und Kohlenhydraten führen, sowie zu einer erhöhten Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) (Halliwell, 2006, Xia et al., 2006, Ho et al., 2013). Durch eine kumulative Schädigung zellulärer Strukturen kommt es letztlich zum Verlust der Zellfunktionen und auch zum Zelltod (Ryter et al., 2007).

Einige Studien diskutieren auch die Dissoziation der Zinkoxid-Nanopartikel und die anschließende Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen als Ursache für die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies und die folgende Schädigung der Zellen (Rasmussen et al., 2010, Fukui et al., 2012, Xia et al., 2008, Song et al., 2010, Heim et al., 2015). Andere Autoren beschreiben ein inflammatorisches Potential durch die vermehrte Expression von Entzündungsmediatoren und eine direkte und indirekte DNA-Schädigung durch die Partikel (Rasmussen et al., 2010, Nel et al., 2006, Hsiao and Huang, 2011, Lenz et al., 2013, Sayes et al., 2007, Chiang et al., 2012, Heim et al., 2015). Gelangen die Nanopartikel in die Zellen können sie dort wichtige Zellorganellen schädigen. Dabei scheinen sie besonders den Mitochondrien einen Schaden zuzufügen (Unfried et al., 2009, Salnikov et al., 2007, Yu et al., 2013). In Folge kommt es zu einer Abnahme des ATP-Gehalts in der Zelle sowie zu einer erhöhten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies. Außerdem kann durch Schädigung und Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran der intrinsische Apoptoseweg über Cytochrom c eingeleitet werden (Unfried et al., 2009).

Es ist als wahrscheinlich, dass auch die von mir untersuchten Tumorzellen der Linie A549 entsprechend der aufgeführten Toxizitätsmechanismen irreversibel geschädigt

wurden, sodass die die Proliferation der Zellen gestoppt wurde und die *Surviving Fraction* als Maß für das Zellüberleben verringert ist. Allerdings wurde diese Zellschädigung in meinen Versuchen erst ab einer ZnO-Nanopartikelinkubationsdauer von 4 Stunden signifikant. In den Versuchen anderer Arbeitsgruppen zur toxikologischen Charakterisierung von ZnO-Nanopartikeln konnte ebenfalls eine zeitabhängige Schädigung durch die Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln aufgezeigt werden. Auch Wilhelmi et al. (2013) beschreiben in ihren Versuchen mit murinen Makrophagen (RAW 264.7) eine signifikante Zellschädigung durch Apoptose nach 4-stündiger ZnO-Nanopartikelinkubation (Wilhelmi et al., 2013). Moratin et al. (2018) konnten nach frühestens 6 Stunden Expositionsdauer Zellschäden durch Apoptose nachweisen (Moratin et al., 2018). Diese vielfach beobachtete zeitabhängige Zellschädigung ist sehr wahrscheinlich durch die Geschwindigkeit der Partikeldissolution, die intrazelluläre Aufnahme der Partikel oder auch durch die verschiedenen Zellzyklusphasen begründet (Wilhelmi et al., 2013).

5.1.3 ZnO-Nanopartikel als Radiosensitizer – die Kombinationstherapie verstärkt die Reduktion des Zellüberlebens der Tumorzellen

Die Versuche der Co-Exposition der Zellen aus vorheriger Nanopartikel-Inkubation und anschließender Bestrahlung haben gezeigt, dass eine supportive Reduktion der Überlebensfraktion durch die kombinierte Behandlung möglich ist. Sowohl für ionisierende Strahlung als auch für ZnO-Nanopartikel sind teils synergistische zyto- und genotoxische Eigenschaften bekannt. Beide Behandlungen können folglich zu Zellschädigung und letztlich auch zu Zelluntergang führen. Ein wichtiger Mechanismus der Toxizität beider Behandlungskomponenten ist die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Folgen durch den oxidativen Stress in der Zelle. Dies führt letztlich zu einer Schädigung der DNA, besonders in Form von Doppelstrangbrüchen (Heim et al., 2015, Kirthi Koushik et al., 2013, Tepper, 2016, Jain et al., 2011).

In den Versuchen fiel auf, dass nach 4-stündiger ZnO-Inkubation das Tumorzellüberleben mit steigender Strahlendosis weitgehend unabhängig von der ZnO-Konzentration sinkt. Bereits in Kombination mit der geringsten Nanopartikel-Konzentration von 0,1µg/ml konnte das Tumorzellüberleben von 88,70% auf 18,20% bei einer Bestrahlungsdosis 4 Gy (*siehe 4. Ergebnisse Tab. 4.4*) und von 23,30% auf 8,90% bei einer Dosis von 8 Gy (*siehe 4. Ergebnisse Tab. 4.5*) gesenkt werden. Im Vergleich dazu konnte die Überlebensfraktion durch vorherige Inkubation mit 100µg/ml

ZnO-NP auf 10,30% bei einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy (*siehe 4. Ergebnisse Tab. 4.4*) bzw. auf 1,80% bei einer Dosis von 8 Gy (*siehe 4. Ergebnisse Tab. 4.5*) gesenkt werden. Zwischen den verschiedenen Konzentrationen der Nanopartikel ist kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Zellüberleben zu erkennen. Eine Erhöhung der Konzentration der Nanopartikel von 0,1µg/ml auf bis zu 100µg/ml erbrachte keine deutliche Effizienzsteigerung der Bestrahlung (*siehe 4. Ergebnisse Abb. 4.5*). Die Post-Hoc-Tests konnten bestätigen, dass die Behandlung mit ZnO-Nanopartikeln jeder Konzentration eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$) der Überlebensfraktion gegenüber der Kontrollgruppe ohne Nanopartikel bewirkt. Folglich wäre eine niedrigere Dosis von 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikeln bereits ausreichend, um den gewünschten Effekt einer Effizienzsteigerung der Bestrahlung zu erzielen. Diese Ergebnisse könnten einen besonderen Vorteil für eine mögliche Patientenanwendung in der Zukunft darstellen. Eine Dosisverringering potentiell toxischer Substanzen bei gleichbleibendem Effekt ist in der kurativen Medizin sehr erstrebenswert und kann die Rate möglicher unerwünschter Nebenwirkungen durch die Partikel senken.

Vor allem die Inkubationsdauer scheint einen entscheidenden Einfluss zu haben. Durch eine 4-stündige Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln und eine nachfolgende Bestrahlung mit 2 Gy bzw. 4 Gy konnte das Zellüberleben um mehr als die Hälfte gesenkt werden (*siehe 4. Ergebnisse Abb. 4.8 und Abb. 4.10*).

Bei einer anschließenden Bestrahlungsdosis von 8 Gy konnte eine Reduktion des Zellüberlebens von nahezu 100% erzielt werden (*siehe 4. Ergebnisse Abb. 4.12, Tab. 4.5*). Allerdings machen die Liniendiagramme (*siehe 4. Ergebnisse Abb. 4.13*) deutlich, dass die Wirkungssteigerung durch die zusätzliche ZnO-Exposition der Zellen bei einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy nicht so relevant ist, wie in den Ansätzen ohne Bestrahlung bzw. mit niedrigeren angewandten Bestrahlungsdosen. Dies ist am Ehesten durch die Höhe der Strahlendosis selbst begründet. Die alleinige Bestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy ist bereits äußerst toxisch für die Zellen.

Nach der kombinierten Behandlung aus Nanopartikeln und Bestrahlung konnte in den Versuchen also eine insgesamt noch deutlichere Verringerung des Zellüberlebens erreicht werden, was folglich für strahlensensibilisierende Eigenschaften der Partikel sprechen würde. Nach Ancel und Vitemberger (1925) gibt es zwei Faktoren, die die Manifestation von strahleninduzierten Schäden in Zellen beeinflussen. Zum einen ist es das Level an biologischem Stress, dem die Zelle ausgesetzt ist und zum anderen sind es äußere Einflüsse vor und nach der Bestrahlung (Forshier, 2008). Da Tumorzellen außerdem nicht so schnell regenerieren wie gesunde Zellen, ist es

möglich, dass diese durch die zusätzliche Belastung aus Nanopartikel-Inkubation und anschließender Bestrahlung gegenüber gesunden Zellen vermehrt irreversibel geschädigt werden, bevor zelleigene Reparaturmechanismen greifen können.

Überträgt man diese Faktoren auf meine Versuche, so kann das bedeuten, dass die Tumorzellen durch die verschiedenen diskutierten Toxizitätsmechanismen der Nanopartikel bereits vor der Bestrahlung geschädigt wurden und auf diese Weise strahlenempfindlicher wurden. Die Zellschädigung könnte auf vielfältige Vorgänge wie die Schädigung von Zellmembran und Zellorganellen, Inflammation, Induktion reaktiver Sauerstoffspezies, Ionenfreisetzung und DNA-Schäden zurückzuführen sein (Horie et al., 2012). Andere Studien mit Gold-Nanopartikeln konnten bereits zeigen, dass die Strahlensensibilität von Brustkrebszellen durch eine vorangegangene 24-stündige Exposition mit Gold-Nanopartikeln erhöht wird (Jain et al., 2011). Es ist also denkbar, dass Nanopartikel auch als Radiosensitizer in der Krebstherapie genutzt werden können. Die häufigsten bereits etablierten Radiosensitizer induzieren, wie ZnO-Nanopartikel auch, DNA-Doppelstrangbrüche oder inhibieren DNA-Reparaturmechanismen (Marcu et al., 2003). Andere bekannte Radiosensitizer wie Cetuximab greifen Mechanismen der Strahlenresistenz, wie die EGFR-Expression, an (Bonner et al., 2006).

Aus der getrennten Betrachtung der Einflussfaktoren Bestrahlung und Nanopartikelinkubation geht allerdings hervor, dass die alleinige Bestrahlung der Zellen die Überlebensfraktion deutlicher senkt als die alleinige Nanopartikelinkubation. Die insgesamt stärkste Reduktion des Zellüberlebens war in allen Konzentrationsreihen bei einer anschließenden Bestrahlungsdosis von 8 Gy gegeben. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den einzelnen Inkubationsdauern mit ZnO für den Einfluss auf das Zellüberleben ausgemacht werden. Es ist davon auszugehen, dass bei einer Bestrahlung mit 8 Gy die Zellen so stark geschädigt werden, dass sie nicht mehr ausreichend regenerieren können.

In den Versuchen mit der höchsten Konzentration von 100µg/ml ZNO-NP fiel ein im Vergleich hoher Standardfehler der Mittelwerte auf. Dies spricht für eine hohe Streuung der Mittelwerte und deutet an, dass nach der Behandlung neben Zellpopulationen mit einer geringeren Überlebensrate auch Populationen mit höherem Zellüberleben existieren. Dies könnte durch eine unterschiedliche Strahlensensibilität der Tumorzellen erklärt werden. Neben dem *oxygen effect* und der EGF-/VEGF-Expression spielt auch der Zellzyklus eine entscheidende Rolle in der Strahlensensibilität. Durch die vorangegangene Inkubation mit ZnO-Nanopartikeln

kann es aber auch in den widerstandsfähigeren Populationen zu einer Zellschädigung durch die Entstehung von oxidativem Stress kommen. Entscheidend ist das Level an oxidativem Stress in der Zelle, denn die Datenlage zeigt, dass geringfügiger oxidativer Stress zelluläre Reparaturmechanismen sogar anstößt und dadurch proliferationsstimulierend wirken kann (Halliwell, 2006).

Andere Versuche der Arbeitsgruppe (Promotionsschrift von [REDACTED], „Analyse von ZnO-Nanopartikeln als Adjuvans in der Strahlentherapie“ (Kraft, 2020)) beschäftigten sich außerdem mit dem Einfluss der kombinierten Behandlung aus ZnO-Nanopartikel-Inkubation und Bestrahlung auf die Stoffwechsellistung der A549-Zellen. Dazu wurde ein MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)-Assay durchgeführt. Der MTT-Test dient der Bestimmung der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen. Der Stoffwechsel von Zellen wiederum kann als indirekte Anzeige der Vitalität der Zellen gewertet werden und hat somit für die Auswertung auch repräsentativen Einfluss auf die weitere Proliferation und Koloniebildung der Zellen und damit letztlich auch auf das Zellüberleben. Aus den Versuchen ging insgesamt eine Abnahme des Zellstoffwechsels der A549-Zellen nach kombinierter Behandlung aus ZnO-Nanopartikeln und Bestrahlung hervor (Kraft, 2020). Diese Ergebnisse decken sich mit meinen Beobachtungen eines reduzierten Zellüberlebens und unterstützen die Annahme der Strahleneffizienzsteigerung durch eine vorherige Inkubation der Tumorzellen mit ZnO-Nanopartikeln.

5.2 Morphologische Veränderungen der Tumorzellen nach der kombinierten Behandlung aus ZnO-Nanopartikeln und fraktionierter Bestrahlung

Dieser Teil der Arbeit ermöglicht es, durch die Visualisierung morphologischer Unterschiede zwischen unbehandelten, mit Nanopartikeln inkubierten, fraktioniert bestrahlten und kombiniert behandelten Tumorzellen, eine Aussage über eine mögliche Zellschädigung durch die Behandlung zu treffen. Diese Zellschädigung durch die Nanopartikel ist letztlich auf verschiedene Mechanismen wie Schädigung von Zellmembran und Zellorganellen, Inflammation, Induktion reaktiver Sauerstoffspezies, Ionenfreisetzung, DNA-Schäden und Apoptose zurückzuführen (Horie et al., 2012). Im Gegensatz zu dem zuvor erörterten Kolonie-Assay wurden die Tumorzellen in diesem Versuch fraktioniert (5 Fraktionen) mit einer Einzelbestrahlungsdosis von bis zu maximal 4 Gy bestrahlt. Die maximale Gesamtstrahlendosis betrug damit 20 Gy. Die wiederholten Bestrahlungen und die niedrigeren Bestrahlungsdosen im Rahmen der fraktionierten Bestrahlung stellen ein etabliertes Konzept in der Krebstherapie dar. Durch einen Abstand zwischen den Bestrahlungseinheiten von mindestens 6 Stunden kann das gesunde Gewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe die entstandenen Schäden zwischen den Fraktionen reparieren (Kirthi Koushik et al., 2013). Auf diese Weise können Nebenwirkungen im gesunden Gewebe reduziert werden. Außerdem stellt die Zeitdauer der Therapie einen weiteren Vorteil der fraktionierten Behandlung dar. So können Tumorzellen, die sich anfangs in einer strahlenresistenten Zyklusphase befanden, im Verlauf der Behandlung in eine strahlensensitive Phase übergehen (Kirthi Koushik et al., 2013). Am effektivsten ist die Strahlentherapie in der G2-Phase (Gap-2-Phase) und der M-Phase (Mitose-Phase) (Pawlik and Keyomarsi, 2004, Kirthi Koushik et al., 2013).

Bereits nach einer 1-stündigen Inkubation mit 10µg/ml ZnO-Nanopartikeln ohne anschließende Bestrahlung fielen bei der morphologischen Untersuchung der A549-Zellen Größen- und Formveränderungen der Zellen auf, sowie eine Expansion des Interzellularraums. Bei erhöhter Konzentration von 100µg/ml wurden diese morphologischen Veränderungen noch deutlicher. In Studien zu den zellmorphologischen Veränderungen nach Exposition von A549-Zellen mit ZnO-Nanopartikeln wurden ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Zellmorphologie beschrieben. Yang et al. schreiben die akute Toxizität durch ZnO-Nanopartikel in A549-Zellen hauptsächlich der frühen Membranschädigung zu (Yang et al., 2012). Sie konnten bereits nach einstündiger Inkubation mit 100µg/ml ZnO-Nanopartikeln

Zellmembranschäden in A549-Zellen demonstrieren (Yang et al., 2012). Diese verschlimmern sich mit zunehmender Inkubationsdauer und nach 4-stündiger Inkubation konnten sie „Löcher“ in der Zellmembran sowie Adhäsions- bzw. Zellkontaktverluste feststellen (Yang et al., 2012). In Kombination mit anschließender fraktionierter Bestrahlung mit 4 Gy waren die Unterschiede in der Zellmorphologie gegenüber denen unbehandelter Zellen besonders deutlich zu erkennen (*siehe 4. Ergebnisse Abb. 4.16*). Außerdem fand sich eine insgesamt reduzierte Anzahl an Zellen im Bildausschnitt. Zwischen den Zellen waren kaum noch Zell-Zell-Kontakte vorhanden und die Zellen erschienen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlich vergrößert und in ihrer Form selbst verändert. Die Zellen erschienen runder und zeigten filopodienartige Ausläufer.

Diese beschriebenen Größen- und Formveränderungen sprechen für eine erhebliche Schädigung der Tumorzellen durch die erfolgte Behandlung. Die Auflösung der Zellintegrität und der Verlust der Zell-Zell-Kontakte deutet auf einen Funktionsverlust und letztlich auch ein Absterben der Zellen hin. Durch die kombinierte Behandlung der Zellen mit ZnO-Nanopartikeln und fraktionierter Bestrahlung kann von einer verstärkten Schädigung der Zellen ausgegangen werden.

5.3 Das Chorioallantoismembran (CAM)-Modell

5.3.1 Hintergrund

Die Bedeutung dieses Versuchsteils liegt in der Beschreibung und Etablierung methodischer Aspekte und einer möglichen Verwendung für weiterführende Versuche der Arbeitsgruppe. Die zugrunde liegende Idee ist die Evaluation der *in vitro* Ergebnisse hinsichtlich einer Strahleneffizienzsteigerung durch Nanopartikel in einer komplexeren *in vivo* Situation. Dazu sollte im Rahmen meiner Dissertation das CAM-Modell zunächst adäquat etabliert und eine erfolgreiche Implantation solider Tumore auf der Chorioallantoismembran erzielt werden. [REDACTED] hat im weiteren Versuchsverlauf der Arbeitsgruppe die Tumolvaskularisierung im CAM-Modell genauer untersucht (Kraft, 2020).

