

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

Analyse von ZnO-Nanopartikeln als Adjuvans in der Strahlentherapie

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

Vorgelegt von

Anne Kraft
aus Schwerin

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
I Abkürzungsverzeichnis	IV
II Abbildungsverzeichnis	VII
III Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 Tumore im Respirationstrakt.....	2
2.1.1 Anatomie	2
2.1.2 Abwehrmechanismen der Atemwege gegen äußere Einflüsse.....	3
2.1.3 Adenokarzinom der Lunge	5
2.2 Nanopartikel.....	9
2.2.1 Allgemeine Informationen.....	9
2.2.2 Allgemeine Aufnahmewege in den Körper	9
2.2.2.1 Inhalative Aufnahme	10
2.2.2.2 Orale Aufnahme.....	11
2.2.2.3 Dermale Aufnahme	12
2.2.2.4 Aufnahme in das Nervensystem	12
2.2.3 Effekte von Nanopartikeln	13
2.2.3.1 Bildung von ROS	13
2.2.3.2 Genotoxizität und Zytotoxizität von metallischen Nanopartikeln.....	15
2.2.4 Verwendung in der Medizin	16
2.3 Nanopartikel als Radiosensitizer	19
2.4 Zink	22
2.4.1 Chemische und biologische Eigenschaften.....	22

2.4.2 Verteilung im menschlichen Körper	22
2.4.3 Aufnahmewege in die Zelle von ZnO-NP	23
2.4.4 Zyto- und Genotoxizität von ZnO-NP	24
3 Material und Methoden.....	26
3.1 Material	26
3.1.1 Zellen.....	26
3.1.2 Eier	26
3.1.3 Zellkulturmedium und Puffer.....	26
3.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.5 Chemikalien und Reagenzien.....	29
3.1.6 Software	30
3.2 Methoden.....	31
3.2.1 Zellkultivierung.....	31
3.2.2 Zellzahlbestimmung.....	31
3.2.3 Herstellung der Nanopartikel	31
3.2.4 MTT mit A549-Zellen	32
3.2.4.1 Aussat der Zellen	32
3.2.4.2 Inkubation mit ZnO-NP	32
3.2.4.3 CASY-TT.....	33
3.2.4.4 Alamar-Blue Assay	33
3.2.4.5 Kristallviolett Assay	33
3.2.5 CAM Assay.....	34
3.2.5.1 Das Chorioallantoismembran-Modell.....	34
3.2.5.2 Durchführung des CAM-Assay	36
3.2.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der CAM	36
3.2.5.4 Immunhistochemische Färbungen der CAM.....	37
3.2.5.5 Histologische Auswertung der CAM	37
3.2.6 Statistische Auswertung	38

4	Ergebnisse.....	39
4.1	Alamar-Blue Assay und Kristallviolett Assay	39
4.1.1	ZnO-NP verringern die Vitalität der A549-Zellen	39
4.1.2	Einfluss der Bestrahlung auf den Zellstoffwechsel	40
4.1.3	Einfluss der ZnO-NP Konzentration auf den Zellstoffwechsel	42
4.1.4	Vergleich von der ZnO-NP Konzentration und der Bestrahlungsdosis bei konstanter Inkubationszeit	43
4.1.5	Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration und der Inkubationsdauer ohne Bestrahlung	44
4.1.6	Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration und der Inkubationsdauer mit 2 Gray Bestrahlung	46
4.1.7	Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration und der Inkubationsdauer mit 4 Gray Bestrahlung	48
4.1.8	Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration und der Inkubationsdauer mit 8 Gray Bestrahlung	50
4.2	CAM-Modell	52
4.2.1	Invasion der Tumorzellen und Angiogenese in der CAM	53
4.2.2	Keine Invasion der Tumorzellen in die CAM und keine tumorinduzierte Angiogenese.....	57
5	Diskussion	59
5.1	Toxizität von ZnO-NP	59
5.1.1	Toxizität von ZnO-NP	59
5.1.2	Toxizität von ZnO-NP auf A549-Zellen durch Beeinflussung der metabolischen Aktivität	60
5.2	Mögliche Schädigungsmechanismen von ZnO-NP	61
5.3	Vaskularisation der CAM	64
6	Zusammenfassung	67

Literaturverzeichnis	68
Anhang	88
Danksagung	101
Lebenslauf.....	102

I Abkürzungsverzeichnis

ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CAM	Chorioallantoismembran
CAT	Cholin-Acetyltransferase
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>cluster of differentiation 8</i>
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSB	Doppelstrangbrüche
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EML4	<i>echinoderm microtubule-associated protein-like 4</i>
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i>
FAST	<i>fiber-optic array scanning technology</i>
FEV	<i>forced expiratory volume</i>
GC	Guanin-Cytosin
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
GST	Glutathion-S-Transferase
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
IL-3	Interleukin-3
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5

I Abkürzungsverzeichnis

IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
INF- γ	Inteferon- γ
IPR	<i>high interstitial fluid pressure</i>
Ko.	Kontrolle
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein-Kinase</i>
MHC I	<i>major histocompatibility complex I</i>
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i>
MNP	<i>magnetic nanoparticles</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFkB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NP	Nanopartikel
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i>
OCT	optische Kohärenztomographie
OTM	<i>olive tail moment</i>
PC	<i>protein corona</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEF	<i>peak expiratory flow</i>
PEG	<i>polyethylene glycol</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGP	<i>permeability glycoprotein 1</i>
PLGA	<i>polylactid-co-Glycolid</i>
PNS	peripheres Nervensystem
ROS	<i>reactive oxygen specie</i>
SD	Standardabweichung
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>

SLN	<i>solid lipid nanoparticle</i>
SOD	Superoxiddismutase
SPIO	<i>super paramagnetic iron oxide nanoparticles</i>
TA	Thymin-Adenosin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TH1-Zelle	Typ1-T-Helferzelle
TH2-Zelle	Typ2-T-Helferzelle
TiO ₂	Titaniumdioxid
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZIP	<i>zrt- and irt-like protein</i>
Zn ²⁺	zweiwertiges Zinkion
ZnO	Zinkoxid
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZnT	<i>zinc transporter</i>