5.3.2 Durchführung des Chorioallantoismembran (CAM)-Modells

Das Chorioallantoismembran-Modell bietet einen Ansatz für verschiedene Forschungsmöglichkeiten. Es wird für die Untersuchung von Tumorwachstum und -vaskularisierung, Metastasierungsverhalten von Tumoren und die Erforschung neuer Therapieansätze genutzt. Erste Versuche der Tumorimplantation im CAM-Modell gehen bereits zurück bis in das letzte Jahrhundert, um 1912 (Murphy and Rous, 1912). Aufgrund seiner zahlreichen Vorteile hat es sich in den vergangenen Jahrzehnten als geeignetes Zwischenmodell zwischen Zell- und Tierversuch in der Forschung etabliert. Die Kommunikation von Zellen in einem solchen dreidimensionalen Modell ist weitaus vielschichtiger als bei Zellen in einer Monolayer-Kultur. Außerdem gilt es im Vergleich zu anderen *in vivo* Systemen als schnell reproduzierbar, kostengünstig und einfach in der Handhabung (Kue et al., 2015). In der Literatur finden sich verschiedene Methoden zur Durchführung des CAM-Modells (Kunzi-Rapp et al., 1999, Kunzi-Rapp et al., 2001, Borges et al., 2003, Auerbach et al., 1974). Meine Versuche wurde in der *in ovo* Methode durchgeführt, bei der die CAM und der aviane Embryo während der Versuchszeit im Hühnerei verbleiben.

In der Handhabung ergaben sich während der Versuchsdurchführung jedoch mehrere Problemstellungen. Bereits durch den Transport war zu Beginn ein hoher Ausfall an Eiern zu verzeichnen, was die Frage nach einer verbesserten Lagerungsmöglichkeit

während des Transportprozesses aufwarf. Es wurde folglich während der Lieferung auf eine erhöhte Polsterung durch Luftpolsterfolie geachtet. In den ersten Versuchsdurchgängen zeigte sich die Anfälligkeit des Modells. Besonders Pilzinfektionen stellten ein häufiges Problem dar. Ursächlich für diese erhöhte Anfälligkeit ist das noch unreife Immunsystem der Hühnerembryonen, da sich das lymphoide System erst in späteren Stadien vollständig entwickelt (Deryugina and Quigley, 2008). Aufgrund dessen wurde neben der mechanischen Reinigung der Eier selbst auch die tägliche Desinfektion der Inkubatoren mittels 70% Ethanol in das Versuchsprotokoll aufgenommen. Tatsächlich stellte die in der Literatur beschriebene hohe Mortalitätsrate der avianen Embryonen (20-25%) in Folge der Manipulation am Ei auch ein Hauptproblem während unserer Versuche dar (Li et al., 2015, Sys et al., 2013).

5.3.3 Ergebnisse und Auswertung des CAM-Modells

5.3.3.1 Die erfolgreiche Implantation von Tumoren auf der CAM

In den Versuchen gelang es dreidimensionale Tumore auf der CAM zu entwickeln. Bereits in der makroskopischen Beurteilung schienen die Tumore gut zu wachsen. Eine detaillierte makroskopische Beurteilung des Tumors gestaltet sich bei der *in ovo*-Methode jedoch schwierig. Es erfolgte eine histologische Aufbereitung und HE-Färbung der Präparate. Auf diese Weise konnten die Tumore im Gewebe der Chorioallantoismembran genauer detektiert und die Tumorzellen besser beurteilt werden. Außerdem ließ sich die maligne Dignität der Zellen durch den Nachweis verschiedener zellulärer Atypien bestätigen. Zu diesen morphologischen Veränderungen in Tumorzellen zählen Unterschiede in der Zellkernstruktur, wie Größe und Form oder auch Anzahl und Größe der Nukleoli (Kernkörperchen), sowie Chromatinveränderungen (Zink et al., 2004).

Viele dieser charakteristischen Veränderungen konnten in den H.E.-Präparaten nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Vergrößerung der Zellkerne mit ausgeprägter Verschiebung der Zell-Plasma-Relation zugunsten der Kerne. Im direkten Vergleich zueinander wurden außerdem Form- und Größenunterschiede zwischen den Kernen (Polymorphismus) deutlich. Auch die Kernkörperchen schienen prominent und vergrößert. All diese Beobachtungen sprechen für eine erhöhte

Kernaktivität und die maligne Dignität der Zellen und bestätigen letztlich die erfolgreiche Tumorzellinvasion in das Stroma der Chorioallantoismembran.

5.3.3.2 Mögliche Optimierungen der Versuchsbedingungen

Aufgrund der fehlenden immunologischen Prozesse ist das Tumorwachstum auf der CAM beschleunigt (Deryugina and Quigley, 2008). Aber es sollte bei der Versuchsauswertung bedacht werden, dass das CAM-Assay als *in vivo*-Methode natürlichen Schwankungen unterliegt und die Tumorgöße somit variieren kann. Die Größe der Tumore ist aber für zukünftige Versuche entscheidend, unter anderem um Durchführung und Beobachtung zu erleichtern. Da das CAM-Modell aus ethischen Gesichtspunkten durch die Entwicklungszeit des Embryos zeitlich eng begrenzt ist, gestaltet sich eine Ausdehnung des Beobachtungszeitraums des Versuchs schwierig. Um dennoch eine längere Wachstumszeit für den Tumor zu erreichen, kann zunächst ein dreidimensionaler Tumor *in vitro* angezüchtet werden und erst anschließend auf die eigentlich zu untersuchende Chorioallantoismembran implantiert werden. Auf diese Weise wäre es möglich, den Versuch im CAM-Modell direkt mit einer größeren Tumormasse zu beginnen. Es wäre außerdem denkbar, den Beobachtungszeitraum indirekt zu verlängern, indem derselbe Tumor nacheinander auf mehreren CAMs implantiert wird. Nach Ende des ethisch festgelegten Versuchszeitraums der ersten verwendeten Chorioallantoismembran, könnte der Tumor vorsichtig abpräpariert und auf eine neue, „jüngere“ CAM implantiert werden. Dadurch könnte ebenfalls eine längere Wachstumszeit für den Tumor garantiert und letztlich größere Tumore erzielt werden.

Eine weitere entscheidende Komponente des Tumorwachstums ist die Nährstoffversorgung der Tumore. Tumore benötigen wie normales Gewebe auch diverse Nährstoffe und Sauerstoff sowie die Möglichkeit der Entsorgung metabolischer Abfallprodukte und Kohlenstoffdioxids (Hanahan and Weinberg, 2011). Es ist bekannt, dass bis zu einer Tumorgöße von 1-2mm ebendiese Nährstoffe und der benötigte Sauerstoff durch einfache Diffusion absorbiert werden können (Ferrara, 2004). Größere Tumore garantieren eine suffiziente Sauerstoffversorgung durch die Tumorangio-genese (Hanahan and Weinberg, 2011, Horsman and Vaupel, 2016). VEGF (*vascular endothelial growth factor*) stellt den Schlüsselmediator der Tumorangio-genese dar und wird unter anderem durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie FGF (*fibroblast growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*),

TNF (*tumor necrosis factor*), TGF (*transforming growth factor*), IL-1 (*interleukin-1*) (Ferrara, 2004) oder hypoxiebedingt vermehrt exprimiert (Carmeliet, 2005). Es wäre denkbar, durch direkte Zugabe von VEGF oder durch Schaffung hypoxischer Bedingungen im Tumor, die Tumorangiogenese zu steigern und dadurch das Tumorwachstum auf der CAM zu fördern.

5.4 Ausblick

Ich habe durch die *in vitro* Versuche zeigen können, dass die additive Inkubation der Tumorzellen mit ZnO-Nanopartikeln das Zellüberleben verstärkt senkt und möglicherweise als Kombinationstherapie die Effizienz der Bestrahlung steigern kann. Die Untersuchung morphologischer Veränderungen nach fraktionierter Bestrahlung und Nanopartikelinkubation spricht für einen Funktionsverlust und ein Absterben der Tumorzellen. Welcher Mechanismus dabei die Haupttoxizitätskomponente der ZnO-Nanopartikel auf die A549-Tumorzellen darstellt, bleibt offen. Es gilt, die gemachten Beobachtungen durch weiterführenden *in vivo* Testungen zu evaluieren. Das CAM-Modell eignet sich für die Versuchskonstellation zunächst sehr gut. Meine Ergebnisse haben gezeigt, dass die implantierten Tumore durchaus gute Bedingungen haben, auf der CAM zu wachsen. Diese dreidimensionalen Tumore können folglich untersucht werden und analog zum durchgeführten Zellversuch eine kombinierte Behandlung aus Nanopartikeln und Bestrahlung erhalten. Das Ziel dieser Kombinationstherapie sollte es letztlich sein, die Toxizität der Nanopartikel gezielt gegen Tumorzellen einzusetzen. Neben der Etablierung neuer Methoden könnten durch die additive therapeutische Verwendung der Partikel so auch bereits bestehende Therapieansätze wie hier die Radiatio in ihrer Wirksamkeit und Effizienz verbessert werden. In den Versuchen gelang es dreidimensionale Tumore auf der CAM zu entwickeln. Vor dem Hintergrund einer Optimierung des Tumorwachstums sowie für zukünftige Therapieversuche im CAM-Modell, ist eine weiterführende Untersuchung der Tumore und der Tumorangiogenese durch [REDACTED] erfolgt (Kraft, 2020). Abschließend gilt es zu beachten, dass das gewählte CAM-Modell durch das fehlende Immunsystem und die dadurch fehlende Interaktion zwischen Tumor und Zellen des Immunsystems nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit mit dem Tumorwachstum in anderen *in vivo*-Modellen bzw. im Menschen erlaubt. Letztlich sollte also das Maus-Modell als eine vergleichbare *in vivo* Testung erfolgen.

6. Zusammenfassung

Die bisherige Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist durch die starken Nebenwirkungen der Medikamente und eine zunehmende Strahlenresistenz limitiert. Die Lokalisation der Tumore und ihre enge topographische Beziehung zu wichtigen Strukturen erschwert außerdem oft die operative Zugänglichkeit. Folglich ist es wichtig, neue Therapieansätze zu erforschen und zu etablieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Effizienzsteigerung der Strahlentherapie durch die additive Behandlung mit ZnO-Nanopartikeln an epithelialen Tumorzellen der Linie A549 untersucht. Dazu wurde zunächst ein Kolonie-Assay durchgeführt und anschließend die Überlebensfraktion als Maß für das Zellüberleben analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten ZnO-Nanopartikel-Konzentrationen (0,1µg/ml; 10µg/ml; 100µg/ml) das Zellüberleben signifikant senken. Bei Betrachtung der Inkubationsdauer zeigte sich bei 4-stündiger Inkubation eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens. Nach der kombinierten Behandlung aus 4-stündiger Inkubation mit 100µg/ml ZnO-NP und anschließender Bestrahlung mit 8 Gy konnte die *Surviving Fraction*, als Maß für das Tumorzellüberleben, um nahezu 100% (98,20% +/- 0,70) gesenkt werden.

Durch die mikroskopische Untersuchung der zellmorphologischen Unterschiede zwischen unbehandelten, mit ZnO-Nanopartikeln inkubierten und fraktioniert bestrahlten Tumorzellen konnte auch eine Aussage über eine mögliche Zellschädigung durch die kombinierte Behandlung gemacht werden. Die Versuche zeigten erhebliche Größen- und Formveränderungen der behandelten Tumorzellen, sowie eine Abnahme der Zelldichte und der Zell-Zell-Kontakte. Das Ausmaß dieser morphologischen Veränderungen nahm vor allem mit steigender Bestrahlungsdosis, aber auch mit steigender Konzentration der ZnO-Nanopartikel zu. Die Ergebnisse des Kolonie-Assays und die beobachteten zellmorphologischen Veränderungen zeigen also eine verstärkte Zellschädigung der Tumorzellen durch die kombinierte Behandlung aus ZnO-Nanopartikeln und Bestrahlung und sprechen für mögliche strahlensensibilisierende Eigenschaften der Nanopartikel.

Dies gilt es zukünftig in weiterführenden Versuchen in einer komplexeren *in vivo* Situation zu überprüfen. Dazu war im Rahmen dieser Doktorarbeit zunächst die Untersuchung der Tumorinvasion im CAM-Modell geplant. Als Bindeglied zwischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen bietet das CAM-Modell in der Forschung die Möglichkeit

Zusammenfassung

der Untersuchung und Visualisierung verschiedener Versuchsparameter wie Tumorwachstum, Angiogenese oder Auswirkungen therapeutischer Applikationen.

Die Auswertung erfolgte mittels histologischer Aufarbeitung der Präparate und H.E.-Färbung. Anschließend wurden die Schnitte unter dem Mikroskop untersucht. Die Untersuchung der Objektträger bestätigte eine erfolgreiche Tumorimplantation.

Die gewonnenen Ergebnisse dieser Doktorarbeit sind motivierend für weiterführende Untersuchungen im CAM-Modell.

7. Literaturverzeichnis

- ADELSTEIN, D. J., LI, Y., ADAMS, G. L., WAGNER, H., JR., KISH, J. A., ENSLEY, J. F., SCHULLER, D. E. & FORASTIERE, A. A. 2003. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 21, 92-8.
- AKHTAR, M. J., AHAMED, M., KUMAR, S., KHAN, M. M., AHMAD, J. & ALROKAYAN, S. A. 2012. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine*, 7, 845-57.
- ALLISON, A. C., HARRINGTON, J. S. & BIRBECK, M. 1966. An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J Exp Med*, 124, 141-54.
- ARGIRIS, A., KARAMOZIS, M. V., RABEN, D. & FERRIS, R. L. 2008. Head and neck cancer. *Lancet*, 371, 1695-709.
- AUERBACH, R., KUBAI, L., KNIGHTON, D. & FOLKMAN, J. 1974. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol*, 41, 391-4.
- AUSPRUNK, D. H., KNIGHTON, D. R. & FOLKMAN, J. 1975. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am J Pathol*, 79, 597-618.
- BAOUM, A., DHILLON, N., BUCH, S. & BERKLAND, C. 2010. Cationic surface modification of PLG nanoparticles offers sustained gene delivery to pulmonary epithelial cells. *J Pharm Sci*, 99, 2413-22.
- BAYER, O., KRUGER, M., KOUTSIMPELAS, D., EMRICH, K., RESSING, M., ZEISSIG, S. R., SIMON, C. & SINGER, S. 2015. [Changes in Incidence and Mortality Trends of Head and Neck Cancer in Rhineland-Palatinate, 2000-2009]. *Laryngorhinootologie*, 94, 451-8.
- BLOT, W. J., MCLAUGHLIN, J. K., WINN, D. M., AUSTIN, D. F., GREENBERG, R. S., PRESTON-MARTIN, S., BERNSTEIN, L., SCHOENBERG, J. B., STEMHAGEN, A. & FRAUMENI, J. F., JR. 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 48, 3282-7.
- BONNER, J. A., HARARI, P. M., GIRALT, J., AZARNIA, N., SHIN, D. M., COHEN, R. B., JONES, C. U., SUR, R., RABEN, D., JASSEM, J., OVE, R., KIES, M. S., BASELGA, J., YOUSOUFIAN, H., AMELLAL, N., ROWINSKY, E. K. & ANG, K. K. 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 354, 567-78.
- BORGES, J., TEGTMEIER, F. T., PADRON, N. T., MUELLER, M. C., LANG, E. M. & STARK, G. B. 2003. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. *Tissue Eng*, 9, 441-50.
- BRACHMAN, D. G., GRAVES, D., VOKES, E., BECKETT, M., HARAF, D., MONTAG, A., DUNPHY, E., MICK, R., YANDELL, D. & WEICHELBAUM, R. R. 1992. Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res*, 52, 4832-6.
- BRANNON-PEPPAS, L. & BLANCHETTE, J. O. 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 56, 1649-59.
- BRENNER, D. & MAK, T. W. 2009. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 871-7.
- BRIEGER, J., KATTWINKEL, J., BERRES, M., GOSEPATH, J. & MANN, W. J. 2007. Impact of vascular endothelial growth factor release on radiation resistance. *Oncol Rep*, 18, 1597-601.
- BRIGGER, I., DUBERNET, C. & COUVREUR, P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 631-51.