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Häufigste Todesursachen in Deutschland 2017	5
Abbildung 2 Bösartige Neubildungen der Bronchien und Lungen mit Todesfolge in Deutschland 2017.....	6
Abbildung 3 Haber-Weiss-Reaktion und Fenton-Reaktion.....	14
Abbildung 4 Genotoxizität und ROS-Effekte metallischer Nanopartikel	16
Abbildung 5 Nanopartikel als Radiosensitizer	20
Abbildung 6 Aufnahme von ZnO-NP in die Zelle.....	23
Abbildung 7 Schema des CAM-Modells	35
Abbildung 8 CAM-Modell.....	36
Abbildung 9 ZnO-Nanopartikel verringern die Vitalität von A549-Zellen	40
Abbildung 10 Metabolische Aktivität in Abhängigkeit von der Bestrahlung	41
Abbildung 11 Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration ..	42
Abbildung 12 Zellstoffwechsel bei 240-minütiger Inkubationszeit bei 0,1 µg/ml und 100 µg/ml.....	43
Abbildung 13 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel ohne Bestrahlung.....	44
Abbildung 14 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel verglichen mit der Kontrolle ohne Bestrahlung	45
Abbildung 15 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel mit kombinierter Bestrahlung von 2 Gray.....	46
Abbildung 16 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel verglichen mit der Kontrolle bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gray	47
Abbildung 17 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel mit kombinierter Bestrahlung von 4 Gray.....	48

Abbildung 18 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel verglichen mit der Kontrolle bei kombinierter Bestrahlungsdosis von 4 Gray	49
Abbildung 19 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel mit kombinierter Bestrahlung von 8 Gray	50
Abbildung 20 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel verglichen mit der Kontrolle bei einer kombinierten Bestrahlungsdosis von 8 Gray	51
Abbildung 21 Histologische Bilder der CAM mit erfolgreicher Tumordinvasion und peritumoraler Angiogenese	53
Abbildung 22 Histologische Bilder der CAM mit Tumordinvasion	55
Abbildung 23 Histologische Bilder der CAM ohne Tumordinvasion und ohne Angiogenese, submurale Lymphozyten	57
Abbildung 24 Histologische Bilder der CAM ohne Tumordinvasion und ohne Angiogenese.....	58

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zellkulturmedium und Puffer	26
Tabelle 2 Geräte	27
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 4 Chemikalien und Reagenzien	29
Tabelle 5 Software	30
Tabelle 6 Rohwerte 4.1.1	88
Tabelle 7 ANOVA 4.1.1	89
Tabelle 8 Kruskal-Wallis-Test 4.1.1	90
Tabelle 9 Rohwerte 4.1.2-4.1.8	90
Tabelle 10 Bonferroni-Test 4.1.2	96
Tabelle 11 Bonferroni-Test 4.1.3	97
Tabelle 12 Bonferroni-Test 4.1.4	97
Tabelle 13 Kruskal-Wallis-Test 4.1.4	97
Tabelle 14 T-Tests gegen die Kontrolle 4.1.2-4.1.8	98

1 Einleitung

Metallische Nanopartikel sind aktuell ein vielversprechender Bestandteil der medizinischen Forschung. Einsatzmöglichkeiten in Bereichen der Prävention, etwa bei Impfungen, über die Bildgebung bis hin zur Therapie von Erkrankungen werden entwickelt. Insbesondere in der Krebstherapie zeigen sich Chancen durch den Einsatz von Nanopartikeln.

Konventionell mit Chemotherapie und Radiotherapie behandelte Patienten entwickeln nicht selten therapielimitierende Nebenwirkungen, sodass eine Dosisreduktion der Chemotherapie oder Bestrahlung vorgenommen werden muss. Die kurative Therapie rückt damit aus dem Fokus der Behandlung. Folglich wird nach Möglichkeiten gesucht, die lokale Toxizität der Therapie bei gleichzeitiger Reduktion der peripheren Effekte zu verstärken. Nicht nur die akuten Nebenwirkungen, sondern auch erst nach Jahren auftretende Folgen wie Zweitkarzinome oder Lungenfibrosen könnten durch gesteigerte lokale Effekte und einhergehender Reduzierung der peripheren Toxizität verringert werden. Letztendlich könnte eine gesteigerte lokale Toxizität durch neue Therapien auch die Regression der Erkrankung fördern.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Toxizität von ZnO-Nanopartikeln auf Tumorzellen des Adenokarzinoms der Lunge mit und ohne begleitende Bestrahlung. Es sollte die Toxizität von ZnO-Nanopartikeln in Hinblick auf die Zellvitalität und die metabolische Aktivität beurteilt werden. Letztendlich sollte die Frage geklärt werden, ob ZnO-Nanopartikel zur Effizienzsteigerung einer Strahlentherapie beitragen können.

Des Weiteren wurde das Chorionallantoismembran-Modell als ein 3D-Xenograftmodell etabliert. Eine Invasion und Angiogenese von Tumoren auf der CAM sollte untersucht werden. In weiterführenden Versuchen wird es möglich sein, die kombinierte Toxizität von ZnO-Nanopartikeln und Bestrahlung auf Tumorzellen an diesem Modell als Zwischenschritt von einem *in vitro* zu einem *in vivo* Modell zu evaluieren.

2 Literaturdiskussion

2.1 Tumore im Respirationstrakt

Das Lungenkarzinom gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Im Folgenden sollen zunächst die Anatomie und Physiologie der Atemwege näher erläutert werden. Danach wird auf das Adenokarzinom der Lunge und seine therapeutischen Optionen eingegangen.

2.1.1 Anatomie

Nach der Anfeuchtung und Erwärmung in der Nasenhöhle (Cavum nasi) durchströmt die Luft den Rachen (Pharynx), der dann distal in den Kehlkopf (Larynx) übergeht. Unterhalb des Ringknorpels (Cartilago cricoidea) beginnt die Luftröhre (Trachea), welche ca. 10 cm lang ist und sich auf Höhe des 4. Brustwirbelkörpers an der Bifurcatio tracheae in den rechten und linken Hauptbronchus (Bronchus principalis dexter bzw. sinister) teilt (1).