- BRUININK, A., WANG, J. & WICK, P. 2015. Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. *Arch Toxicol*, 89, 659-75.
- BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG (BMBF), VDI TECHNOLOGIEZENTRUM GMBH, DR. WOLFGANG LUTHER, DR. LEIF BRAND. 2013. *nano.DE-Report 2013 – Status quo der Nanotechnologie in Deutschland* [Online]. Available: www.nanopartikel.info/projekte/laufende-projekte/innomat-life/veroeffentlichungen-innomat-life/9-news-de/1680-nano-de-report-2013-status-quo-der-nanotechnologie-in-deutschland-veroeffentlicht [Accessed 22.03.2018].
- CARMELIET, P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10.
- CHEN, T., YAN, J. & LI, Y. 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *J Food Drug Anal*, 22, 95-104.
- CHENG, B., SHI, W., RUSSELL-TANNER, J. M., ZHANG, L. & SAMULSKI, E. T. 2006. Synthesis of variable-aspect-ratio, single-crystalline ZnO nanostructures. *Inorg Chem*, 45, 1208-14.
- CHIANG, H. M., XIA, Q., ZOU, X., WANG, C., WANG, S., MILLER, B. J., HOWARD, P. C., YIN, J. J., BELAND, F. A., YU, H. & FU, P. P. 2012. Nanoscale ZnO induces cytotoxicity and DNA damage in human cell lines and rat primary neuronal cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 12, 2126-35.
- CHITHRANI, B. D. & CHAN, W. C. 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett*, 7, 1542-50.
- CHITHRANI, B. D., GHAZANI, A. A. & CHAN, W. C. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*, 6, 662-8.
- CHO, K., WANG, X., NIE, S., CHEN, Z. G. & SHIN, D. M. 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 1310-6.
- CHO, W. S., DUFFIN, R., HOWIE, S. E., SCOTTON, C. J., WALLACE, W. A., MACNEE, W., BRADLEY, M., MEGSON, I. L. & DONALDSON, K. 2011. Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. *Part Fibre Toxicol*, 8, 27.
- CIMPEAN, A. M., RIBATTI, D. & RAICA, M. 2008. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis*, 11, 311-9.
- COHEN, J. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, Hillsdale, N.J., L. Erlbaum Associates.
- COLEVAS, A. D. 2006. Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*, 24, 2644-52.
- DELOUISE, L. A. 2012. Applications of nanotechnology in dermatology. *J Invest Dermatol*, 132, 964-75.
- DENG, X., LUAN, Q., CHEN, W., WANG, Y., WU, M., ZHANG, H. & JIAO, Z. 2009. Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnology*, 20, 115101.
- DERYUGINA, E. I. & QUIGLEY, J. P. 2008. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol*, 130, 1119-30.
- DHALIWAL, S. S. 1959. Quantitative studies with MH2 reticulo endothelioma virus. *Br J Cancer*, 13, 685-92.
- DIZDAROGLU, M., JARUGA, P., BIRINCIOGLU, M. & RODRIGUEZ, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*, 32, 1102-15.
- DOHLE, D. S., PASA, S. D., GUSTMANN, S., LAUB, M., WISSLER, J. H., JENNISSSEN, H. P. & DUNKER, N. 2009. Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works. *J Vis Exp*.

- DUNN, B. E., GRAVES, J. S. & FITZHARRIS, T. P. 1981. Active calcium transport in the chick chorioallantoic membrane requires interaction with the shell membranes and/or shell calcium. *Developmental Biology*, 88, 259-268.
- FAROKHZAD, O. C. & LANGER, R. 2009. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3, 16-20.
- FERRARA, N. 2004. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*, 9 Suppl 1, 2-10.
- FLORENCE, A. T. 1997. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res*, 14, 259-66.
- FORSHIER, S. 2008. *Essentials of Radiation, Biology and Protection, 2nd Edition*, Clifton Park, NY : Delmar, c2009, Cengage Learning.
- FUCHS, A. & LINDENBAUM, E. S. 1988. The two- and three-dimensional structure of the microcirculation of the chick chorioallantoic membrane. *Acta Anat (Basel)*, 131, 271-5.
- FUKUI, H., HORIE, M., ENDOH, S., KATO, H., FUJITA, K., NISHIO, K., KOMABA, L. K., MARU, J., MIYAUHI, A., NAKAMURA, A., KINUGASA, S., YOSHIDA, Y., HAGIHARA, Y. & IWAHASHI, H. 2012. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chem Biol Interact*, 198, 29-37.
- FULCHER, C. D., HAIGENTZ, M., JR., OW, T. J., EDUCATION COMMITTEE OF THE AMERICAN, H. & NECK, S. 2018. AHNS Series: Do you know your guidelines? Principles of treatment for locally advanced or unresectable head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 40, 676-686.
- GEISER, M. 2010. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 23, 207-17.
- GEORG LÖFFLER, Petro E. Petrides, PETER C. HEINRICH 2006. *Biochemie & Pathobiochemie*, Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- GEORGE, S., POKHREL, S., XIA, T., GILBERT, B., JI, Z., SCHOWALTER, M., ROSENAUER, A., DAMOISEAUX, R., BRADLEY, K. A., MADLER, L. & NEL, A. E. 2010. Use of a rapid cytotoxicity screening approach to engineer a safer zinc oxide nanoparticle through iron doping. *ACS Nano*, 4, 15-29.
- GRANDIS, J. R. & TWEARDY, D. J. 1993. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res*, 53, 3579-84.
- GREGORIADIS, G. & NEERUNJUN, E. D. 1975. Treatment of tumour bearing mice with liposome-entrapped actinomycin D prolongs their survival. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 10, 351-62.
- GUO, D., WU, C., JIANG, H., LI, Q., WANG, X. & CHEN, B. 2008. Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. *J Photochem Photobiol B*, 93, 119-26.
- HACKENBERG, S. & KLEINSASSER, N. 2012. Dermal toxicity of ZnO nanoparticles: a worrying feature of sunscreen? *Nanomedicine (Lond)*, 7, 461-3.
- HACKENBERG, S., SCHERZED, A., TECHNAU, A., KESSLER, M., FROELICH, K., GINZKEY, C., KOEHLER, C., BURGHARTZ, M., HAGEN, R. & KLEINSASSER, N. 2011a. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. *Toxicol In Vitro*, 25, 657-63.
- HACKENBERG, S., ZIMMERMANN, F. Z., SCHERZED, A., FRIEHS, G., FROELICH, K., GINZKEY, C., KOEHLER, C., BURGHARTZ, M., HAGEN, R. & KLEINSASSER, N. 2011b. Repetitive exposure to zinc oxide nanoparticles induces dna damage in human nasal mucosa mini organ cultures. *Environ Mol Mutagen*, 52, 582-9.

- HALLIWELL, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344, 721-4.
- HALLIWELL, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141, 312-22.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANLEY, C., LAYNE, J., PUNNOOSE, A., REDDY, K. M., COOMBS, I., COOMBS, A., FERIS, K. & WINGETT, D. 2008. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology*, 19, 295103.
- HANLEY, C., THURBER, A., HANNA, C., PUNNOOSE, A., ZHANG, J. & WINGETT, D. G. 2009. The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction. *Nanoscale Res Lett*, 4, 1409-20.
- HARISINGHANI, M. G., BARENTSZ, J., HAHN, P. F., DESERNO, W. M., TABATABAEI, S., VAN DE KAA, C. H., DE LA ROSETTE, J. & WEISSLEDER, R. 2003. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N Engl J Med*, 348, 2491-9.
- HARRIS, J. J. 1958. The human tumor grown in the egg. *Ann N Y Acad Sci*, 76, 764-9; discussion 769-74.
- HASHIZUME, H., BALUK, P., MORIKAWA, S., MCLEAN, J. W., THURSTON, G., ROBERGE, S., JAIN, R. K. & MCDONALD, D. M. 2000. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*, 156, 1363-80.
- HEIM, J., FELDER, E., TAHIR, M. N., KALTBEITZEL, A., HEINRICH, U. R., BROCHHAUSEN, C., MAILANDER, V., TREMEL, W. & BRIEGER, J. 2015. Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale*, 7, 8931-8.
- HO, E., KARIMI GALOUGAHI, K., LIU, C. C., BHINDI, R. & FIGTREE, G. A. 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol*, 1, 483-91.
- HOBBS, C. G., STERNE, J. A., BAILEY, M., HEYDERMAN, R. S., BIRCHALL, M. A. & THOMAS, S. J. 2006. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*, 31, 259-66.
- HOET, P. H., BRUSKE-HOHLFELD, I. & SALATA, O. V. 2004. Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology*, 2, 12.
- HORIE, M., KATO, H., FUJITA, K., ENDOH, S. & IWAHASHI, H. 2012. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem Res Toxicol*, 25, 605-19.
- HORIE, M., NISHIO, K., FUJITA, K., ENDOH, S., MIYAUCHI, A., SAITO, Y., IWAHASHI, H., YAMAMOTO, K., MURAYAMA, H., NAKANO, H., NANASHIMA, N., NIKI, E. & YOSHIDA, Y. 2009a. Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chem Res Toxicol*, 22, 543-53.
- HORIE, M., NISHIO, K., FUJITA, K., KATO, H., NAKAMURA, A., KINUGASA, S., ENDOH, S., MIYAUCHI, A., YAMAMOTO, K., MURAYAMA, H., NIKI, E., IWAHASHI, H., YOSHIDA, Y. & NAKANISHI, J. 2009b. Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release. *Chem Res Toxicol*, 22, 1415-26.
- HORSMAN, M. R. & VAUPEL, P. 2016. Pathophysiological Basis for the Formation of the Tumor Microenvironment. *Front Oncol*, 6, 66.
- HSIAO, I. L. & HUANG, Y. J. 2011. Titanium oxide shell coatings decrease the cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Chem Res Toxicol*, 24, 303-13.
- HUANG, S. M., BOCK, J. M. & HARARI, P. M. 1999. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res*, 59, 1935-40.

- IVERSEN, T. G., SKOTLAND, T. & SANDVIG, K. 2011. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6, 176-185.
- JAHN, M. R., NAWROTH, T., FUTTERER, S., WOLFRUM, U., KOLB, U. & LANGGUTH, P. 2012. Iron Oxide/Hydroxide Nanoparticles with Negatively Charged Shells Show Increased Uptake in Caco-2 Cells. *Molecular Pharmaceutics*, 9, 1628-1637.
- JAIN, S., COULTER, J. A., HOUNSELL, A. R., BUTTERWORTH, K. T., MCMAHON, S. J., HYLAND, W. B., MUIR, M. F., DICKSON, G. R., PRISE, K. M., CURRELL, F. J., O'SULLIVAN, J. M. & HIRST, D. G. 2011. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 79, 531-9.
- JAISWAL, M., LARUSSO, N. F., BURGART, L. J. & GORES, G. J. 2000. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*, 60, 184-90.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.
- KAMBE, T. 2011. An overview of a wide range of functions of ZnT and Zip zinc transporters in the secretory pathway. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75, 1036-43.
- KAO, Y. Y., CHEN, Y. C., CHENG, T. J., CHIUNG, Y. M. & LIU, P. S. 2012. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicol Sci*, 125, 462-72.
- KARAMOUZIS, M. V., GRANDIS, J. R. & ARGIRIS, A. 2007. Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas. *JAMA*, 298, 70-82.
- KAYE, P., YOUNG, H. & O'SULLIVAN, I. 2002. Metal fume fever: a case report and review of the literature. *Emerg Med J*, 19, 268-9.
- KEILHOLZ, U. 07/2012. Diagnostik und moderne Therapie von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. *ONKOLOGIE heute*, 36-40.
- KIRTHI KOUSHIK, A. S., HARISH, K. & AVINASH, H. U. 2013. Principles of radiation oncology: a beams eye view for a surgeon. *Indian J Surg Oncol*, 4, 255-62.
- KLEIN, J. D. & GRANDIS, J. R. 2010. The molecular pathogenesis of head and neck cancer. *Cancer Biol Ther*, 9, 1-7.
- KRAFT, A. 2020. Analyse von ZnO-Nanopartikeln als Adjuvans in der Strahlentherapie. Mainz.
- KRUG, H. F. & WICK, P. 2011. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50, 1260-78.
- KUE, C. S., TAN, K. Y., LAM, M. L. & LEE, H. B. 2015. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Exp Anim*, 64, 129-38.
- KUNZI-RAPP, K., GENZE, F., KUFER, R., REICH, E., HAUTMANN, R. E. & GSCHWEND, J. E. 2001. Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. *J Urol*, 166, 1502-7.
- KUNZI-RAPP, K., RUCK, A. & KAUFMANN, R. 1999. Characterization of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term in vivo system for human skin. *Arch Dermatol Res*, 291, 290-5.
- KUO, L. J. & YANG, L. X. 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22, 305-9.
- LANONE, S. & BOCZKOWSKI, J. 2006. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. *Curr Mol Med*, 6, 651-63.
- LEE, H., LEE, E., KIM, D. K., JANG, N. K., JEONG, Y. Y. & JON, S. 2006. Antibiofouling polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging. *J Am Chem Soc*, 128, 7383-9.

- LENZ, A. G., KARG, E., BRENDEL, E., HINZE-HEYN, H., MAIER, K. L., EICKELBERG, O., STOEGER, T. & SCHMID, O. 2013. Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions. *Biomed Res Int*, 2013, 652632.
- LI, M., PATHAK, R. R., LOPEZ-RIVERA, E., FRIEDMAN, S. L., AGUIRRE-GHISO, J. A. & SIKORA, A. G. 2015. The In Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an Efficient Xenograft Model of Hepatocellular Carcinoma. *J Vis Exp*.
- LIANG, K., ANG, K. K., MILAS, L., HUNTER, N. & FAN, Z. 2003. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57, 246-54.
- LICITRA, L., PERRONE, F., BOSSI, P., SUARDI, S., MARIANI, L., ARTUSI, R., OGGIONNI, M., ROSSINI, C., CANTU, G., SQUADRELLI, M., QUATTRONE, P., LOCATI, L. D., BERGAMINI, C., OLMI, P., PIEROTTI, M. A. & PILOTTI, S. 2006. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 24, 5630-6.
- LIN, W. S., XU, Y., HUANG, C. C., MA, Y. F., SHANNON, K. B., CHEN, D. R. & HUANG, Y. W. 2009. Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 25-39.
- LIU, T., LI, L., TENG, X., HUANG, X., LIU, H., CHEN, D., REN, J., HE, J. & TANG, F. 2011. Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials*, 32, 1657-68.
- LOKMAN, N. A., ELDER, A. S., RICCIARDELLI, C. & OEHLER, M. K. 2012. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci*, 13, 9959-70.
- LU, F., WU, S. H., HUNG, Y. & MOU, C. Y. 2009. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*, 5, 1408-13.
- LU, J., LIONG, M., LI, Z., ZINK, J. I. & TAMANOI, F. 2010. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small*, 6, 1794-805.
- MARCU, L., VAN DOORN, T. & OLVER, I. 2003. Cisplatin and radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer--a review of their cooperation. *Acta Oncol*, 42, 315-25.
- MARNETT, L. J. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, 424, 83-95.
- MARNETT, L. J. 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181-182, 219-22.
- MARUR, S., D'SOUZA, G., WESTRA, W. H. & FORASTIERE, A. A. 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, 11, 781-9.
- MCCAUL, J. A., GORDON, K. E., CLARK, L. J. & PARKINSON, E. K. 2002. Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. *The Lancet Oncology*, 3, 280-288.
- MISRA, S. K., DYBOWSKA, A., BERHANU, D., LUOMA, S. N. & VALSAMI-JONES, E. 2012. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Sci Total Environ*, 438, 225-32.
- MOHAMMED, R., CAVALLARO, G., KESSELS, C. G. & VILLAMOR, E. 2015. Functional differences between the arteries perfusing gas exchange and nutritional membranes in the late chicken embryo. *J Comp Physiol B*, 185, 783-96.
- MONTEIRO-RIVIERE, N. A., WIENCH, K., LANDSIEDEL, R., SCHULTE, S., INMAN, A. O. & RIVIERE, J. E. 2011. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and

- zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. *Toxicol Sci*, 123, 264-80.
- MORATIN, H., SCHERZAD, A., GEHRKE, T., ICKRATH, P., RADELOFF, K., KLEINSASSER, N. & HACKENBERG, S. 2018. Toxicological characterization of ZnO nanoparticles in malignant and non-malignant cells. *Environ Mol Mutagen*, 59, 247-259.
- MOSCHINI, E., GUALTIERI, M., COLOMBO, M., FASCIO, U., CAMATINI, M. & MANTECCA, P. 2013. The modality of cell-particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO₂ in human alveolar epithelial cells. *Toxicol Lett*, 222, 102-16.
- MROZ, R. M., SCHINS, R. P., LI, H., JIMENEZ, L. A., DROST, E. M., HOLOWNIA, A., MACNEE, W. & DONALDSON, K. 2008. Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. *Eur Respir J*, 31, 241-51.
- MUNGER, K. & HOWLEY, P. M. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 89, 213-28.
- MURPHY, J. B. & ROUS, P. 1912. The Behavior of Chicken Sarcoma Implanted in the Developing Embryo. *J Exp Med*, 15, 119-32.
- NEL, A., XIA, T., MADLER, L. & LI, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 622-7.
- NIE, S., XING, Y., KIM, G. J. & SIMONS, J. W. 2007. Nanotechnology applications in cancer. *Annu Rev Biomed Eng*, 9, 257-88.
- NOHYNEK, G. J., DUFOUR, E. K. & ROBERTS, M. S. 2008. Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin Pharmacol Physiol*, 21, 136-49.
- OH, N. & PARK, J. H. 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*, 9 Suppl 1, 51-63.
- OSSOWSKI, L. 1988. In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. *J Cell Biol*, 107, 2437-45.
- PAI, S. I. & WESTRA, W. H. 2009. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol*, 4, 49-70.
- PAPO, N., SHAHAR, M., EISENBACH, L. & SHAI, Y. 2003. A novel lytic peptide composed of DL-amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice. *J Biol Chem*, 278, 21018-23.
- PARK, H. J., SOHN, J. H., KIM, Y. J., PARK, Y. H., HAN, H., PARK, K. H., LEE, K., CHOI, H., UM, K., CHOI, I. H., PARK, J. W. & LEE, J. H. 2015. Acute exposure to silica nanoparticles aggravate airway inflammation: different effects according to surface characteristics. *Exp Mol Med*, 47, e173.
- PARKIN, D. M., BRAY, F., FERLAY, J. & PISANI, P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55, 74-108.
- PAWLIK, T. M. & KEYOMARSI, K. 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59, 928-42.
- PETERS, L. J., GOEPFERT, H., ANG, K. K., BYERS, R. M., MAOR, M. H., GUILLAMONDEGUI, O., MORRISON, W. H., WEBER, R. S., GARDEN, A. S., FRANKENTHALER, R. A. & ET AL. 1993. Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 26, 3-11.
- PEZZUTO, F., BUONAGURO, L., CAPONIGRO, F., IONNA, F., STARITA, N., ANNUNZIATA, C., BUONAGURO, F. M. & TORNESELLO, M. L. 2015. Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies. *Oncology*, 89, 125-36.
- QIU, Y., LIU, Y., WANG, L., XU, L., BAI, R., JI, Y., WU, X., ZHAO, Y., LI, Y. & CHEN, C. 2010. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 31, 7606-19.