Der Bronchialbaum spaltet sich ca. 22-mal dichotom auf, sodass die folgenden Abschnitte einen immer geringer werdenden Durchmesser aufweisen. Je nach Generation der Aufteilung unterscheidet man die Lappenbronchien (Bronchi lobaris), die Segmentbronchien (Bronchi segmentalis), die Subsegmentbronchien (Bronchi subsegmentalis), die terminalen Bronchien (Bronchioli terminalis) und die respiratorischen Bronchien (Bronchioli respiratorii), welche dann in den Alveolarsäckchen (Sacculi alveolares) mit den Lungenbläschen (Alveoli pulmonalis) enden. Die Lunge besitzt ca. 300 Millionen solcher Alveolen, die eine Gasaustauschfläche von 100-120 m² bilden. Bis zu den Bronchioli terminales spricht man von dem konduktiven Anteil des Respirationstraktes, das heißt hier wird die Luft in die tieferen Atemwege geleitet, erwärmt, befeuchtet und mittels mukozillärer Clearance gereinigt. Der respiratorische Anteil beginnt mit den Bronchioli respiratorii und ist für den Gasaustausch zuständig (1, 2).

Auch mikroskopisch lassen sich die einzelnen Baueinheiten des respiratorischen Traktes unterscheiden. Die Trachea und Hauptbronchien bestehen aus einer Tunica mucosa mit mehrreihigem Flimmerepithel und Becherzellen sowie Sinneszellen und endokrinen Zellen. In der darunter liegenden Lamina propria befinden sich seromuköse Glandulae tracheales. Es folgt die Tunica fibromusculocartilaginea

bestehend aus hyalinen, hufeisenförmigen Knorpelspangen, einem querverlaufenden Musculus trachealis und den Ligamenta anularia. Nach Außen begrenzt wird die Trachea durch eine Adventitia aus lockerem Bindegewebe (3, 4).

In den Bronchien werden die hufeisenförmigen Knorpelspangen zu unregelmäßigen Knorpelplatten, zwischen denen seromuköse Glandulae bronchiales und Venenplexus liegen. Ab den Bronchioli finden sich keine Knorpel, Drüsen und Becherzellen mehr. Das respiratorische Epithel ist nun einschichtig (3, 4).

Distal der Bronchioli terminales liegen die Azini. Sie enthalten Alveolarepithelzellen Typ 1, die einer Basallamina aufliegen und gemeinsam mit den Kapillarendothelzellen die Blut-Luft-Schranke von circa 0,6 µm Breite bilden. Zwischen den flachen Typ 1 Alveolarepithelzellen liegen die größeren Alveolarepithelzellen Typ 2, die *Surfactant* produzieren und aus denen durch mitotische Teilung die Alveolarepithelzellen Typ 1 hervorgehen. In den Alveolen befinden sich die Alveolarmakrophagen, die sich aus den Monozyten des Blutes differenzieren und durch das Alveolarepithel in die Alveolen gelangen (3-5).

2.1.2 Abwehrmechanismen der Atemwege gegen äußere Einflüsse

Die oberen und unteren Atemwege stellen die größte epitheliale Oberfläche, die äußeren Einflüssen exponiert ist, dar (5).

Die Abwehrmechanismen des Atemtraktes lassen sich in die der oberen Atemwege und die der unteren Atemwege differenzieren. In den oberen Atemwegen sind insbesondere der Hustenreflex, der mukoziliäre Transport, die Immunglobulin A (IgA)-Sekretion und die dendritischen Zellen an der Abwehr beteiligt. Die Abwehr der unteren Atemwege besteht aus den Alveolarmakrophagen, den Immunglobulin G (IgG)-Antikörpern, dem Komplement, dem *Surfactant* sowie den neutrophilen Granulozyten und den Lymphozyten (5).

In Trachea und Bronchien verhindert der Hustenreflex das Vorstoßen von Fremdmaterial und fördert zusätzlich den Abtransport von produziertem Schleim sowie darin enthaltenden Bakterien. Der Hustenreflex wird durch mechanische, chemische oder entzündliche Reize ausgelöst (5).

Der Bronchialschleim bindet über 90 % der mehr als 2-3 µm großen Partikel. Er wird mittels des ziliaren Transportes des respiratorischen Flimmerepithels in die Trachea

transportiert. Zusätzlich bildet der Mukos eine Barriere für Bakterien, da er IgA, Lysozyme, Laktoferrin und Peroxidase enthält. Das enthaltene IgA dient der Toxinneutralisation, bindet Viren und blockiert den Eintritt von Bakterien durch das Epithel, indem es zur Komplementaktivierung beiträgt (5, 6).

Eine zusätzliche Barriere bilden insbesondere die *tight junctions* des Epithels. Zudem produziert das Epithel Eikanoside, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Folglich ist es somit wesentlich an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt. Zusätzlich werden auf dem Epithel Oberflächenrezeptoren für inflammatorische Zellen exprimiert wie *intercellular adhesion molecule* (ICAM), *major histocompatibility complex I* (MHC I) sowie *major histocompatibility complex II* (MHC II). So wird eine Leukodiapedese ermöglicht und Antigene können Lymphozyten präsentiert werden. Auch die dendritischen Zellen präsentieren den *cluster of differentiation 4* (CD4)⁺- und den *cluster of differentiation 8* (CD8)⁺-T-Zellen durch MHC I und MHC II nach Auswanderung in die pulmonalen und paratrachealen Lymphknoten Antigene. Durch eine hohe Anzahl von Antigenen, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) können sowohl die Proliferation der dendritischen Zellen als auch deren Expression der MHC-Komplexe stimuliert werden (5).

Aufgrund der Anatomie der Atemwege können Partikel, die größer als 2-3 μm sind, nicht in die Alveolen vordringen. Im Alveolarraum bilden die Alveolarmakrophagen 85 % der Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)¹ ab und tragen wesentlich zur Abwehr bei. Alveolarmakrophagen sind in dem Alveolarraum die einzigen phagozytotisch aktiven und zugleich antigenpräsentierenden Zellen (5). Zudem können die Alveolarmakrophagen durch die Freisetzung von Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und TNF- α sowohl Entzündungsreaktionen initiieren als auch durch Freisetzung von Inhibitoren eine Entzündung unterdrücken. Ebenfalls produzieren sie zur bakteriellen Abwehr *reactive oxygen specie* (ROS), Lysozym, Defensine und den Komplementfaktor C1q (5, 7). Weiterhin sind an der Abwehr im Alveolarraum die Lymphozyten von Bedeutung. Die Lymphozyten in den Alveolen setzen sich zu 50 %

¹ Eine BAL ist eine Art der Probengewinnung während einer bronchoskopischen Untersuchung. Nach Instillation von circa 20 ml NaCl-Lösung durch ein Bronchoskop wird diese wieder abgesaugt und zytologisch untersucht.

aus CD4+-T-Zellen, zu 30 % aus CD8+-T-Zellen, zu 10-15 % aus natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zu 5 % aus B-Lymphozyten zusammen (8). Diese sind an der zellulären und humoralen Abwehr beteiligt und präsentieren Antigene in den Lymphknoten. Außerdem können den geprimten T-Lymphozyten von dendritischen Zellen Antigene präsentiert werden. Typ1-T-Helferzellen (TH1-Zellen) produzieren Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2), die Typ2-T-Helferzellen (TH2-Zellen) synthetisieren Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10) sowie beide T-Zell-Klassen Interleukin-3 (IL-3), GM-CSF, TNF- α und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β). Die TH1-Zellen aktivieren Makrophagen und sind an Hypersensitivitätsreaktionen beteiligt, wohingegen die TH2-Zellen die Antikörperabwehr unterstützen sowie basophile und eosinophile Granulozyten aktivieren. Außerdem befinden sich im Alveolarraum auch neutrophile Granulozyten. Diese phagozytieren, bilden Sauerstoffradikale und produzieren zytotoxische Peptide sowie Proteine (5).

2.1.3 Adenokarzinom der Lunge

Lungenkarzinome stellen nach den chronisch ischämischen Herzerkrankungen und den akuten Myokardinfarkten die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar, wie Abbildung 1 zeigt (9).

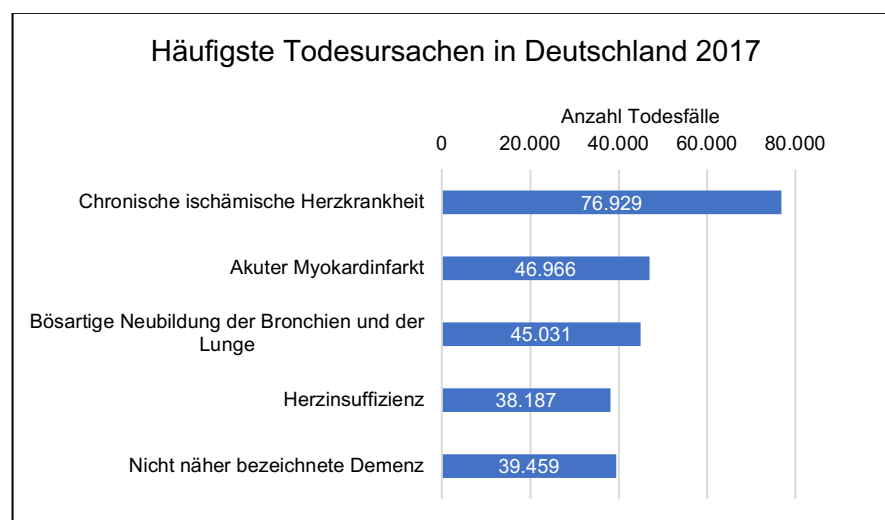


Abbildung 1 Häufigste Todesursachen in Deutschland 2017

Bösartige Neubildungen der Bronchien und Lunge stellten 2017 die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar. Abbildung auf Grundlage von Zahlen des Statisten Bundesamtes erstellt (9).

Neoplasien der Lunge und Bronchien haben bei Männern einen Anteil von 23,2 % und bei Frauen von 14,8 % an allen Krebserkrankungen (9).

Im Jahr 2017 starben 45.031 Menschen in Deutschland an bösartigen Neubildungen der Lunge und Bronchien. Mit 28.663 Verstorbenen waren sie bei den Männern die zweithäufigste Todesursache. Bei dem weiblichen Geschlecht waren sie dagegen mit 16.368 Verstorbenen lediglich die siebthäufigste Todesursache (10). In den letzten Jahren zeichnet sich jedoch eine Zunahme der Lungenkrebserkrankungen beim weiblichen Geschlecht ab, was Abbildung 2 abbildet.

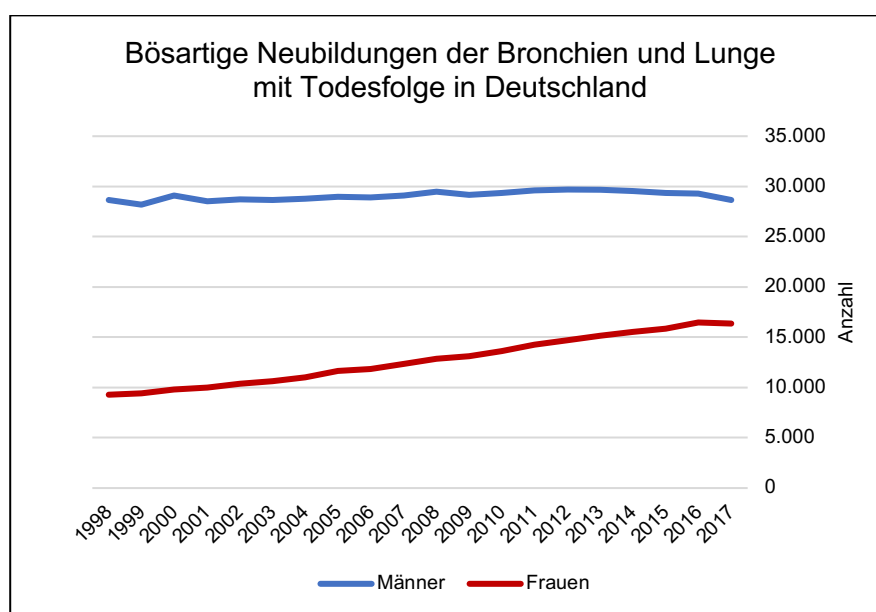


Abbildung 2 Bösartige Neubildungen der Bronchien und Lungen mit Todesfolge in Deutschland 2017