- RASMUSSEN, J. W., MARTINEZ, E., LOUKA, P. & WINGETT, D. G. 2010. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv*, 7, 1063-77.
- RASSNER, G. 2009. *Dermatologie: Lehrbuch und Atlas*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, Prof. Dr. med. Rassner, G.
- REISZ, J. A., BANSAL, N., QIAN, J., ZHAO, W. & FURDUI, C. M. 2014. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal*, 21, 260-92.
- RENFREE, M. B., SUZUKI, S. & KANEKO-ISHINO, T. 2013. The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368, 20120151.
- RIBATTI, D., VACCA, A., RONCALI, L. & DAMMACCO, F. 1996. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol*, 40, 1189-97.
- RIES LAG, MELBERT D., KRAPCHO M, MARIOTTO A, MILLER BA, FEUER EJ, CLEGG L, HORNER MJ, HOWLADER N, EISNER MP, REICHMAN M, EDWARDS BK (EDS). 2006. *SEER Cancer Statistics Review 1975-2004* [Online]. Available: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/ [Accessed 29.09.2018].
- RISOM, L., MOLLER, P. & LOFT, S. 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res*, 592, 119-37.
- RIZZO, V., KIM, D., DURAN, W. N. & DEFOUW, D. O. 1995. Differentiation of the microvascular endothelium during early angiogenesis and respiratory onset in the chick chorioallantoic membrane. *Tissue Cell*, 27, 159-66.
- ROBERT KOCH-INSTITUT 2018. Epidemiologisches Bulletin - Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren. Epidemiologisches Bulletin N.26. Available: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/26_18.pdf?blob=publicationFile [Accessed 13.08.2018]
- ROSENTHAL, D. I., LEWIN, J. S. & EISBRUCH, A. 2006. Prevention and treatment of dysphagia and aspiration after chemoradiation for head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 24, 2636-43.
- RUBIN GRANDIS, J., MELHEM, M. F., GOODING, W. E., DAY, R., HOLST, V. A., WAGENER, M. M., DRENNING, S. D. & TWEARDY, D. J. 1998. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst*, 90, 824-32.
- RYTER, S. W., KIM, H. P., HOETZEL, A., PARK, J. W., NAKAHIRA, K., WANG, X. & CHOI, A. M. 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 9, 49-89.
- SABELLA, S., CARNEY, R. P., BRUNETTI, V., MALVINDI, M. A., AL-JUFFALI, N., VECCHIO, G., JANES, S. M., BAKR, O. M., CINGOLANI, R., STELLACCI, F. & POMPA, P. P. 2014. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*, 6, 7052-61.
- SALNIKOV, V., LUKYANENKO, Y. O., FREDERICK, C. A., LEDERER, W. J. & LUKYANENKO, V. 2007. Probing the outer mitochondrial membrane in cardiac mitochondria with nanoparticles. *Biophys J*, 92, 1058-71.
- SAYES, C. M., REED, K. L. & WARHEIT, D. B. 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci*, 97, 163-80.
- SHANKAR, A. H. & PRASAD, A. S. 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*, 68, 447S-463S.

- SONG, W., ZHANG, J., GUO, J., ZHANG, J., DING, F., LI, L. & SUN, Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol Lett*, 199, 389-97.
- SOURIS, J. S., LEE, C. H., CHENG, S. H., CHEN, C. T., YANG, C. S., HO, J. A., MOU, C. Y. & LO, L. W. 2010. Surface charge-mediated rapid hepatobiliary excretion of mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials*, 31, 5564-74.
- STERN, S. T., ADISESHIAH, P. P. & CRIST, R. M. 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol*, 9, 20.
- STURGIS, E. M. & CINCIRIPINI, P. M. 2007. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*, 110, 1429-35.
- SWIETACH, P., VAUGHAN-JONES, R. D., HARRIS, A. L. & HULIKOVA, A. 2014. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369, 20130099.
- SYS, G. M., LAPEIRE, L., STEVENS, N., FAVOREEL, H., FORSYTH, R., BRACKE, M. & DE WEVER, O. 2013. The in ovo CAM-assay as a xenograft model for sarcoma. *J Vis Exp*, e50522.
- TEPPER, L. G. J. 2016. *Clinical Radiation Oncology*, Philadelphia, Elsevir.
- TOYOOKA, T., AMANO, T. & IBUKI, Y. 2012. Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat Res*, 742, 84-91.
- TROTTI, A., BELLM, L. A., EPSTEIN, J. B., FRAME, D., FUCHS, H. J., GWEDE, C. K., KOMAROFF, E., NALYSNYK, L. & ZILBERBERG, M. D. 2003. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol*, 66, 253-62.
- TURNER, A. J. & HOOPER, N. M. 2002. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 23, 177-83.
- UNFRIED, K., ALBRECHT, C., KLOTZ, L.-O., VON MIKECZ, A., GREYER-BECK, S. & SCHINS, R. P. F. 2009. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1, 52-71.
- VALDES, T. I., KREUTZER, D. & MOUSSY, F. 2002. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res*, 62, 273-82.
- VALDIGLESIAS, V., COSTA, C., KILIC, G., COSTA, S., PASARO, E., LAFFON, B. & TEIXEIRA, J. P. 2013. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environ Int*, 55, 92-100.
- VANDEBRIEL, R. J. & DE JONG, W. H. 2012. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl*, 5, 61-71.
- VERMORKEN, J. B., MESIA, R., RIVERA, F., REMENAR, E., KAWECKI, A., ROTTEY, S., ERFAN, J., ZABOLOTNY, D., KIENZER, H. R., CUISSOL, D., PEYRADE, F., BENASSO, M., VYNNYCHENKO, I., DE RAUCOURT, D., BOKEMEYER, C., SCHUELER, A., AMELLAL, N. & HITT, R. 2008. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*, 359, 1116-27.
- VINOGRADOV, S. V., BRONICH, T. K. & KABANOV, A. V. 2002. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 135-47.
- VOGELSTEIN, B., LANE, D. & LEVINE, A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-10.
- WILHELMI, V., FISCHER, U., WEIGHARDT, H., SCHULZE-OSTHOFF, K., NICKEL, C., STAHLMECKE, B., KUHNBUSCH, T. A., SCHERBART, A. M., ESSER, C., SCHINS, R. P. & ALBRECHT, C. 2013. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS One*, 8, e65704.

- WISNER, E. R., KATZBERG, R. W., LINK, D. P., GRIFFEY, S. M., DRAKE, C. M., VESSEY, A. R., JOHNSON, D. & HALEY, P. J. 1996. Indirect computed tomography lymphography using iodinated nanoparticles to detect cancerous lymph nodes in a cutaneous melanoma model. *Academic Radiology*, 3, 40-48.
- XIA, T., KOVOCHICH, M., BRANT, J., HOTZE, M., SEMPF, J., OBERLEY, T., SIOUTAS, C., YEH, J. I., WIESNER, M. R. & NEL, A. E. 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett*, 6, 1794-807.
- XIA, T., KOVOCHICH, M., LIONG, M., MADLER, L., GILBERT, B., SHI, H., YEH, J. I., ZINK, J. I. & NEL, A. E. 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2, 2121-34.
- YAMAMORI, T., YASUI, H., YAMAZUMI, M., WADA, Y., NAKAMURA, Y., NAKAMURA, H. & INANAMI, O. 2012. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med*, 53, 260-70.
- YANG, X., LIU, X., LU, H., ZHANG, X., MA, L., GAO, R. & ZHANG, Y. 2012. Real-time investigation of acute toxicity of ZnO nanoparticles on human lung epithelia with hopping probe ion conductance microscopy. *Chem Res Toxicol*, 25, 297-304.
- YU, K. N., YOON, T. J., MINAI-TEHRANI, A., KIM, J. E., PARK, S. J., JEONG, M. S., HA, S. W., LEE, J. K., KIM, J. S. & CHO, M. H. 2013. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicol In Vitro*, 27, 1187-95.
- ZINK, D., FISCHER, A. H. & NICKERSON, J. A. 2004. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 4, 677-87.
- ZURUTUZA, L., MULLER, F., GIBRAT, J. F., TAILLANDIER, A., SIMON-BOUY, B., SERRE, J. L. & MORNET, E. 1999. Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. *Hum Mol Genet*, 8, 1039-46.
- ZVYAGIN, A. V., ZHAO, X., GIERDEN, A., SANCHEZ, W., ROSS, J. A. & ROBERTS, M. S. 2008. Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo. *J Biomed Opt*, 13, 064031.

8. Anhang

8.1 Modelzusammenfassung

R	Bestimmtheitsmaß (R-Quadrat)	korrigiertes Bestimmtheitsmaß (R-Quadrat)
.740	.548	.545

Tab. 8. 1 Modellzusammenfassung. Einflussfaktoren (konstant): Konzentration ZnO-NP, Inkubationszeit ZnO-NP, Bestrahlungsdosis in Gy

8.2 Regressionskoeffizienten

	β	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall (β)		T-Test
				Unteres KI	Oberes KI	
Konzentration ZnO-NP	-.002	.000	.000	-.002	-.001	-5.917
Inkubationszeit ZnO-NP	-.039	.007	.000	-.053	-.025	-5.592
Bestrahlungsdosis in Gy	-.085	.004	.000	-.092	-.077	-22.595

Tab. 8. 2 Regressionskoeffizienten. Abhängige Variable: *Surviving Fraction*

8.3 Anova

	Quadratsumme	df	Quadratisches Mittel (QMW)	F	Signifikanz
Regression	34.070	3	11.357	192.270	.000
Residual	28.115	476	.059		

Tab. 8. 3 Anova. Abhängige Variable: *Surviving Fraction*
Einflussfaktoren (konstant): Konzentration ZnO-NP, Inkubationszeit ZnO-NP, Bestrahlungsdosis in Gy

8.4 Explorative Datenanalyse der Einflussgröße Bestrahlungsdosis

Deskriptive Statistik						
Bestrahlungsdosis			Statistik	Standardfehler		
Surviving Fraction	0	Mittelwert	,82273	,020088		
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	,78295 ,86250		
		5% getrimmtes Mittel		,83368		
		Median		,98100		
		Varianz		,048		
		Standardabweichung		,220057		
		Minimum		,121		
		Maximum		1,071		
		Spannweite		,950		
		Interquartilbereich		,349		
		Schiefe		-,621	,221	
		Kurtosis		-,735	,438	
			2	Mittelwert	,80514	,025820
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	,75401 ,85626
5% getrimmtes Mittel				,82483		
Median				,95919		
Varianz				,080		
Standardabweichung				,282849		
Minimum				,038		
Maximum				1,135		
Spannweite				1,097		
Interquartilbereich				,364		
Schiefe				-1,086	,221	
Kurtosis				,346	,438	
	4			Mittelwert	,66127	,027933
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	,60596 ,71658
		5% getrimmtes Mittel		,66700		
		Median		,55783		
		Varianz		,094		
		Standardabweichung		,305995		
		Minimum		,005		

Tab. 8. 4 Explorative Datenanalyse der Einflussgröße Bestrahlungsdosis [Gy]

8.5 Explorative Datenanalyse der Einflussgröße ZnO-NP-Konzentration

Deskriptive Statistik						
Konzentration			Statistik	Standardfehler		
Surviving Fraction	0	Mittelwert	,78643	,022064		
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	,74296 ,82989		
		5% getrimmtes Mittel		,81196		
		Median		,97758		
		Varianz		,117		
		Standardabweichung		,341814		
		Minimum		,004		
		Maximum		1,135		
		Spannweite		1,131		
		Interquartilbereich		,526		
		Schiefe		-1,103	,157	
		Kurtosis		-,324	,313	
			1	Mittelwert	,42132	,027960
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	,36567 ,47698
5% getrimmtes Mittel				,42683		
Median				,49198		
Varianz				,063		
Standardabweichung				,250081		
Minimum				,011		
Maximum				,733		
Spannweite				,722		
Interquartilbereich				,492		
Schiefe				-,350	,269	
Kurtosis				-1,527	,532	
	2			Mittelwert	,42578	,027268
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	,37150 ,48005
		5% getrimmtes Mittel		,43191		
		Median		,50361		
		Varianz		,059		
		Standardabweichung		,243889		
		Minimum		,003		

Tab. 8. 5 Explorative Datenanalyse der Einflussgröße ZnO-Nanopartikel-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]

8.6 Explorative Datenanalyse der Einflussgröße ZnO-NP-Inkubationsdauer

Deskriptive Statistik			Statistik	Standardfehler		
Inkubationszeit						
Surviving Fraction	0	Mittelwert	,66546	,030555		
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	,60496 ,72596		
		5% getrimmtes Mittel		,67875		
		Median		,67145		
		Varianz		,112		
		Standardabweichung		,334718		
		Minimum		,004		
		Maximum		1,115		
		Spannweite		1,111		
		Interquartilbereich		,563		
		Schiefe		-,506	,221	
		Kurtosis		-,910	,438	
			1	Mittelwert	,64505	,031370
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	,58294 ,70717
5% getrimmtes Mittel				,65569		
Median				,66289		
Varianz				,118		
Standardabweichung				,343640		
Minimum				,003		
Maximum				1,097		
Spannweite				1,095		
Interquartilbereich				,570		
Schiefe				-,387	,221	
Kurtosis				-1,078	,438	
	2			Mittelwert	,64642	,031692
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	,58367 ,70917
		5% getrimmtes Mittel		,65556		
		Median		,65307		
		Varianz		,121		
		Standardabweichung		,347169		
		Minimum		,014		

Tab. 8. 6 Explorative Datenanalyse der Einflussgröße ZnO-Nanopartikel-Inkubationsdauer [h]

8.7 Nicht parametrische Testung (Kruskal-Wallis-Tests)

8.7.1 Einflussgröße Bestrahlungsdosis [Gy]

Stichprobe 1-Stichpr...	Test- statistik	Std. Fehler	Standard Test- statistik	Sig.	Angep. Sig.
8.4	173,121	17,907	9,668	,000	,000
8.0	238,483	17,907	13,318	,000	,000
8.2	241,262	17,907	13,473	,000	,000
4.0	65,362	17,907	3,650	,000	,002
4.2	68,142	17,907	3,805	,000	,001
0.2	-2,779	17,907	-,155	,877	1,000

Tab. 8. 7 Nicht parametrische Testung der Einflussgröße Bestrahlungsdosis. Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,5. Signifikanzen werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst. 0 = 0 Gy; 2 = 2 Gy; 4 = 4 Gy; 8 = 8 Gy; Std. Fehler = Standardfehler; Sig. = Signifikanz; Angep. Sig. = Angepasste Signifikanz

8.7.2 Einflussgröße ZnO-Nanopartikel-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]

Stichprobe 1-Stichpr...	Test- statistik	Std. Fehler	Standard Test- statistik	Sig.	Angep. Sig.
1.2	-2,738	21,931	-,125	,901	1,000
1.3	-29,550	21,931	-1,347	,178	1,000
1.0	138,438	17,907	7,731	,000	,000
2.3	-26,812	21,931	-1,223	,221	1,000
2.0	135,700	17,907	7,578	,000	,000
3.0	108,888	17,907	6,081	,000	,000

Tab. 8. 8 Nicht parametrische Testung der Einflussgröße Konzentration. Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,5. Signifikanzen werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst. 0 = 0 $\mu\text{g/ml}$; 1 = 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 2 = 10 $\mu\text{g/ml}$; 3 = 100 $\mu\text{g/ml}$; Std. Fehler = Standardfehler; Sig. = Signifikanz; Angep. Sig. = Angepasste Signifikanz

8.7.3 Einflussgröße ZnO-Nanopartikel-Inkubationsdauer [h]

Stichprobe 1-Stichpr...	Test- statistik	Std. Fehler	Standard Test- statistik	Sig.	Angep. Sig.
3.1	49,104	17,907	2,742	,006	,037
3.2	49,292	17,907	2,753	,006	,035
3.0	56,054	17,907	3,130	,002	,010
1.2	-,188	17,907	-,010	,992	1,000
1.0	6,950	17,907	,388	,698	1,000
2.0	6,762	17,907	,378	,706	1,000

Tab. 8. 9 Nicht parametrische Testung der Einflussgröße Inkubationsdauer. Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,5. Signifikanzen werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst. 0 = 0 $\mu\text{g/ml}$; 1 = 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 2 = 10 $\mu\text{g/ml}$; 3 = 100 $\mu\text{g/ml}$; Std. Fehler = Standardfehler; Sig. = Signifikanz; Angep. Sig. = Angepasste Signifikanz