Bösartige Neubildungen von Bronchien und Lungen mit Todesfolge von 1998–2017 unterteilt nach Männern und Frauen. Abbildung auf Grundlage von Zahlen des Statistischen Bundesamtes erstellt (9).

Das Rauchen stellt den Hauptrisikofaktor für eine bösartige Neoplasie der Lungen und Bronchien dar. 85 % der Lungenkarzinome werden mit dem Rauchen assoziiert. Hierbei kommt der Dauer der Exposition als auch dem Beginn eine entscheidende Rolle zu. So wird einem Rauchbeginn im Jugendalter ein 30-fach erhöhtes Krebsrisiko und der Dauer von 40 py² ein 10-fach erhöhtes Risiko zugeschrieben (11). Besonders

² „Py“ ist die Abkürzung für „pack year“ und entspricht der Zahl der täglich gerauchten Zigarettenpackungen multipliziert mit den Raucherjahren.

im Hinblick auf den hohen Anteil von 22,4 % Rauchern in der Bevölkerung sind diese Zahlen besorgniserregend (12).

Die Lungenkarzinome werden anhand ihrer histologischen Merkmale und der Tumorverdopplungszeit klassifiziert. Man unterscheidet zwischen dem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (*non small cell lung carcinoma*, NSCLC) und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (*small cell lung carcinoma*, SCLC). Die NSCLC machen 85 % der Lungenkarzinome aus und werden weiter unterteilt in Plattenepithelkarzinome (ca. 40 % der NSCLC) mit einer Tumorverdopplungszeit von etwa 300 Tagen, Adenokarzinome (ca. 35 % der NSCLC) und Großzellige Lungenkarzinome (ca. 10% der NSCLC) (11, 13, 14). Die 5-Jahresüberlebensrate von neu diagnostizierten Lungenkarzinomen beträgt 15 %. Da der überwiegende Anteil erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird, sind ca. 60 % initial inoperabel (11). Im Weiteren soll auf die für diese Arbeit relevanten Adenokarzinome vertiefend eingegangen werden.

Das Adenokarzinom nimmt aufgrund seiner Ätiologie eine besondere Position ein. Es ist der häufigste Lungentumor bei Nichtrauchern und hat zudem einen Anteil von 40 % an den Lungennarbenkarzinomen. Im Gegensatz zu den anderen histologischen Typen beträgt das Verhältnis von Frauen zu Männern 6:1. Die Tumorverdopplungszeit liegt mit circa 180 Tagen zwischen der Verdopplungszeit der Plattenepithelkarzinome und die der SCLC (etwa 10-50 Tage) (11).

In den frühen Stadien basiert der kurative therapeutische Ansatz auf einer operativen Tumorentfernung. Durch das häufig periphere Wachstum werden Adenokarzinome allerdings erst spät diagnostiziert, was meist kein kuratives Vorgehen mehr zulässt.

In den letzten Jahren haben molekular stratifizierte Therapien zunehmend an Bedeutung gewonnen. 25 % der fortgeschrittenen Adenokarzinome können nach Mutationsanalyse zielgerichtet therapiert werden.

Eine der wesentlichen Mutationen mit 10-15 % ist die des *epidermal growth factor receptor*-Genes (EGFR-Gen) in Exon 19 oder 21. Diese beiden Mutationen machen 80 % der Mutationen des EGFR-Genes aus. Weiterhin können noch Exon 18 und 20 betroffen sein. Mutationen des EGFR-Genes kommen hauptsächlich bei Personen, die wenig geraucht haben, vor. In den aktuellen Leitlinien wird eine Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) wie Afatinib empfohlen. Die TKI haben eine bessere Wirkung und weniger Nebenwirkungen als eine platinhaltige Chemotherapie.

Durch TKI können Remissionsraten von 50-80 % erzielt werden sowie ein mittleres progressionsfreies Überleben von 8 bis 19 Monaten (15-17). Im Vergleich zu der konventionellen Chemotherapie mit einem mittleren Überleben von 9,6 Monaten liegt das Überleben bei einer TKI basierten Therapie bei 31,5 Monaten (18).

Ebenfalls molekular therapiert wird eine in 3-5 % vorkommende Mutation des *anaplastic lymphoma kinase*-Genes (ALK-Gen). Diese entsteht durch eine chromosomale Translokation mit dem Partnergen *echinoderm microtubule-associated protein-like 4* (EML4). Begleitende Mutationen des EGFR-Genes oder *kirsten rat sarcoma*-Genes (KRAS-Gen) sind sehr selten. Von der ALK-Mutation sind insbesondere junge Nichtraucher betroffen. Für die molekulare Therapie sind ebenfalls TKI in Deutschland zugelassen. Der Ansprechrate von beispielsweise Crizotinib liegt bei 70 %. Durch eine zunehmende Resistenzentwicklung des Tumors ist die Wirkung auf 1-2 Jahre begrenzt (15, 16).