8.8 Mittelwerte und Standardabweichung der *Surviving Fraction*

Bestrahlung	Inkubationsdauer	0,1µg/ml ZnO-NP		10µg/ml ZnO-NP		100µg/ml ZnO-NP	
		Mittelwert SF	SD	Mittelwert SF	SD	Mittelwert SF	SD
0 Gy	0m, -ZnO	1	0	1	0	1	0
	0m, +ZnO	0,655262996	0,007445394	0,662016423	0,009932066	0,765866429	0,199192684
	15m, -ZnO	1,01092959	0,034261736	1,014633101	0,02231188	1,006202694	0,031066783
	15m, +ZnO	0,64893932	0,010818729	0,662548006	0,024185408	0,763962292	0,211267044
	1h, -ZnO	1,01590986	0,036672033	1,013166596	0,021622953	1,024326652	0,018874844
	1h, +ZnO	0,649325679	0,014513563	0,657220772	0,03101393	0,766956598	0,210889967
	4h, -ZnO	1,008289703	0,039318254	1,017667471	0,035180473	1,015536092	0,024404073
	4h, +ZnO	0,485369967	0,007644154	0,489033446	0,016460262	0,367355506	0,281022457
2 Gy	0m, -ZnO	1,032837098	0,024560833	1,022348832	0,032470496	1,025979694	0,063328142
	0m, +ZnO	0,707647953	0,020587457	0,700078077	0,019944032	0,808104953	0,247448121
	15m, -ZnO	1,028282571	0,041687958	0,950801097	0,113960805	1,025069133	0,03549723
	15m, +ZnO	0,691075562	0,023782851	0,681815862	0,029585198	0,806223679	0,245749823
	1h, -ZnO	1,001479482	0,03025941	1,00153585	0,050657853	1,037801451	0,062113622
	1h, +ZnO	0,693418176	0,025778067	0,687490993	0,025191827	0,773899805	0,241948653
	4h, -ZnO	1,029101903	0,02973474	0,995262348	0,033666072	1,045881941	0,057653965
	4h, +ZnO	0,238182019	0,147852174	0,16651809	0,006157559	0,234248468	0,221582173
4 Gy	0m, -ZnO	0,961478119	0,064908431	0,831695363	0,230348083	0,977748369	0,061730023
	0m, +ZnO	0,49477776	0,053014626	0,486116099	0,053454126	0,651433825	0,23047489
	15m, -ZnO	0,754245707	0,22184799	0,781995967	0,205918419	0,952481219	0,129183573
	15m, +ZnO	0,463510703	0,043473801	0,469968105	0,116525841	0,707655374	0,334710805
	1h, -ZnO	0,916677027	0,089617556	0,787159556	0,197571591	0,933628221	0,267404321
	1h, +ZnO	0,489261135	0,090064414	0,511413857	0,028752306	0,69631898	0,323249756
	4h, -ZnO	0,814556056	0,210365087	0,838264547	0,058838854	0,892590273	0,297438843
	4h, +ZnO	0,182264217	0,004169996	0,176594698	0,008577049	0,072944414	0,071926781
8 Gy	0m, -ZnO	0,416316726	0,129806703	0,268459687	0,181715688	0,224959605	0,231554854
	0m, +ZnO	0,120518557	0,048564755	0,138453044	0,042695957	0,150737496	0,144334005
	15m, -ZnO	0,198601201	0,125178632	0,166117277	0,148182759	0,258088166	0,182675053
	15m, +ZnO	0,052015748	0,033801155	0,077965136	0,071551367	0,17860346	0,123034622
	1h, -ZnO	0,268408015	0,129326778	0,24693994	0,184066339	0,200621773	0,152722378
	1h, +ZnO	0,080923632	0,051693691	0,157336958	0,02763083	0,120094668	0,126414591
	4h, -ZnO	0,361411017	0,085309059	0,0964963	0,104720186	0,220876645	0,116907314
	4h, +ZnO	0,088697117	0,049737353	0,087878072	0,058439482	0,011792585	0,01268043

Tab. 8. 10 Mittelwerte und Standardabweichung der *Surviving Fraction* für die drei verschiedenen Konzentrationsreihen 0,1µg/ml ZnO-NP, 10µg/ml ZnO-NP und 100µg/ml ZnO-NP, aufgeteilt nach der jeweiligen Bestrahlungsdosis 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy und der Inkubationsdauer 0 Minuten, 15 Minuten, 1 Stunde und 4 Stunden.

8.9 Auswertung Colcount-Scanner und Berechnungen

8.9.1 Ansatz 1: 0,1µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	572	3,84	3,06	0,21	0,06	567	1	0,0945
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	562	3,97	3,31	0,21	0,06			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	568	4,02	3,12	0,23	0,05	565	0,664315109	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	562	3,87	3,01	0,22	0,06			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	596	3,62	3,16	0,21	0,06	607	1,070546737	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	618	3,72	3	0,22	0,06			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	547	4,16	3,55	0,22	0,05	548,5	0,644914756	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	550	4,38	3,53	0,22	0,05			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	607	3,5	2,84	0,21	0,06	602	1,061728395	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	597	3,33	2,5	0,21	0,06			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	544	4,04	3,33	0,24	0,07	557	0,654908877	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	570	3,93	3,02	0,23	0,06			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	611	3,38	2,62	0,23	0,06	602,5	1,062610229	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	594	3,42	2,82	0,22	0,05			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	574	3,93	3,16	0,23	0,06	564,5	0,497795414	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	555	4,17	3,46	0,23	0,06			
<hr/>										
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	576	2,92	2,38	0,21	0,06	591,5	1,043209877	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	607	3,07	2,49	0,22	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	598	2,61	1,9	0,22	0,06	605,5	0,711934156	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	613	2,78	2,2	0,23	0,06			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	596	3,21	2,58	0,23	0,05	589	1,038800705	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	582	3,11	2,3	0,23	0,05			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	583	3,55	2,74	0,24	0,06	588,5	0,691945914	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	594	3,55	2,92	0,23	0,06			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	575	2,83	1,98	0,23	0,06	577,5	1,018518519	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	580	2,76	2,1	0,23	0,06			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	600	3,13	2,37	0,24	0,06	603	0,708994709	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	606	2,94	2,39	0,25	0,06			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	573	3,01	2,25	0,23	0,05	567,5	1,000881834	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	562	2,92	2,18	0,25	0,06			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	535	3,75	3,45	0,27	0,06	540,5	0,158877131	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	546	3,92	3,42	0,27	0,05			
<hr/>										
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	580	2,73	2,28	0,2	0,05	578,5	1,020282187	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	577	2,84	2,33	0,2	0,05			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	628	3,01	2,21	0,21	0,05	613	0,540564374	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	598	3,16	2,49	0,22	0,06			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	404	1,33	1,27	0,18	0,07	403,5	0,711640212	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	403	1,35	1,39	0,18	0,07			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	533	1,42	1,8	0,18	0,07	523,5	0,461640212	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	514	1,28	1,24	0,17	0,06			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	566	2,17	1,66	0,19	0,05	557,5	0,98324515	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	549	2,24	1,9	0,2	0,06			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	594	2,54	1,92	0,22	0,06	604	0,532627866	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	614	2,27	1,6	0,22	0,06			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	495	1,9	1,53	0,2	0,06	504,5	0,889770723	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	514	2,03	1,74	0,22	0,07			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	623	2,43	1,8	0,23	0,06	634,5	0,186507937	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	646	2,42	2,06	0,23	0,06			
<hr/>										
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	529	1,69	1,98	0,16	0,06	530,5	0,623750735	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	532	1,82	2,05	0,16	0,06			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	599	1,56	2,09	0,15	0,06	595,5	0,175044092	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	592	1,77	2,33	0,14	0,06			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	102	1,22	1,84	0,14	0,06	112	0,131687243	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	122	1,51	3,73	0,13	0,07			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	260	1,86	3,26	0,1	0,04	255	0,074955908	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	250	1,99	3,45	0,11	0,04			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	329	1,12	1,02	0,16	0,07	344,5	0,40505585	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	360	1,2	1,39	0,15	0,07			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	546	1,75	3,06	0,13	0,05	551,5	0,162110523	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	557	1,78	2,62	0,14	0,05			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	315	1,2	1,14	0,15	0,07	322,5	0,379188713	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	330	1,11	1	0,16	0,07			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	414	1,71	2,73	0,12	0,05	415,5	0,122134039	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	417	1,66	2,62	0,12	0,04			

Tab. 8. 11 Excel-Tabelle: Auswertung 1. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.2 Ansatz 2: 0,1µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	598	3,46	2,64	0,21	0,06	585	1	0,0975
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	572	3,57	3,11	0,22	0,06			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	582	4,08	3,15	0,21	0,05	580	0,660968661	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	578	3,82	3,41	0,22	0,06			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	566	3,62	2,93	0,23	0,06	581	0,993162393	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	596	3,11	2,35	0,22	0,06			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	556	3,78	3	0,22	0,06	571,5	0,651282051	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	587	3,77	2,87	0,21	0,06			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	586	3,46	2,63	0,22	0,06	576	0,984615385	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	566	3,69	3,13	0,21	0,05			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	571	3,77	2,99	0,23	0,07	577	0,657549858	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	583	3,79	3	0,23	0,06			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	574	3,61	2,85	0,21	0,05	573	0,979487179	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	572	3,65	2,77	0,23	0,06			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	559	4	3,18	0,23	0,05	560	0,478632479	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	561	4,04	3,13	0,24	0,05			
<hr/>										
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	590	2,99	2,08	0,23	0,05	580	0,991452991	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	570	3,06	2,37	0,24	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	636	3,03	2,42	0,24	0,06	620,5	0,707122507	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	605	3,05	2,36	0,23	0,06			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	588	2,96	2,33	0,23	0,06	568	0,979040171	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	548	2,94	2,29	0,23	0,05			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	577	2,95	2,5	0,23	0,06	579,5	0,66039886	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	582	2,8	2,12	0,23	0,05			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	554	3,2	2,4	0,25	0,06	558	0,953846154	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	562	3,18	2,43	0,25	0,05			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	563	3,24	2,44	0,25	0,05	568	0,647293447	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	573	3,25	2,58	0,25	0,05			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	596	2,88	2,25	0,25	0,05	581,5	0,994017094	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	567	2,99	2,36	0,26	0,05			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	583	3,43	2,73	0,28	0,05	574,5	0,163675214	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	566	3,34	2,95	0,25	0,04			
<hr/>										
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	561	2,83	2,24	0,21	0,06	567,5	0,97008547	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	574	2,67	1,98	0,21	0,06			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	555	2,76	2,29	0,21	0,06	562,5	0,480769231	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	570	2,78	2,46	0,2	0,05			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	401	1,65	2,06	0,17	0,07	390,5	0,667521368	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	380	1,63	1,72	0,17	0,06			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	478	1,55	1,44	0,16	0,06	469	0,400854701	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	460	1,72	1,79	0,16	0,06			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	481	1,68	1,81	0,17	0,07	438	0,748717949	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	395	1,64	1,6	0,18	0,07			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	379	1,42	1,36	0,16	0,08	379,5	0,324358974	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	380	1,41	1,68	0,16	0,07			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	511	2,57	2,04	0,21	0,06	518	0,885470085	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	525	2,47	2,17	0,21	0,07			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	632	2,73	2,28	0,23	0,07	618	0,176068376	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	604	2,85	2,32	0,23	0,06			
<hr/>										
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	271	1,14	1,06	0,16	0,07	266	0,303133903	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	261	1,31	1,7	0,16	0,07			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	187	1,24	1,29	0,15	0,07	171,5	0,048860399	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	156	1,82	3,7	0,14	0,04			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	255	1,29	1,42	0,18	0,07	275,5	0,313960114	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	296	1,31	1,75	0,17	0,06			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	401	1,58	2,25	0,14	0,05	341,5	0,097293447	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	282	1,19	1,47	0,16	0,06			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	262	1,1	0,9	0,18	0,07	240	0,273504274	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	218	1,26	1,67	0,18	0,07			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	231	1,14	1,58	0,16	0,06	235	0,066951567	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	239	1,4	2,43	0,16	0,05			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	263	1,19	1,54	0,18	0,07	256,5	0,292307692	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	250	1,16	0,91	0,18	0,06			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	184	1,63	2,8	0,15	0,05	204,5	0,058262108	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	225	1,51	2,41	0,15	0,05			

Tab. 8. 12 Excel-Tabelle: Auswertung 2. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.3 Ansatz 3: 0,1µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	556	3,87	3,21	0,2	0,06	549	1	0,0915
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	542	3,8	3,05	0,2	0,06			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	541	4,2	3,37	0,21	0,05	540	0,655737705	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	539	4,19	3,42	0,22	0,05			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	552	3,68	2,71	0,22	0,06	542,5	0,988160291	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	533	4,09	3,38	0,22	0,05			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	550	3,92	3,14	0,21	0,06	546,5	0,663630844	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	543	3,94	3,02	0,22	0,06			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	543	4,1	2,97	0,2	0,05	547	0,996357013	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	551	3,78	2,87	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	496	4,53	3,77	0,18	0,04	514,5	0,624772313	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	533	4,39	3,5	0,2	0,05			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	550	3,8	2,99	0,2	0,05	536,5	0,97723133	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	523	4,02	3,09	0,2	0,05			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	528	4,14	3,47	0,2	0,05	536,5	0,488615665	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	545	4,12	3,47	0,2	0,04			
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	569	2,96	2,09	0,18	0,05	562	1,023679417	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	555	2,99	2,74	0,18	0,06			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	586	2,96	2,38	0,17	0,05	587,5	0,713418336	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	589	2,96	2,33	0,17	0,05			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	550	3,59	2,83	0,18	0,05	546,5	0,995446266	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	543	3,51	2,75	0,18	0,05			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	564	3,77	2,95	0,18	0,05	553	0,671523983	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	542	3,62	3,1	0,18	0,04			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	533	3,34	2,25	0,19	0,05	547	0,996357013	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	561	3,38	2,7	0,18	0,05			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	568	3,35	2,59	0,19	0,06	569,5	0,691560413	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	571	3,24	2,78	0,18	0,06			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	558	3,29	2,52	0,2	0,05	566	1,030965392	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	574	3,28	2,46	0,19	0,05			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	575	3,51	3,2	0,2	0,05	583	0,176988464	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	591	3,38	3,02	0,19	0,05			
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	550	2,58	1,89	0,18	0,05	536	0,976320583	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	522	2,61	2,15	0,19	0,05			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	570	3,38	2,58	0,21	0,05	547	0,498178506	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	524	3,2	2,61	0,2	0,04			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	217	1,39	1,19	0,15	0,06	237	0,431693989	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	257	1,34	1,34	0,16	0,06			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	501	1,61	1,37	0,16	0,06	486,5	0,443078324	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	472	1,84	2,26	0,17	0,06			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	519	2,38	1,97	0,19	0,05	521,5	0,949908925	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	524	2,35	1,75	0,18	0,05			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	539	2,46	2,05	0,18	0,05	543	0,494535519	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	547	2,34	2,14	0,18	0,05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	521	2,54	1,98	0,19	0,05	524	0,954462659	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	527	2,51	2,17	0,19	0,05			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	603	2,55	2,1	0,19	0,05	607	0,184274438	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	611	2,66	2,26	0,2	0,05			
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	230	1,57	2,15	0,15	0,06	241,5	0,293260474	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	253	1,4	2,12	0,15	0,06			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	414	1,26	1,89	0,13	0,06	388	0,117789921	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	362	1,48	2,27	0,14	0,06			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	157	1,25	1,14	0,16	0,07	152	0,184578021	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	147	1,18	0,97	0,14	0,05			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	94	1,34	2,33	0,12	0,06	75	0,02276867	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	56	1,15	1,01	0,14	0,07			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	207	1,26	1,31	0,16	0,07	213	0,258652095	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	219	1,22	1,27	0,16	0,07			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	107	1,34	2,35	0,14	0,06	111	0,033697632	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	115	1,57	3,2	0,13	0,06			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	247	1,07	1,72	0,15	0,07	261,5	0,317547055	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	276	1,24	1,78	0,15	0,06			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	269	1,25	2,25	0,13	0,06	254	0,077109897	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	239	1,06	1,26	0,13	0,05			

Tab. 8. 13 Excel-Tabelle: Auswertung 3. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.4 Ansatz 4: 0,1µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	550	4	3,01	0,19	0,06	543	1	0,0905
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	536	4,33	3,6	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	528	4,55	3,4	0,21	0,05	530	0,650705955	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	532	4,57	3,71	0,2	0,05			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	564	4,29	3,13	0,2	0,04	554	1,020257827	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	544	4,24	3,35	0,2	0,05			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	519	4,56	3,87	0,2	0,05	531,5	0,652547575	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	544	4,51	3,83	0,2	0,05			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	577	3,96	3,34	0,2	0,05	572,5	1,054327808	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	568	3,73	2,94	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	511	4,64	3,6	0,22	0,05	528	0,64825046	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	545	4,24	3,51	0,22	0,05			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	562	3,96	3,51	0,19	0,04	567	1,044198895	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	572	3,68	3,1	0,2	0,05			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	519	4,39	3,71	0,2	0,04	525	0,483425414	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	531	4,18	3,43	0,19	0,04			
<hr/>										
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	574	3,26	2,81	0,21	0,05	571	1,051565378	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	568	3,32	2,88	0,21	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	595	3,61	2,95	0,21	0,06	597	0,732965009	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	599	3,45	2,59	0,2	0,05			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	599	2,35	1,73	0,19	0,06	585	1,077348066	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	571	2,56	2,19	0,19	0,05			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	577	3,2	2,56	0,2	0,05	584	0,717004297	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	591	3	2,5	0,2	0,05			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	572	3,12	2,16	0,21	0,05	565	1,040515654	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	558	3,17	2,56	0,2	0,05			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	597	3,23	2,27	0,21	0,05	583,5	0,716390424	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	570	3,5	2,78	0,2	0,05			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	579	3,13	2,37	0,21	0,05	572,5	1,054327808	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	566	3,13	2,38	0,21	0,05			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	574	3,78	3,26	0,23	0,04	563	0,518416206	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	552	3,81	3,2	0,22	0,04			
<hr/>										
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	477	1,52	1,41	0,15	0,06	458	0,843462247	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	439	1,65	1,69	0,15	0,06			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	432	1,44	1,97	0,14	0,06	442,5	0,407458564	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	453	1,51	2,3	0,14	0,06			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	493	2,41	2,08	0,16	0,05	502,5	0,925414365	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	512	2,34	1,83	0,17	0,06			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	565	3,55	2,81	0,2	0,05	567,5	0,522559853	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	570	3,39	2,81	0,2	0,05			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	525	2,14	1,92	0,17	0,05	513	0,944751381	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	501	2,16	1,58	0,17	0,06			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	584	2,38	2,09	0,17	0,05	575	0,52946593	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	566	2,3	1,96	0,17	0,05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	524	2,07	1,64	0,17	0,06	502	0,924493554	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	480	1,72	1,5	0,17	0,07			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	592	2,56	2,34	0,17	0,05	584	0,179251074	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	576	2,23	1,65	0,17	0,05			
<hr/>										
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	330	1,24	1,63	0,14	0,06	312,5	0,383670964	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	295	1,45	2,31	0,14	0,06			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	328	1,35	2,36	0,12	0,05	314,5	0,096531614	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	301	1,3	2,28	0,12	0,05			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	279	1,05	0,9	0,13	0,05	279	0,342541436	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	270	1,11	1,34	0,13	0,06			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	156	1,77	3,37	0,11	0,05	177	0,054327808	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	198	1,72	3,3	0,1	0,04			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	36	0,74	0,57	0,14	0,08	39	0,047882136	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	42	0,97	1,84	0,12	0,05			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	109	1,6	3,49	0,1	0,05	109	0,033456108	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	80	1,52	2,59	0,1	0,05			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	419	1,65	1,57	0,16	0,07	417	0,511970534	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	415	1,56	1,43	0,15	0,06			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	523	1,63	2,11	0,15	0,06	520,5	0,159760589	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	518	1,63	2	0,14	0,06			

Tab. 8. 14 Excel-Tabelle: Auswertung 4. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.5 Ansatz 5: 0,1µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	533	4,31	3,48	0,17	0,04	543,5	1	0,090583333
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	554	3,79	2,88	0,18	0,04			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	514	4,69	3,93	0,19	0,04	525,5	0,64458755	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	537	4,12	3,33	0,18	0,05			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	538	4,06	3,32	0,19	0,05	534	0,982520699	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	530	4,04	3,22	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	502	4,48	3,5	0,19	0,04	515,5	0,632321374	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	529	4,45	3,94	0,19	0,05			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	528	3,81	3,22	0,19	0,05	534	0,982520699	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	540	4,2	3,47	0,17	0,04			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	525	4,52	3,69	0,17	0,04	539	0,661146887	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	553	4,45	3,58	0,19	0,05			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	540	4,21	3,31	0,19	0,05	531,5	0,977920883	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	523	4	3,14	0,18	0,05			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	521	4,46	3,76	0,2	0,04	520	0,478380865	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	519	4,76	4,17	0,19	0,04			
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	582	3,18	2,65	0,19	0,05	573	1,054277829	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	564	3,22	2,9	0,18	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	558	4,06	3,29	0,19	0,05	548,5	0,672799755	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	539	4,17	3,5	0,19	0,04			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	583	2,74	2,37	0,17	0,05	575,5	1,058877645	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	568	2,29	1,64	0,16	0,04			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	590	3,4	2,6	0,19	0,05	582,5	0,714504753	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	575	3,42	2,67	0,18	0,05			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	547	3,44	2,84	0,18	0,04	542,5	0,998160074	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	538	3,48	2,84	0,18	0,04			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	570	3,57	2,92	0,19	0,05	573	0,702851886	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	576	3,47	2,8	0,19	0,05			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	595	3,24	2,44	0,2	0,05	579	1,065317387	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	563	3,13	2,59	0,19	0,05			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	569	3,78	3,27	0,2	0,04	564	0,172953082	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	559	3,98	3,45	0,21	0,04			
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	537	2,23	2,13	0,18	0,06	542	0,99724011	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	547	2,09	1,77	0,18	0,06			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	590	2,1	1,78	0,18	0,05	594,5	0,546918123	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	599	1,91	2,15	0,18	0,06			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	571	2,21	1,92	0,19	0,05	562,5	1,034958602	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	554	2,08	1,81	0,19	0,05			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	529	1,67	1,69	0,18	0,06	532	0,489420423	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	535	1,55	1,41	0,17	0,05			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	520	1,84	1,75	0,18	0,05	520	0,95676173	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	520	1,74	1,66	0,18	0,05			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	610	3,09	2,48	0,2	0,05	614,5	0,565317387	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	619	3,02	2,51	0,2	0,05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	230	1,1	1	0,16	0,06	227,5	0,418583257	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	225	1,04	0,89	0,17	0,06			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	617	2,9	2,45	0,2	0,05	604	0,185219258	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	591	2,66	2,19	0,2	0,05			
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	401	1,12	1,02	0,13	0,05	389,5	0,477767556	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	378	1,32	1,61	0,13	0,04			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	536	1,67	2,24	0,14	0,04	536	0,164366759	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	536	1,73	2,12	0,14	0,05			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	17	1,71	1,31	0,15	0,1	16,5	0,02023919	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	16	1,53	2,23	0,17	0,11			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	31	0,87	0,82	0,14	0,1	35	0,010732904	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	39	1,86	2,25	0,13	0,08			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	315	0,95	0,84	0,13	0,05	291	0,356945722	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	267	1,05	1	0,14	0,05			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	364	1,39	2,32	0,12	0,05	353,5	0,108402331	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	343	1,17	1,69	0,12	0,04			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	264	1,05	1,89	0,13	0,05	249,5	0,306041092	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	235	1,15	1,58	0,14	0,05			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	99	1,25	1,95	0,11	0,05	85,5	0,026218951	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	72	1,29	1,95	0,13	0,07			

Tab. 8. 15 Excel-Tabelle: Auswertung 5. Ansatz der Konzentrationsreihe 0,1µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.6 Ansatz 1: 10µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	557	3,95	2,89	0,21	0,05	556	1	0,09266667
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	555	4,17	3,11	0,21	0,05			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	551	4,5	3,55	0,21	0,05	564	0,676258993	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	577	4,05	3,09	0,2	0,05			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	568	3,45	2,81	0,2	0,05	563,5	1,013489209	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	559	3,24	2,51	0,21	0,05			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	569	4,07	3,21	0,21	0,05	571,5	0,685251799	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	574	3,89	3,04	0,2	0,05			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	571	4,12	3,33	0,19	0,05	566	1,017985612	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	561	3,87	3,2	0,2	0,05			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	535	4,49	3,41	0,21	0,05	530,5	0,636091127	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	526	4,32	3,13	0,21	0,05			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	562	3,76	2,87	0,21	0,05	559,5	1,006294964	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	12000	557	4,13	3,03	0,2	0,06			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	551	4,26	3,31	0,21	0,06	557,5	0,501348921	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	6000	564	3,67	3,09	0,2	0,05			
<hr/>										
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	599	2,88	2,29	0,17	0,05	592,5	1,065647482	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	586	2,8	2,16	0,18	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	563	3,49	2,54	0,18	0,05	580	0,695443645	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	597	3,46	2,77	0,18	0,05			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	524	2,14	1,74	0,18	0,06	535	0,962230216	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	546	2,08	1,63	0,17	0,05			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	596	2,27	1,78	0,18	0,06	586,5	0,70323741	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	577	2,07	1,67	0,17	0,06			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	587	2,7	1,99	0,18	0,05	584	1,050359712	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	581	2,75	2,13	0,19	0,06			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	575	3,62	2,67	0,19	0,05	575,5	0,690047962	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	576	3,71	3,12	0,19	0,04			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	538	1,89	1,74	0,18	0,06	540	0,971223022	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	542	1,83	1,57	0,17	0,06			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	587	3,38	2,69	0,21	0,06	586	0,175659472	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	585	3,34	2,88	0,21	0,06			
<hr/>										
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	426	1,2	1,33	0,15	0,07	406	0,730215827	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	386	1,24	1,58	0,14	0,05			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	615	2,58	2,3	0,16	0,04	614,5	0,552607914	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	614	2,6	2,21	0,17	0,04			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	307	1,02	1,21	0,15	0,06	287	0,51618705	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	267	1,17	1,85	0,16	0,06			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	593	2,33	2,1	0,19	0,06	602	0,541366906	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	611	2,25	1,96	0,18	0,06			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	309	1,1	1,36	0,16	0,07	307,5	0,553057554	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	306	1,08	1,4	0,15	0,06			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	614	2,31	2,19	0,18	0,05	604	0,543165468	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	2	12000	594	2,34	2,17	0,18	0,05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	451	1,38	1,19	0,17	0,06	433	0,778776978	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	415	1,31	1,3	0,16	0,06			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	612	3,25	2,47	0,18	0,04	608,5	0,182404077	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	605	3,22	2,83	0,18	0,04			
<hr/>										
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	84	0,78	1	0,13	0,05	83	0,099520384	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	82	1,01	1,11	0,13	0,04			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	645	1,88	1,89	0,16	0,05	642,5	0,192595923	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	640	1,82	1,83	0,16	0,05			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	3	0,41	0,25	0,13	0,03	3	0,003597122	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	3	0,36	0,1	0,13	0,01			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	97	0,69	0,54	0,14	0,04	96	0,002666667	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	95	0,9	2,06	0,13	0,05			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	55	0,78	1,57	0,13	0,04	48	0,057553957	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	41	0,55	0,35	0,14	0,03			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	590	1,41	1,73	0,16	0,04	604	0,181055156	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	618	1,29	1,55	0,16	0,05			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	10	0,51	0,3	0,16	0,04	11	0,013189448	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	12	0,84	0,86	0,18	0,1			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	493	1,12	1,19	0,16	0,05	453,5	0,135941247	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	414	1,21	1,51	0,16	0,04			

Tab. 8. 16 Excel-Tabelle: Auswertung 1. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

Anhang

8.9.7 Ansatz 2: 10µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	552	3,69	2,84	0,2	0,05	554,5	1	0,092416667
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	557	3,64	2,77	0,19	0,06			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	555	3,95	3,11	0,21	0,05	546,5	0,657048392	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	538	4	3,19	0,2	0,06			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	548	3,85	2,94	0,22	0,05	548	0,988277728	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	548	3,61	2,71	0,24	0,05			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	579	4,04	3,26	0,21	0,05	569,5	0,684700932	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	560	4,01	3,14	0,21	0,05			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	560	3,48	2,57	0,21	0,06	552	0,995491434	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	544	3,09	2,33	0,22	0,05			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	563	4,03	2,91	0,22	0,05	565	0,679290652	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	567	3,91	3,26	0,22	0,05			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	541	4,14	3,07	0,25	0,05	556,5	1,003606853	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	572	3,76	2,89	0,25	0,06			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	536	4,21	3,35	0,24	0,06	546	0,492335437	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	556	4,16	3,34	0,24	0,06			
<hr/>										
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	579	3,13	2,64	0,21	0,05	564,5	1,018034265	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	550	2,78	2,16	0,21	0,06			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	613	2,5	1,89	0,21	0,05	594,5	0,71475804	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	576	2,77	2,23	0,21	0,05			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	422	1,36	1,36	0,2	0,07	410	0,739404869	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	398	1,47	1,62	0,19	0,06			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	587	2,47	2,26	0,22	0,06	597	0,717763751	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	607	2,45	2,15	0,22	0,06			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	524	2,91	2,24	0,24	0,06	519,5	0,936880072	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	515	3,3	2,69	0,27	0,06			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	591	2,87	2,07	0,24	0,05	582,5	0,700330628	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	574	2,61	2,02	0,24	0,06			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	587	3,26	2,77	0,25	0,05	584	1,053201082	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	581	3,24	2,4	0,26	0,05			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	570	3,95	3,01	0,27	0,06	557	0,167418094	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	544	4,06	3,18	0,27	0,05			
<hr/>										
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	571	2,19	1,89	0,18	0,06	550,5	0,992786294	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	530	1,76	1,41	0,17	0,06			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	468	1,45	1,61	0,14	0,05	482	0,434625789	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	496	1,44	1,73	0,15	0,06			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	549	1,92	1,84	0,17	0,06	540,5	0,974752029	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	532	1,78	1,7	0,18	0,06			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	626	1,9	1,86	0,18	0,06	600,5	0,54147881	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	575	1,8	1,81	0,18	0,06			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	518	2,02	1,62	0,2	0,06	516	0,930568079	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	514	2,16	1,83	0,2	0,06			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	600	2,55	1,74	0,19	0,05	600,5	0,54147881	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	601	2,05	1,86	0,18	0,05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	494	1,45	1,43	0,16	0,06	448	0,807935077	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	402	1,27	1,2	0,16	0,06			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	598	1,9	1,79	0,17	0,06	604	0,181544935	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	610	1,89	1,62	0,18	0,06			
<hr/>										
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	343	1,07	1,54	0,15	0,06	322,5	0,3877367	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	302	1,02	1,17	0,14	0,06			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	488	1,42	2,46	0,13	0,05	491	0,147580403	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	494	1,55	2,63	0,13	0,05			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	102	0,79	0,95	0,15	0,07	97,5	0,117222723	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	93	0,67	0,61	0,14	0,07			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	130	1,33	2,41	0,11	0,04	165	0,049594229	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	200	1,5	2,77	0,13	0,02			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	331	1	0,94	0,17	0,05	299,5	0,36008416	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	268	0,98	1,54	0,17	0,05			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	593	2,03	1,91	0,22	0,06	599,5	0,180192365	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	606	2	1,91	0,21	0,05			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	9	1,04	1,66	0,16	0,03	9,5	0,011421701	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	10	2,47	5,38	0,15	0,02			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	193	1,41	2,1	0,14	0,02	164	0,049293658	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	135	1,38	2,66	0,14	0,03			

Tab. 8. 17 Excel-Tabelle: Auswertung 2. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.8 Ansatz 3: 10µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	560	4,2	2,95	0,2	0,04	555	1	0,0925
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	550	4,29	3,54	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	542	4,41	3,39	0,21	0,05	543,5	0,652852853	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	545	4,5	3,17	0,21	0,05			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	566	3,88	2,75	0,19	0,04	570,5	1,027927928	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	575	3,73	2,86	0,18	0,03			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	545	4,17	3,1	0,18	0,04	560	0,672672673	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	575	3,81	2,76	0,18	0,04			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	553	3,87	3,05	0,2	0,05	559,5	1,008108108	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	566	3,75	2,73	0,19	0,04			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	587	4,26	3,05	0,19	0,05	586	0,703903904	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	585	4,02	3,1	0,2	0,05			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	578	3,78	2,85	0,18	0,04	585	1,054054054	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	592	3,51	2,7	0,18	0,04			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	577	4,17	3,31	0,2	0,04	564,5	0,508558559	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	552	4,36	3,54	0,2	0,04			
<hr/>										
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	606	2,57	1,93	0,16	0,05	581,5	1,047747748	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	557	2,14	2,06	0,16	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	605	3,3	2,54	0,18	0,05	592	0,711111111	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	579	3,13	2,58	0,18	0,06			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	552	2,51	1,95	0,16	0,05	564	1,016216216	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	576	2,44	2,02	0,16	0,05			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	569	2,62	1,89	0,16	0,05	554	0,665465465	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	539	2,63	2,17	0,17	0,06			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	545	2,48	2,04	0,16	0,05	559	1,007207207	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	573	2,45	1,85	0,17	0,05			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	595	2,42	1,82	0,18	0,05	601	0,721921922	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	607	2,34	1,99	0,17	0,06			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	526	3,16	2,83	0,18	0,05	533,5	0,961261261	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	541	3,23	2,56	0,18	0,05			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	547	3,87	3,19	0,19	0,05	544	0,163363363	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	541	4,05	3,37	0,19	0,05			
<hr/>										
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	581	3,12	2,66	0,16	0,04	571	1,028828829	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	561	3	2,53	0,15	0,03			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	600	2,77	2,3	0,16	0,04	602	0,542342342	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	604	2,76	2,23	0,16	0,05			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	323	1,2	1,32	0,14	0,05	320	0,576576577	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	317	1,14	0,92	0,15	0,06			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	267	1,13	1,23	0,14	0,05	278,5	0,250900901	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	290	1,14	1,17	0,14	0,05			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	532	2,01	1,82	0,15	0,05	529,5	0,954054054	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	527	1,96	1,92	0,16	0,05			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	521	1,76	1,78	0,16	0,05	525,5	0,473423423	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	530	1,66	1,81	0,16	0,05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	491	1,94	1,68	0,17	0,05	507,5	0,914414414	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	524	1,89	1,76	0,17	0,06			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	617	2,81	2,37	0,18	0,04	617,5	0,185435435	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	618	2,77	2,41	0,18	0,05			
<hr/>										
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	391	1,09	0,99	0,14	0,06	391	0,46966967	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	391	1,25	1,84	0,13	0,04			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	243	1,31	2	0,13	0,05	251	0,075375375	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	259	1,04	1,58	0,13	0,05			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	171	0,84	0,9	0,13	0,03	176	0,211411411	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	181	1,07	1,24	0,14	0,04			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	67	0,92	1,06	0,13	0,05	72	0,021621622	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	77	1,09	1,62	0,12	0,03			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	286	1,29	1,64	0,16	0,05	304	0,365165165	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	322	1,12	1,25	0,15	0,05			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	373	1,25	1,69	0,14	0,05	388,5	0,116666667	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	404	1,52	2,38	0,14	0,04			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	177	1,22	1,64	0,16	0,04	158,5	0,19039039	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	140	1,26	1,79	0,16	0,05			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	96	0,8	2,01	0,13	0,02	74,5	0,022372372	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	53	1,59	3,63	0,15	0,05			