2.2 Nanopartikel

2.2.1 Allgemeine Informationen

Nanopartikel (NP) nehmen eine immer wichtiger werdende Rolle in der technischen sowie chemischen Industrie und damit auch in unserer Gesellschaft ein. Verdeutlicht wird dies dadurch, dass die Europäische Kommission am 18. Oktober 2011 die erste gemeinsame Definition des Begriffes „Nanomaterial“ festlegte:

„Ein natürliches, zufällig entstandenes oder bewusst hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält und bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben. In bestimmten Fällen, in denen berechtigte Sorge um die Umwelt, Gesundheit, Sicherheit oder Wettbewerbsfähigkeit besteht, kann die Schwelle der Anzahlgrößenverteilung von 50 % durch einen Grenzwert zwischen 1 und 50 % ersetzt werden. Abweichend von dem oben genannten, sollten Fullerene, Graphenflocken und einwandige Kohlenstoff-Nanoröhrchen mit einer oder mehreren Außenmaßen unter 1 nm auch als Nanomaterialien betrachtet werden“ (19).

Diese NP entstehen durch mechanische, thermische und chemische Prozesse, die sowohl natürlichen (etwa bei Vulkanausbrüchen), als auch anthropogenen Ursprungs (etwa durch Autoabgase) sein können. In den meisten Fällen bilden NP dann Aggregate oder Agglomerate aus (20). Dies ist darin begründet, dass NP sich durch eine sehr große Oberfläche auszeichnen und so vor allem Oberflächenkräfte wie beispielsweise Van-der-Waals-Kräfte wirken können. Des Weiteren nehmen mit der Größe der Oberfläche auch die Oberflächenladung sowie die thermodynamischen Effekte zu, was zu der großen Reaktivität dieser Partikel beiträgt (21).

2.2.2 Allgemeine Aufnahmewege in den Körper

Um die toxischen Effekte der NP zu evaluieren und diese in der Medizin gezielt einzusetzen, ist es von Bedeutung, die unterschiedlichen Aufnahmewege bzw. Applikationsmöglichkeiten zu kennen.

2.2.2.1 Inhalative Aufnahme

Die inhalative Aufnahme scheint die wichtigste Möglichkeit für die NP zu sein, um in den menschlichen Körper aufgenommen zu werden. Da die Partikel eine Größe unter 3 µm haben, gelangen sie über die Hauptbronchien hinaus in die Alveolen, in denen ein Überwinden der Blut-Luft-Schranke möglich ist (5).

Allerdings werden in den Atemwegen die meisten NP von Makrophagen phagozytiert (22, 23). Des Weiteren werden die inhalierten Partikel über die Clearance der Lunge eliminiert. Dabei ist umstritten, ob die Clearance von kleinen Partikeln langsamer (24) oder gleich schnell (25) ist wie die von Größeren. Das Überwinden der Blut-Luft-Schranke scheint letztendlich weniger als 1 % der inhalierten Menge zu betragen (26).

Zudem ist umstritten, ob NP in der Lunge zusätzlich eine stark erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten und anderen entzündungsassoziierten Zellen induzieren (22, 23, 27) oder ob es lediglich in den ersten Tagen nach Inhalation einen geringen Anstieg der neutrophilen Granulozyten gibt (28). Eine Überexpression von Adhäsionsmolekülen führt zu einem Anstieg von Monozyten und Makrophagen (5). Auch zeigten sich nach der Inhalation von NP steigende Werte für IL-6 und IL-8, was für die Initiation einer Entzündung spricht (22, 23). Für Silika- und *super paramagnetic iron oxide nanoparticles* (SPIO-NP) konnte zudem eine direkte Inhibition der Makrophagen durch Eingriff in die Genregulation dieser und Verringerung der IL-10-Konzentration gezeigt werden (29). Es wurden für Iridium-NP auch erhöhte Werte der Laktat-Dehydrogenase (LDH) nach Exposition detektiert (28). Dies ist ein möglicher Hinweis für NP-assoziierte Zelluntergänge.

Weiterhin wird kritisch diskutiert, inwiefern NP im menschlichen Körper persistieren. Für Titaniumdioxid (TiO₂)-NP konnte eine Anreicherung im Blut und in den Lymphknoten dargestellt werden. 12 Stunden nach Exposition sanken das TiO₂-Level in den Lymphknoten wieder auf das ursprüngliche Niveau ab (30). Es zeigte sich für Iridium-192-NP nach Inhalation eine Halbwertszeit von 100-500 Tagen in der Lunge von Ratten. Der Abbau der Partikel war vor allem in den ersten Tagen sehr schnell und nahm mit der Zeit ab (28).

Des Weiteren wurde nach Applikation von Zinkoxid (ZnO)-NP herausgefunden, dass diese nach dem Überwinden des Bronchialschleims direkt in die Epithelzellen gelangen (31) und es zudem zu einer gesteigerten Permeabilität der Kapillaren und einer verringerten Membranintegrität kommt (27). Außerdem zeigten sich in Bezug auf

ZnO-NP eine gesteigerte Proliferation der Epithelzellen der Bronchioli und Lungenödeme. Bei Mäusen kam es innerhalb von 2 Tagen nach hochdosierter Applikation zu einem Gewichtsverlust von mehr als 10 %. Nach Abklingen der Entzündungsreaktionen wurde ein fibrotischer Umbau des Lungengewebes beobachtet (27), wie es auch bei Metallarbeitern im Rahmen des Metaldampffiebers, welches auch durch Nanopartikelinhalation ausgelöst werden kann, auftritt (32).

Ähnlich anderer entzündlichen Erkrankungen der Atemwege nahmen nach Exposition gegenüber NP der *Peak Expiratory Flow* (PEF)³ und das *Forced Expiratory Volume* (FEV)⁴ ab (33). Ebenfalls ließ sich eine gestiegene Mortalität nachweisen (27, 34).

2.2.2.2 Orale Aufnahme

Eine weitere Möglichkeit der Absorption stellt der Magen-Darm-Trakt dar. Hier bieten sich in der Medizin zahlreiche neue Möglichkeiten, Medikamente mit NP zu koppeln und so eine höhere Aufnahme der Wirkstoffe in den systemischen Kreislauf zu erzielen.