Tab. 8. 18 Excel-Tabelle: Auswertung 3. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.9 Ansatz 4: 10µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	616	3,59	2,69	0,2	0,05	597	1	0,0995
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	578	3,97	3,55	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	589	4,17	3,18	0,19	0,05	585,5	0,653824679	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	582	4,06	3,23	0,19	0,05			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	613	3,6	2,74	0,19	0,05	625	1,046901173	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	637	3,38	2,97	0,18	0,05			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	554	4,29	3,27	0,18	0,04	566,5	0,632607482	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	579	4,08	3,16	0,18	0,05			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	621	3,51	2,76	0,2	0,05	627	1,050251256	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	633	3,23	2,64	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	569	4,28	3,45	0,19	0,04	561,5	0,627024009	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	554	4,38	3,47	0,2	0,05			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	627	3,3	2,63	0,2	0,05	630,5	1,056113903	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	634	3,13	2,6	0,2	0,05			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	541	4,69	3,76	0,19	0,04	556,5	0,466080402	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	572	4,33	3,43	0,19	0,05			
<hr/>										
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	601	3,02	2,49	0,21	0,05	596	0,998324958	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	591	2,93	2,37	0,2	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	625	3,08	2,49	0,2	0,04	639,5	0,714126186	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	654	2,84	2,15	0,2	0,05			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	626	2,7	2,23	0,2	0,05	615	1,030150754	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	604	2,7	2,08	0,2	0,05			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	606	2,94	2,27	0,22	0,04	613	0,68453378	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	620	2,85	2,45	0,21	0,04			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	640	2,75	2,05	0,23	0,05	630,5	1,056113903	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	621	2,84	2,28	0,22	0,05			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	609	3,44	2,48	0,23	0,05	603,5	0,673925181	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	598	3,16	2,6	0,22	0,04			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	611	2,45	1,76	0,23	0,05	595,5	0,997487437	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	580	2,69	2,05	0,23	0,05			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	602	3,48	2,79	0,23	0,05	602,5	0,168202122	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	603	3,69	3,12	0,23	0,04			
<hr/>										
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	571	2,21	1,96	0,18	0,05	572,5	0,958961474	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	574	2,07	1,81	0,17	0,06			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	520	1,85	2	0,16	0,05	530	0,443886097	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	540	1,55	1,56	0,17	0,06			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	572	2,2	1,77	0,18	0,05	569	0,953098827	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	566	2,05	1,62	0,17	0,05			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	608	2,21	1,74	0,17	0,05	607	0,508375209	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	606	2,29	1,94	0,18	0,05			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	583	2,04	1,72	0,19	0,06	558,5	0,935510888	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	534	1,74	1,45	0,18	0,06			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	590	3,34	2,63	0,19	0,05	604	0,505862647	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	618	3,29	2,7	0,2	0,05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	481	1,27	1,32	0,17	0,07	474	0,793969849	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	467	1,35	1,38	0,18	0,08			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	593	1,87	1,81	0,18	0,06	601,5	0,167922948	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	610	1,87	2,05	0,19	0,06			
<hr/>										
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	329	1,02	0,99	0,13	0,06	319,5	0,35678392	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	310	1,23	1,97	0,13	0,06			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	394	1,66	2,84	0,1	0,04	407,5	0,113763261	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	421	1,92	3,4	0,1	0,04			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	391	1,13	1,59	0,15	0,07	370,5	0,413735343	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	350	1,01	1,76	0,14	0,06			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	506	1,67	2,64	0,12	0,05	504,5	0,140843104	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	503	1,56	2,63	0,13	0,05			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	17	2,17	1,88	0,17	0,11	13,5	0,015075377	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	10	2,88	2,67	0,19	0,11			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	495	1,92	3,09	0,11	0,04	487	0,135957566	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	479	1,68	2,8	0,12	0,05			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	244	1,06	1,85	0,14	0,06	217	0,242322725	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	190	1,12	2,29	0,14	0,05			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	615	2,52	2,02	0,2	0,06	606,5	0,169318816	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	598	2,59	2,27	0,2	0,05			

Tab. 8. 19 Excel-Tabelle: Auswertung 4. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.10 Ansatz 5: 10µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	591	3,46	2,65	0,2	0,05	583	1	0,097166667
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	575	3,32	2,67	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	576	3,73	2,93	0,2	0,06	586	0,670097198	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	596	3,68	2,75	0,2	0,06			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	569	3,46	2,9	0,19	0,05	581	0,996569468	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	593	3,4	2,75	0,2	0,06			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	573	4,12	3,19	0,2	0,06	557,5	0,637507147	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	542	4,17	3,52	0,19	0,04			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	587	3,49	3	0,2	0,06	579,5	0,993996569	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	572	3,68	2,91	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	543	4,36	3,45	0,21	0,04	559,5	0,639794168	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	576	4,07	3,12	0,21	0,06			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	541	3,88	3,43	0,18	0,04	564,5	0,968267581	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	588	3,53	2,96	0,18	0,05			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	553	3,94	3,26	0,19	0,05	556	0,476843911	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	559	4,16	3,38	0,19	0,05			
<hr/>										
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	565	2,39	1,99	0,2	0,04	572,5	0,981989708	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	580	2,42	2,13	0,19	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	599	2,76	2,06	0,2	0,05	581,5	0,664951401	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	564	2,98	2,4	0,2	0,04			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	578	3,1	2,48	0,2	0,04	586,5	1,006003431	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	595	3,11	2,65	0,2	0,04			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	531	4,1	3,43	0,22	0,04	558	0,638078902	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	585	3,68	2,96	0,23	0,04			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	556	2,96	2,46	0,2	0,03	558	0,957118353	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	560	2,73	1,93	0,21	0,04			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	550	3,72	3,04	0,22	0,04	569,5	0,651229274	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	589	3,67	2,78	0,21	0,04			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	570	3,33	2,78	0,23	0,04	579	0,993138937	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	588	3	2,62	0,23	0,04			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	555	3,52	3,08	0,23	0,03	552,5	0,157947399	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	550	3,84	3,63	0,23	0,03			
<hr/>										
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	263	1,15	1,65	0,13	0,06	261	0,447684391	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	259	1,11	1,07	0,14	0,06			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	539	2,11	1,81	0,16	0,06	533	0,457118353	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	527	2,02	1,72	0,15	0,06			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	522	2,17	2	0,16	0,05	518,5	0,889365352	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	515	2,01	1,56	0,17	0,06			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	585	3,32	2,8	0,18	0,05	592	0,507718696	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	599	3,42	2,64	0,18	0,04			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	322	1,28	1,68	0,15	0,06	328	0,562607204	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	334	1,26	1,56	0,15	0,06			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	572	2,78	2,31	0,18	0,05	575	0,493138937	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	578	2,67	2,08	0,18	0,05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	530	1,93	1,46	0,17	0,06	522,5	0,896226415	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	515	1,99	1,56	0,17	0,05			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	603	3,5	3,18	0,2	0,04	579,5	0,165666095	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	556	3,65	3,37	0,2	0,05			
<hr/>										
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	28	1	1,23	0,13	0,06	25	0,028587764	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	22	0,75	0,45	0,14	0,09			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	577	1,86	1,66	0,15	0,05	570	0,162950257	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	563	1,98	2,04	0,15	0,05			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	93	0,68	0,54	0,14	0,07	74	0,084619783	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	55	1,05	2,25	0,13	0,04			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	610	1,96	2,3	0,16	0,05	612,5	0,175100057	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	615	1,98	1,8	0,17	0,05			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	365	1,37	1,48	0,16	0,05	382	0,436821041	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	399	1,4	1,58	0,17	0,06			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	603	2,56	2,01	0,2	0,05	604,5	0,172813036	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	606	2,71	2,3	0,2	0,05			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	17	1,15	1,49	0,17	0,09	22	0,025157233	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	27	1,95	5,11	0,18	0,1			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	223	1,24	1,88	0,14	0,06	218,5	0,062464265	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	214	1,15	2,19	0,15	0,05			

Tab. 8. 20 Excel-Tabelle: Auswertung 5. Ansatz der Konzentrationsreihe 10µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.11 Ansatz 1: 100µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/ Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0Gy, -ZnO, 0m P1	1	12000	535	4.59	3.34	0.27	0.05	534,5	1	0,044541667
0Gy, -ZnO, 0m P2	1	12000	534	4.57	3.47	0.25	0.04			
0Gy, +ZnO, 0m P1	1	12000	535	4.54	3.71	0.25	0.05	541,5	1,013096352	
0Gy, +ZnO, 0m P2	1	12000	548	4.39	3.52	0.25	0.06			
0Gy, -ZnO, 15m P1	1	12000	515	4.37	3.33	0.25	0.05	520	0,972871843	
0Gy, -ZnO, 15m P2	1	12000	525	4.38	3.45	0.25	0.05			
0Gy, +ZnO, 15m P1	1	12000	540	4.57	3.63	0.24	0.06	539,5	1,009354537	
0Gy, +ZnO, 15m P2	1	12000	539	4.65	3.67	0.25	0.04			
0Gy, -ZnO, 1h P1	1	12000	561	4.10	3.30	0.26	0.06	543,5	1,016838167	
0Gy, -ZnO, 1h P2	1	12000	526	4.22	3.78	0.26	0.06			
0Gy, +ZnO, 1h P1	1	12000	555	4.35	3.41	0.24	0.04	539	1,008419083	
0Gy, +ZnO, 1h P2	1	12000	523	4.21	3.02	0.24	0.04			
0Gy, -ZnO, 4h P1	1	12000	533	4.62	3.56	0.26	0.05	542	1,014031805	
0Gy, -ZnO, 4h P2	1	12000	551	4.16	3.43	0.25	0.06			
0Gy, +ZnO, 4h P1	1	12000	433	2.33	1.77	0.27	0.07	442,5	0,82787652	
0Gy, +ZnO, 4h P2	1	12000	452	2.19	1.46	0.26	0.06			
2Gy, -ZnO, 0m P1	1	12000	552	3.96	3.24	0.22	0.05	544	1,01777362	
2Gy, -ZnO, 0m P2	1	12000	536	4.04	3.15	0.22	0.05			
2Gy, +ZnO, 0m P1	1	12000	575	3.78	3.20	0.23	0.06	570	1,066417212	
2Gy, +ZnO, 0m P2	1	12000	565	3.74	3.32	0.21	0.06			
2Gy, -ZnO, 15m P1	1	12000	564	4.12	3.18	0.22	0.06	562,5	1,052385407	
2Gy, -ZnO, 15m P2	1	12000	561	4.01	3.01	0.22	0.05			
2Gy, +ZnO, 15m P1	1	12000	598	3.67	2.89	0.20	0.05	582,5	1,089803555	
2Gy, +ZnO, 15m P2	1	12000	567	3.60	2.69	0.24	0.06			
2Gy, -ZnO, 1h P1	1	12000	540	3.75	3.18	0.25	0.06	530,5	0,99251637	
2Gy, -ZnO, 1h P2	1	12000	521	3.81	3.35	0.23	0.05			
2Gy, +ZnO, 1h P1	1	12000	511	3.94	3.30	0.23	0.05	522	0,976613658	
2Gy, +ZnO, 1h P2	1	12000	533	3.75	2.98	0.25	0.06			
2Gy, -ZnO, 4h P1	1	12000	612	3.39	2.66	0.22	0.05	606,5	1,134705332	
2Gy, -ZnO, 4h P2	1	12000	601	3.58	2.87	0.23	0.05			
2Gy, +ZnO, 4h P1	1	12000	332	1.27	1.06	0.19	0.07	331,5	0,6202058	
2Gy, +ZnO, 4h P2	1	12000	331	1.24	1.16	0.19	0.07			
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	12000	576	2.99	2.37	0.20	0.06	570,5	1,067352666	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	12000	565	3.15	2.73	0.20	0.05			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	558	3.17	2.43	0.21	0.06	556,5	1,041159963	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	555	3.47	2.85	0.20	0.04			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	12000	522	1.63	1.45	0.16	0.07	534,5	1	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	12000	547	1.65	1.51	0.17	0.07			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	594	2.28	1.84	0.21	0.07	586,5	1,097287184	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	579	2.16	1.75	0.20	0.07			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	12000	595	3.18	2.37	0.22	0.06	598,5	1,119738073	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	12000	602	3.30	2.40	0.22	0.06			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	567	3.90	3.10	0.23	0.06	574,5	1,074836296	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	582	3.57	2.92	0.22	0.05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	12000	576	1.90	1.40	0.18	0.06	584	1,092609916	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	12000	592	2.12	1.96	0.20	0.07			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	19	0.70	0.54	0.14	0.05	18	0,033676333	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	17	1.83	4.31	0.15	0.08			
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	36000	565	1.56	1.76	0.16	0.06	580	0,361708762	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	36000	595	1.67	2.00	0.16	0.06			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	629	2.55	1.94	0.21	0.05	625,5	0,390084191	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	622	2.70	2.34	0.20	0.05			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	36000	389	2.04	3.39	0.10	0.02	356	0,222014344	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	36000	323	2.09	3.16	0.08	0.04			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	308	1.80	3.26	0.11	0.04	331	0,206423449	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	354	1.54	2.60	0.10	0.04			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	36000	628	2.22	2.05	0.20	0.06	634	0,395385095	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	36000	640	2.30	2.11	0.20	0.05			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	511	1.75	2.24	0.15	0.05	534,5	0,333333333	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	558	1.84	2.61	0.15	0.06			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	36000	484	1.60	2.62	0.12	0.05	490,5	0,305893358	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	36000	497	1.56	2.49	0.13	0.05			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	4	0.86	0.87	0.16	0.09	3	0,001870907	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	2	0.30	0.12	0.13	0.01			

Tab. 8. 21 Excel-Tabelle: Auswertung 1. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.12 Ansatz 2: 100µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/ Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0Gy, -ZnO, 0m, P1	1	12000	546	3,51	2,92	0,19	0,04			
0Gy, -ZnO, 0m, P2	1	12000	551	3,76	3,33	0,18	0,04	549	1	0,045708333
0Gy, +ZnO, 0m, P1	1	12000	541	4,05	3,5	0,18	0,04			
0Gy, +ZnO, 0m, P2	1	12000	514	4,27	3,66	0,19	0,03	528	0,961713765	
0Gy, -ZnO, 15m, P1	1	12000	553	3,94	3,25	0,18	0,05			
0Gy, -ZnO, 15m, P2	1	12000	529	4,33	3,75	0,18	0,03	541	0,986326345	
0Gy, +ZnO, 15m, P1	1	12000	548	4,11	3,43	0,17	0,04			
0Gy, +ZnO, 15m, P2	1	12000	533	4,1	3,31	0,16	0,04	541	0,985414768	
0Gy, -ZnO, 1h, P1	1	12000	548	4,23	3,61	0,17	0,05			
0Gy, -ZnO, 1h, P2	1	12000	568	3,98	3,27	0,18	0,05	558	1,017319964	
0Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	547	3,99	3,46	0,18	0,05			
0Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	542	4,08	3,28	0,18	0,04	545	0,992707384	
0Gy, -ZnO, 4h, P1	1	12000	561	4,3	3,5	0,18	0,04			
0Gy, -ZnO, 4h, P2	1	12000	534	4,32	3,66	0,19	0,04	548	0,998176846	
0Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	190	1,01	1,02	0,2	0,06			
0Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	137	1,04	1,12	0,2	0,07	164	0,298085688	
2Gy, -ZnO, 0m, P1	1	12000	606	3,34	2,91	0,17	0,04	611,5	1,114858706	
2Gy, -ZnO, 0m, P2	1	12000	617	3,01	2,38	0,18	0,05			
2Gy, +ZnO, 0m, P1	1	12000	619	2,76	2,17	0,18	0,05	607	1,106654512	
2Gy, +ZnO, 0m, P2	1	12000	595	2,9	2,6	0,17	0,05			
2Gy, -ZnO, 15m, P1	1	12000	539	3,96	3,09	0,18	0,05	570	1,039197812	
2Gy, -ZnO, 15m, P2	1	12000	601	3,79	2,94	0,17	0,05			
2Gy, +ZnO, 15m, P1	1	12000	577	4,02	3,38	0,18	0,05	588	1,072014585	
2Gy, +ZnO, 15m, P2	1	12000	599	3,65	2,83	0,17	0,05			
2Gy, -ZnO, 1h, P1	1	12000	625	2,89	2,34	0,18	0,05	621	1,132178669	
2Gy, -ZnO, 1h, P2	1	12000	617	3,05	2,64	0,18	0,05			
2Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	597	2,84	2,22	0,18	0,05	607	1,106654512	
2Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	617	3,09	2,61	0,17	0,05			
2Gy, -ZnO, 4h, P1	1	12000	582	3,95	3,04	0,18	0,05	579,5	1,056517776	
2Gy, -ZnO, 4h, P2	1	12000	577	3,95	3,15	0,16	0,05			
2Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	136	1,02	0,86	0,17	0,07	151,5	0,27620784	
2Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	167	1,32	1,85	0,19	0,07			
4Gy, -ZnO, 0m, P1	1	12000	518	1,58	1,42	0,18	0,06	514	0,937101185	
4Gy, -ZnO, 0m, P2	1	12000	510	1,6	1,5	0,18	0,06			
4Gy, +ZnO, 0m, P1	1	12000	424	1,12	0,94	0,17	0,06	402	0,732907931	
4Gy, +ZnO, 0m, P2	1	12000	380	1,23	1,75	0,16	0,06			
4Gy, -ZnO, 15m, P1	1	12000	582	3,69	3,01	0,21	0,05	592	1,079307201	
4Gy, -ZnO, 15m, P2	1	12000	602	2,76	2,03	0,2	0,05			
4Gy, +ZnO, 15m, P1	1	12000	599	3	2,3	0,2	0,05	600,5	1,094804011	
4Gy, +ZnO, 15m, P2	1	12000	602	2,86	2,5	0,2	0,05			
4Gy, -ZnO, 1h, P1	1	12000	631	2,95	2,47	0,19	0,05	619,5	1,129443938	
4Gy, -ZnO, 1h, P2	1	12000	608	2,84	2,46	0,19	0,04			
4Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	580	2,17	2,03	0,18	0,05	575	1,048313582	
4Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	570	2,01	1,64	0,17	0,04			
4Gy, -ZnO, 4h, P1	1	12000	613	3,1	2,38	0,19	0,05	603,5	1,100273473	
4Gy, -ZnO, 4h, P2	1	12000	594	3,15	2,77	0,18	0,05			
4Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	75	1,21	1,61	0,2	0,08	78	0,142206016	
4Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	81	0,96	0,93	0,18	0,06			
8 Gy, -ZnO, 0m, P1	1	36000	12	1,57	1,98	0,13	0,07	11,5	0,006988757	
8 Gy, -ZnO, 0m, P2	1	36000	11	3,79	5,48	0,15	0,07			
8 Gy, +ZnO, 0m, P1	1	36000	16	4,37	5,25	0,17	0,06	14,5	0,008811911	
8 Gy, +ZnO, 0m, P2	1	36000	13	2,23	4,82	0,12	0,04			
8 Gy, -ZnO, 15m, P1	1	36000	628	2,09	2,09	0,17	0,05	629,5	0,382558493	
8 Gy, -ZnO, 15m, P2	1	36000	631	2,07	1,9	0,17	0,05			
8 Gy, +ZnO, 15m, P1	1	36000	639	2,08	1,81	0,17	0,05	626,5	0,380735339	
8 Gy, +ZnO, 15m, P2	1	36000	614	2,26	1,91	0,17	0,05			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	36000	287	1,35	2,18	0,12	0,05	219,5	0,133394105	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	36000	152	0,86	0,73	0,14	0,06			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	11	3,75	6,09	0,15	0,06	25,5	0,015496809	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	40	2,07	3,78	0,11	0,04			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	36000	628	2,82	2,65	0,18	0,04	629,5	0,382558493	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	36000	631	2,87	2,53	0,17	0,05			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	33	0,98	0,76	0,17	0,06	31,5	0,019143118	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	30	0,82	0,63	0,17	0,07			