Es konnte gezeigt werden, dass oral aufgenommene NP mit den Villi der Enterozyten interagieren und durch diese auch penetrieren können (35, 36). Allerdings besteht eine hohe Variabilität in der Resorption und der Bioverfügbarkeit (37, 38). So wurden Absorptionsraten zwischen 0,25-14 % in Dünndarm und Dickdarm erreicht (38). Die Aufnahme findet hauptsächlich durch Endozytose der Enterozyten statt (39), während Diffusion und parazelluläre Passage kaum eine Rolle zu spielen scheinen (40). Beeinflusst wird die Resorption unter anderem durch den osmotischen Druck, Salze und Proteasen (38). Auch die Oberflächenladung der NP hat einen Einfluss auf die Resorption, welche von dem jeweiligen pH-Wert im Magen-Darm-Trakt abhängt (41). Des Weiteren können *solid lipid nanoparticle* (SLN) die *permeability glycoprotein 1* (PGP)-Efflux-Pumpe hemmen und so zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von Medikamenten, die sonst kaum intestinal resorbiert werden, beitragen (42).

³ PEF: In der Spirometrie gemessener maximaler Atemstrom während der Expiration.

⁴ FEV: In der Spirometrie während forcierter Expiration gemessenes Volumen innerhalb einer Sekunde.

2.2.2.3 *Dermale Aufnahme*

Die dermale Aufnahme von NP wurde in den letzten Jahren stark diskutiert. Die Haut dient dem Körper als Schutz vor einer Vielzahl von äußeren Bedingungen wie Mikroorganismen, Wasserverlust und Umwelteinflüssen (43).

Schon lange werden ZnO-NP in Sonnenschutzmitteln oder Wundheilsalben verwendet. Die Cremes verbleiben sehr lange auf der Haut und könnten so das Potential haben, vom Körper aufgenommen zu werden. Nach aktuellen Kenntnissen scheint eine dermale Aufnahme nicht möglich zu sein. Es zeigte sich, dass weder NP noch deren Agglomerate in Form von ZnO-Cremes oder TiO₂-Cremes, wie sie zum Beispiel als Sonnenschutzcremes verwendet werden, resorbiert werden können. Des Weiteren konnten nach der Applikation keine zytotoxischen Effekte auf die Zellen detektiert werden (44, 45). Dies ist auch der Fall, wenn die Haut oberflächliche Verletzungen oder Sonnenbrand aufweist (46). Vor allem das Stratum corneum scheint die Permeation der NP zu verhindern (47). Letztendlich scheint die Resorption von den Eigenschaften der NP, der mechanischen Belastung und der Dehnung der Haut abhängig zu sein (48).

2.2.2.4 *Aufnahme in das Nervensystem*

NP können sowohl über das periphere Nervensystem (PNS) aufgenommen werden als auch durch Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das zentrale Nervensystem (ZNS) gelangen. Die periphere Aufnahme kann über Endozytose in die Nervi olfactorii erfolgen, nachdem die NP inhaliert wurden (30, 49, 50). So ist für ZnO-NP beschrieben worden, dass diese in die Nervi olfactorii durch Endosomen aufgenommen werden und zu zweiwertigen Zinkionen (Zn²⁺) dissoziieren. Danach werden die Ionen aus den Endosomen wieder freigesetzt, sodass steigende Zytoplasmaspiegel von Zn²⁺ detektiert werden konnten (49). Die NP oder deren Ionen gelangen von den Nervi olfactorii weiter in den Bulbus olfactorius, in dem sie akkumulieren können (30, 49). Maximale Nanopartikellkonzentrationen wurden im Bulbus olfactorius 72 Stunden nach Exposition gemessen (30). Der Transport der Partikel zwischen den Nervenzellen kann über *gap junctions* oder Exozytose erfolgen (49). Für TiO₂ konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung zusätzlich zum Bulbus olfactorius auch im Hippocampus, dem Zerebellum und dem zerebralen Kortex möglich ist (30). Des Weiteren können im Blut befindliche NP auch die BHS

überwinden. Die BHS wird gebildet von der Basalmembran und dem Kapillarendothel, das durch *tight junctions* verbunden ist (4). Der genaue Mechanismus ist noch nicht abschließend geklärt. Da die *tight junctions* nur für Partikel kleiner als 4-6 nm überwindbar sind, scheint es auch möglich, dass NP durch die Membran des Endothels über die BHS gelangen können (51).

Es wurde bereits gezeigt, dass PEG-NP auch den LDL-Rezeptor nutzen können, um dann über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen zu werden (52). Auch können NP die Membranintegrität beeinflussen und vesikuläre Transporte induzieren oder durch die von ihnen gebildeten ROS die Integrität der BHS zerstören (53). Von Bedeutung für die Aufnahme in das ZNS scheint auch die Ladung der NP zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass Kationen die Permeabilität der BHS erhöhen und den Raum zwischen den *tight junctions* weiten (52). Neutral geladene NP und niedrige Konzentrationen von Anionen scheinen hingegen keinen Einfluss auf die BHS zu haben (54).

2.2.3 Effekte von Nanopartikeln

2.2.3.1 Bildung von ROS

ROS sind reaktive Verbindungen (z.B. Radikale), die oxidativen Stress verursachen können. Hierzu zählen die Superoxid- ($\cdot\text{O}_2^-$), Hydroxyl- (HO), Peroxyl- ($\text{RO}_2\cdot$) und Alkoxyradikale ($\text{RO}\cdot$) sowie die Verbindungen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hypochlorige Säure (HOCl) (55). Sie können im menschlichen Körper im physiologischen Stoffwechsel auch in den Mitochondrien und Peroxisomen entstehen und stellen ein Nebenprodukt der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese dar bzw. dienen unter anderem der Abwehr von Viren und Bakterien (56-58).