Tab. 8. 22 Excel-Tabelle: Auswertung 2. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.13 Ansatz 3: 100µg/ml ZnO-NP

Probenname	Dish/ Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat.Efficiency
0Gy, -ZnO, 0m, P1	1	6000	600	3,57	2,64	0,23	0,05	571	1	0,095166667
0Gy, -ZnO, 0m, P2	1	6000	542	4,18	3,18	0,22	0,05			
0Gy, +ZnO, 0m, P1	1	12000	577	4,23	3,33	0,2	0,04	598,5	0,52408056	
0Gy, +ZnO, 0m, P2	1	12000	620	3,32	2,63	0,23	0,05			
0Gy, -ZnO, 15m, P1	1	6000	594	3,58	2,84	0,21	0,06	588	1,029772329	
0Gy, -ZnO, 15m, P2	1	6000	582	3,42	2,74	0,22	0,04			
0Gy, +ZnO, 15m, P1	1	12000	579	4,17	2,93	0,25	0,05	567	0,496497373	
0Gy, +ZnO, 15m, P2	1	12000	555	4,15	3,04	0,23	0,05			
0Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	609	3,52	2,72	0,23	0,04	605	1,059544658	
0Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	601	3,56	2,82	0,24	0,05			
0Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	578	4,14	3,07	0,25	0,04	574,5	0,503064799	
0Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	571	3,93	3,11	0,24	0,05			
0Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	594	3,78	2,79	0,24	0,04	605,5	1,060420315	
0Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	617	3,58	2,66	0,24	0,05			
0Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	149	1,2	1,18	0,26	0,07	138	0,12084063	
0Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	127	1,04	0,83	0,24	0,06			
2 Gy, -ZnO, 0m, P1	1	6000	597	2,49	1,87	0,21	0,05	599,5	1,049912434	
2 Gy, -ZnO, 0m, P2	1	6000	602	2,52	1,81	0,22	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0m, P1	1	12000	592	3,55	2,64	0,2	0,05	594,5	0,520577933	
2 Gy, +ZnO, 0m, P2	1	12000	597	3,92	2,98	0,22	0,04			
2 Gy, -ZnO, 15m, P1	1	6000	603	2,64	2,05	0,22	0,05	602	1,054290718	
2 Gy, -ZnO, 15m, P2	1	6000	601	2,61	1,92	0,21	0,06			
2 Gy, +ZnO, 15m, P1	1	12000	556	4	2,85	0,23	0,05	581,5	0,509194396	
2 Gy, +ZnO, 15m, P2	1	12000	607	3,68	2,81	0,23	0,05			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	619	2,87	2,07	0,21	0,05	618	1,082311734	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	617	3,04	2,17	0,22	0,05			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	586	3,14	2,19	0,23	0,05	594	0,520140105	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	602	3,12	2,27	0,22	0,05			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	596	3,18	2,37	0,22	0,05	598,5	1,048161121	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	601	2,99	2,41	0,21	0,05			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	46	0,99	1,73	0,17	0,06	43,5	0,038091068	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	41	1,12	0,81	0,2	0,07			
4 Gy, -ZnO, 0m, P1	1	6000	572	2,1	1,72	0,21	0,07	566,5	0,992119089	
4 Gy, -ZnO, 0m, P2	1	6000	561	2,07	1,78	0,21	0,07			
4 Gy, +ZnO, 0m, P1	1	12000	637	2,04	1,66	0,2	0,07	618	0,541155867	
4 Gy, +ZnO, 0m, P2	1	12000	599	2,09	1,64	0,21	0,07			
4 Gy, -ZnO, 15m, P1	1	6000	588	2,12	1,73	0,2	0,06	576	1,008756567	
4 Gy, -ZnO, 15m, P2	1	6000	564	2,12	1,71	0,2	0,06			
4 Gy, +ZnO, 15m, P1	1	12000	541	1,6	1,81	0,18	0,07	541	0,473730298	
4 Gy, +ZnO, 15m, P2	1	12000	541	1,62	2,11	0,18	0,06			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	600	2,24	1,84	0,23	0,06	597,5	1,046409807	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	595	2,09	1,62	0,23	0,07			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	590	2,26	1,7	0,22	0,06	583	0,510507881	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	576	2,21	1,65	0,23	0,07			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	581	1,9	1,51	0,22	0,07	574,5	1,006129597	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	568	2	1,73	0,22	0,07			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	13	0,74	0,47	0,22	0,11	16,5	0,004816112	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	20	0,83	1,22	0,16	0,05			
8 Gy, -ZnO, 0m, P1	1	9000	483	1,37	1,46	0,16	0,07	494	0,576765908	
8 Gy, -ZnO, 0m, P2	1	9000	505	1,35	1,61	0,16	0,08			
8 Gy, +ZnO, 0m, P1	1	36000	521	1,52	1,76	0,15	0,06	527,5	0,153969644	
8 Gy, +ZnO, 0m, P2	1	36000	534	1,28	1,47	0,14	0,06			
8 Gy, -ZnO, 15m, P1	1	9000	134	0,75	0,57	0,12	0,05	140	0,163455925	
8 Gy, -ZnO, 15m, P2	1	9000	146	0,67	0,84	0,12	0,05			
8 Gy, +ZnO, 15m, P1	1	36000	120	1,88	4,01	0,11	0,06	111,5	0,032545242	
8 Gy, +ZnO, 15m, P2	1	36000	103	1,35	2,74	0,11	0,04			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	287	0,91	1,4	0,14	0,05	294,5	0,343841214	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	302	0,9	1,06	0,14	0,06			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	118	1,32	2,55	0,12	0,06	133	0,038820782	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	148	1,09	1,6	0,11	0,03			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	82	0,73	0,72	0,14	0,06	81	0,094570928	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	80	0,65	0,43	0,15	0,06			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	17	0,59	0,37	0,13	0,03	13,5	0,003940455	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	2	36000	10	1,31	1,54	0,19	0,1			

Tab. 8. 23 Excel-Tabelle: Auswertung 3. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.14 Ansatz 4: 100µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/ Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat.Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	591	3,53	2,46	0,11	0,03	589,5	1	0,09825
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	588	3,5	2,7	0,12	0,03			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	568	3,94	3,01	0,11	0,03	576,5	0,651964942	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	585	4,05	2,97	0,13	0,02			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	608	3,55	2,56	0,15	0,03	584	0,990670059	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	560	3,74	2,88	0,14	0,03			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	572	3,47	2,94	0,14	0,03	579	0,654792197	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	586	3,41	2,42	0,14	0,03			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	606	3,73	2,81	0,15	0,03	595	1,009329941	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	584	3,82	2,96	0,15	0,03			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	576	3,32	2,43	0,15	0,03	573,5	0,648572236	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	571	3,24	2,55	0,13	0,03			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	575	3,79	3	0,15	0,03	593	1,005937235	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	611	3,63	2,79	0,15	0,03			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	575	2,61	1,83	0,16	0,04	564	0,478371501	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	553	2,51	2,1	0,16	0,04			
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	566	3,17	2,35	0,19	0,05	547,5	0,928753181	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	529	2,86	1,97	0,19	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	602	3,2	2,37	0,18	0,04	578,5	0,654226746	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	555	3,32	2,81	0,19	0,05			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	568	3,52	2,76	0,19	0,05	568	0,963528414	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	568	3,14	2,25	0,19	0,05			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	571	3,35	2,48	0,22	0,05	585,5	0,662143059	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	600	3,21	2,34	0,21	0,05			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	569	2,79	1,99	0,2	0,05	581,5	0,986429177	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	594	2,84	2,18	0,19	0,05			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	522	2,79	2,2	0,2	0,06	505,5	0,571670908	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	489	2,53	1,86	0,2	0,06			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	557	3,62	2,61	0,21	0,04	569	0,965224767	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	581	3,29	2,57	0,21	0,04			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	602	3,07	2,56	0,2	0,04	593,5	0,167797569	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	585	3,13	2,43	0,19	0,05			
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	536	2,15	1,78	0,18	0,06	527,5	0,894826124	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	519	2,11	1,54	0,19	0,07			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	523	1,82	1,95	0,17	0,06	508	0,430873622	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	493	1,63	1,57	0,17	0,06			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	573	2,84	2,24	0,21	0,06	562	0,953350297	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	551	2,72	2,11	0,22	0,06			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	518	2,52	2,03	0,21	0,06	530,5	0,449957591	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	543	2,46	1,81	0,22	0,06			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	273	1,34	1,56	0,17	0,05	264	0,44783715	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	255	1,15	1,21	0,17	0,06			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	398	1,85	1,52	0,19	0,06	381,5	0,323579304	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	365	1,7	1,61	0,19	0,06			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	544	2,51	1,85	0,21	0,05	542,5	0,920271416	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	541	2,49	1,64	0,22	0,05			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	600	2,48	2,11	0,22	0,06	594,5	0,168080294	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	589	2,48	2,07	0,22	0,05			
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	5	0,94	0,75	0,16	0,11	3,5	0,003958157	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	2	0,69	0,23	0,09	0,01			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	93	0,84	0,62	0,13	0,07	90	0,025445293	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	87	0,95	1,54	0,13	0,06			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	483	1,32	1,19	0,16	0,07	451,5	0,510602205	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	420	1,19	1,06	0,15	0,06			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	588	2,32	1,92	0,17	0,05	584,5	0,165253039	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	581	2,21	1,87	0,18	0,06			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	13	0,7	0,26	0,18	0,07	12	0,013570823	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	11	0,99	0,44	0,2	0,1			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	132	0,86	0,63	0,13	0,05	145,5	0,041136556	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	159	0,82	0,67	0,13	0,05			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	198	1,14	1,67	0,14	0,06	186	0,210347752	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	174	0,91	0,9	0,15	0,07			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	125	0,86	0,73	0,15	0,06	113,5	0,032089341	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	102	0,85	0,7	0,14	0,05			

Tab. 8. 24 Excel-Tabelle: Auswertung 4. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterlegt.

8.9.15 Ansatz 5: 100µg/ml ZnO-NP

Probe	Dish/ Region	Cells Plated	Count	Mean Area	Area S.D.	Mean Density	Density S.D.	Mean Counts	Surviving Fraction	Plat. Efficiency
0 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	562	3,55	2,68	0,19	0,04	564,5	1	0,094083333
0 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	567	3,5	2,57	0,19	0,05			
0 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	559	3,72	3,11	0,2	0,05	574,5	0,678476528	
0 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	590	3,53	2,77	0,19	0,05			
0 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	585	3	2,48	0,17	0,05	593,5	1,051372896	
0 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	602	3,09	2,37	0,18	0,05			
0 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	572	3,4	2,96	0,19	0,06	570,5	0,673752583	
0 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	569	3,51	2,87	0,19	0,06			
0 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	580	3,49	2,6	0,2	0,05	579	1,018600531	
0 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	578	3,45	2,81	0,2	0,05			
0 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	567	3,89	3,11	0,2	0,05	577,5	0,682019486	
0 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	588	3,77	2,99	0,21	0,05			
0 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	565	4,1	3,21	0,21	0,05	564	0,99911426	
0 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	563	3,81	3,1	0,22	0,05			
0 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	12000	134	1,3	1,13	0,21	0,07	126	0,111603189	
0 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	12000	118	1,18	1,49	0,19	0,06			
<hr/>										
2 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	576	2,98	2,2	0,18	0,05	575	1,018600531	
2 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	574	2,65	2	0,19	0,05			
2 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	9000	592	3,53	2,77	0,19	0,04	586,5	0,692648361	
2 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	9000	581	3,41	2,68	0,19	0,05			
2 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	584	2,62	1,98	0,18	0,05	573,5	1,015943313	
2 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	563	2,41	1,95	0,18	0,06			
2 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	9000	580	3,73	3,15	0,19	0,04	591	0,697962799	
2 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	9000	602	3,43	2,82	0,19	0,04			
2 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	561	2,38	1,86	0,19	0,06	562	0,995571302	
2 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	563	2,29	1,72	0,2	0,07			
2 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	9000	585	3,55	2,7	0,2	0,05	588	0,694419841	
2 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	9000	591	3,12	2,21	0,21	0,05			
2 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	581	3,1	2,3	0,2	0,05	578,5	1,024800709	
2 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	576	2,93	2,34	0,19	0,04			
2 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	219	1,52	1,35	0,17	0,06	233,5	0,068940065	
2 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	248	1,28	1,43	0,16	0,06			
<hr/>										
4 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	6000	583	2,7	2,26	0,19	0,06	563	0,997342781	
4 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	6000	543	2,57	1,82	0,19	0,06			
4 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	12000	574	3,01	2,31	0,2	0,05	577	0,511071745	
4 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	12000	580	2,62	2,04	0,2	0,06			
4 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	6000	424	1,5	1,42	0,16	0,06	407	0,720992028	
4 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	6000	390	1,28	1,3	0,17	0,07			
4 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	12000	492	1,54	1,78	0,15	0,06	477	0,422497786	
4 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	12000	462	1,41	1,59	0,16	0,06			
4 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	6000	527	2,1	1,88	0,19	0,06	522	0,924712135	
4 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	6000	517	1,99	2,09	0,19	0,07			
4 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	12000	593	3,41	2,6	0,22	0,05	592	0,524357839	
4 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	12000	591	3,27	2,36	0,23	0,05			
4 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	6000	216	0,91	1,09	0,16	0,07	194	0,343666962	
4 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	6000	172	0,99	1,25	0,16	0,06			
4 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	59	0,91	1,27	0,16	0,06	54	0,015943313	
4 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	49	1,25	2,26	0,18	0,08			
<hr/>										
8 Gy, -ZnO, 0min, P1	1	9000	178	0,95	1,81	0,16	0,05	148,5	0,175376439	
8 Gy, -ZnO, 0min, P2	1	9000	119	1,01	1,21	0,18	0,06			
8 Gy, +ZnO, 0min, P1	1	36000	614	2,1	1,67	0,2	0,05	594	0,175376439	
8 Gy, +ZnO, 0min, P2	1	36000	574	2,16	1,83	0,21	0,05			
8 Gy, -ZnO, 15min, P1	1	9000	11	1,01	0,81	0,2	0,12	10	0,011809861	
8 Gy, -ZnO, 15min, P2	1	9000	9	1,18	1,03	0,2	0,11			
8 Gy, +ZnO, 15min, P1	1	36000	330	1,25	2,3	0,16	0,05	366	0,10806023	
8 Gy, +ZnO, 15min, P2	1	36000	402	1,44	2,38	0,16	0,05			
8 Gy, -ZnO, 1h, P1	1	9000	95	1	1,48	0,18	0,05	99	0,116917626	
8 Gy, -ZnO, 1h, P2	1	9000	103	0,95	1,01	0,17	0,05			
8 Gy, +ZnO, 1h, P1	1	36000	587	2,14	2,39	0,22	0,05	581,5	0,171685858	
8 Gy, +ZnO, 1h, P2	1	36000	576	2	1,67	0,22	0,06			
8 Gy, -ZnO, 4h, P1	1	9000	93	0,92	0,77	0,17	0,04	94	0,111012696	
8 Gy, -ZnO, 4h, P2	1	9000	95	0,94	0,93	0,18	0,05			
8 Gy, +ZnO, 4h, P1	1	36000	6	1,95	0,95	0,28	0,08	6,5	0,001919102	
8 Gy, +ZnO, 4h, P2	1	36000	7	1,06	1,04	0,23	0,12			

Tab. 8. 25 Excel-Tabelle: Auswertung 5. Ansatz der Konzentrationsreihe 100µg/ml ZnO-Nanopartikel. Der Referenzwert und die gezählten Kolonien sind jeweils grau unterleg

Danksagung

An erster Stelle danke ich ganz besonders meinem Doktorvater [REDACTED] [REDACTED] für die Möglichkeit, dieses interessante Thema bearbeiten zu dürfen, für die außerordentlich gute und freundliche Betreuung, die vielen aufschlussreichen Gespräche und Anregungen und die sachkundige Begutachtung und Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Des Weiteren danke ich [REDACTED] für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachterin.

Ich danke der AG [REDACTED] vom Institut für Anorganische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für die Bereitstellung der verwendeten Nanopartikel.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei [REDACTED] [REDACTED] für die freundliche und professionelle Einarbeitung in die verschiedenen Labortechniken und die stets fachkundige und hilfreiche Unterstützung.

Außerdem danke ich ganz herzlich [REDACTED] für die wissenschaftlichen Ratschläge und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ein weiterer Dank gilt meiner Kommilitonin und Freundin [REDACTED] für die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Ein außerordentlicher Dank gilt natürlich meiner Familie, besonders meiner Mutter, für ihre uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung, ihre Geduld und ihren Glauben an mich während meines gesamten Studiums.

Nicht zuletzt danke ich [REDACTED] [REDACTED] für die Begleitung durch alle Höhen und Tiefen.

Lebenslauf