Auch NP können die ROS-Bildung induzieren. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass NP die NADPH-Oxidase Aktivität erhöhen und somit zu einer Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies führen (57). Das Verhältnis von GSH zu GSSG dient als Mittel zur Messung des intrazellulären Oxidationspotentials. Ein Missverhältnis zwischen diesen beiden kann dazu führen, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) zu aktivieren und so eine Synthese von mehr als 200 antioxidantisch wirkenden Enzymen hervorzurufen, wie unter anderen der Glutathion-S-Transferase (GST) und der Glutathion-Peroxidase (GPx). So können NP durch den erhöhten ROS-Gehalt der Zellen die Genexpression beeinflussen (58, 59). Auch eine

Entzündung kann auf diesem Weg durch NP- Exposition getriggert werden. Dies wird durch die *mitogen-activated protein-Kinase* (MAP-Kinase) und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFkB) vermittelt, welche zu einer Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen führen. Zudem kann der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt der Zelle verändert werden (59). Einige NP können auch direkt in den Mitochondrien die ROS-Produktion steigern (60, 61). Metallische NP, wie die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ZnO-NP, dienen als Katalysatoren der intrazellulären Haber-Weiss-Reaktion und sind so an der Bildung von Hydroxylradikalen beteiligt (58, 62), wie Abbildung 3 verdeutlicht.

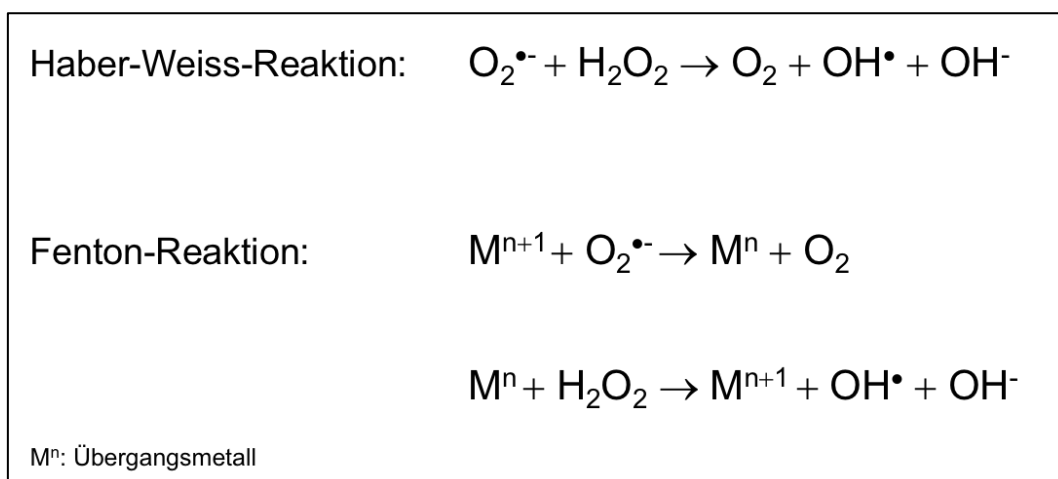


Abbildung 3 Haber-Weiss-Reaktion und Fenton-Reaktion

Intrazelluläre ROS-Bildung durch Übergangsmetalle. Grafik modifiziert nach Fu et al. 2014.

Die durch metallische NP gebildeten ROS verursachen Schäden an Proteinen, Lipiden, Zucker und der *deoxyribonucleic acid* (DNA) (61, 63-65). Folglich konnten Veränderungen an den Lipiden der Membranen von Mitochondrien, Endoplasmatischen Retikulum, Lysosomen, Peroxisomen und auch der Plasmamembran gefunden werden (66). Auch DNA-Strangbrüche und Schäden der mitochondrialen DNA wurden detektiert (58). Zudem scheint eine Modifikation der Nukleinsäuren mit damit einhergehender Genotoxizität möglich zu sein (58).

Können die genannten Zellschäden nicht durch Reparaturmechanismen kompensiert werden, gehen die Zellen in die Zustände der Apoptose, Nekrose oder Autophagie über (67). Oxidativer Stress ist somit mit der Entstehung diverser Krankheiten und dem Alterungsprozess assoziiert (58, 64, 68).

2.2.3.2 Genotoxizität und Zytotoxizität von metallischen Nanopartikeln

Im Folgenden wird auf die geno- und zytotoxischen Effekte von metallischen NP auf Zellen eingegangen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass diese von Größe, Form, Oberfläche und der Zusammensetzung der NP abhängig sind (69).

Die zytotoxischen Effekte von metallischen NP sind in Abbildung 4 dargestellt. Wie bereits erläutert, erhöhen NP auf unterschiedlichen Wegen das intrazelluläre ROS-Level. Ein wesentlicher Mechanismus der DNA-Schädigung durch ROS liegt in der Transversion von Guanin-Cytosin (GC) zu Thymin-Adenosin (TA) in der DNA. Dies führt zu einer zunehmenden Instabilität der DNA und fördert die Karzinogenese (69-71). Zudem können die positiv geladenen metallische NP nach Diffusion durch den Nucleolus direkt auf die negativ geladenen DNA wirken (72, 73). Auch Chromosomenaberrationen können durch metallische NP verursacht werden (69). Es wurde bereits gezeigt, dass im Rahmen der Fenton-Reaktion Fe^{2+} -Ionen Purin- und Pyrimidinbasen verändern sowie Quervernetzungen und Strangbrüche verursachen können (74). Des Weiteren können im Rahmen der Fenton-Reaktion entstandene ROS eine Entzündung induzieren. Durch mitochondriale Interaktion mit ROS wird das Verhältnis von Bax und Bcl2 verändert, was in einer Cytochrom C Freisetzung mit nachfolgender Elevation von p53 und der Caspase-3 sowie Apoptose der Zellen resultieren kann (69). Außerdem konnte gezeigt werden, dass NP wie ZnO-NP zu einem Verbleiben der Zellen in der G2-Phase führen können (71).

Ebenfalls eine wesentliche Rolle spielt die Entstehung von Malondialdehyd, das bei der Lipidoxidation entsteht. Es wirkt mutagen und karzinogen, indem es Addukte von Desoxyadenosin, -guanin und -cytosin bei physiologischen pH-Werten bildet (75). Auch Enyminaktivierung und Modifikation von Proteinen durch Carbonylation, Veränderung der Aminosäuresequenz und Peptidkettenbrüche entstehen durch Proteinperoxidation (69). Somit können der Zellstoffwechsel und letztendlich auch interzelluläre Prozesse durch metallische NP beeinflusst werden.

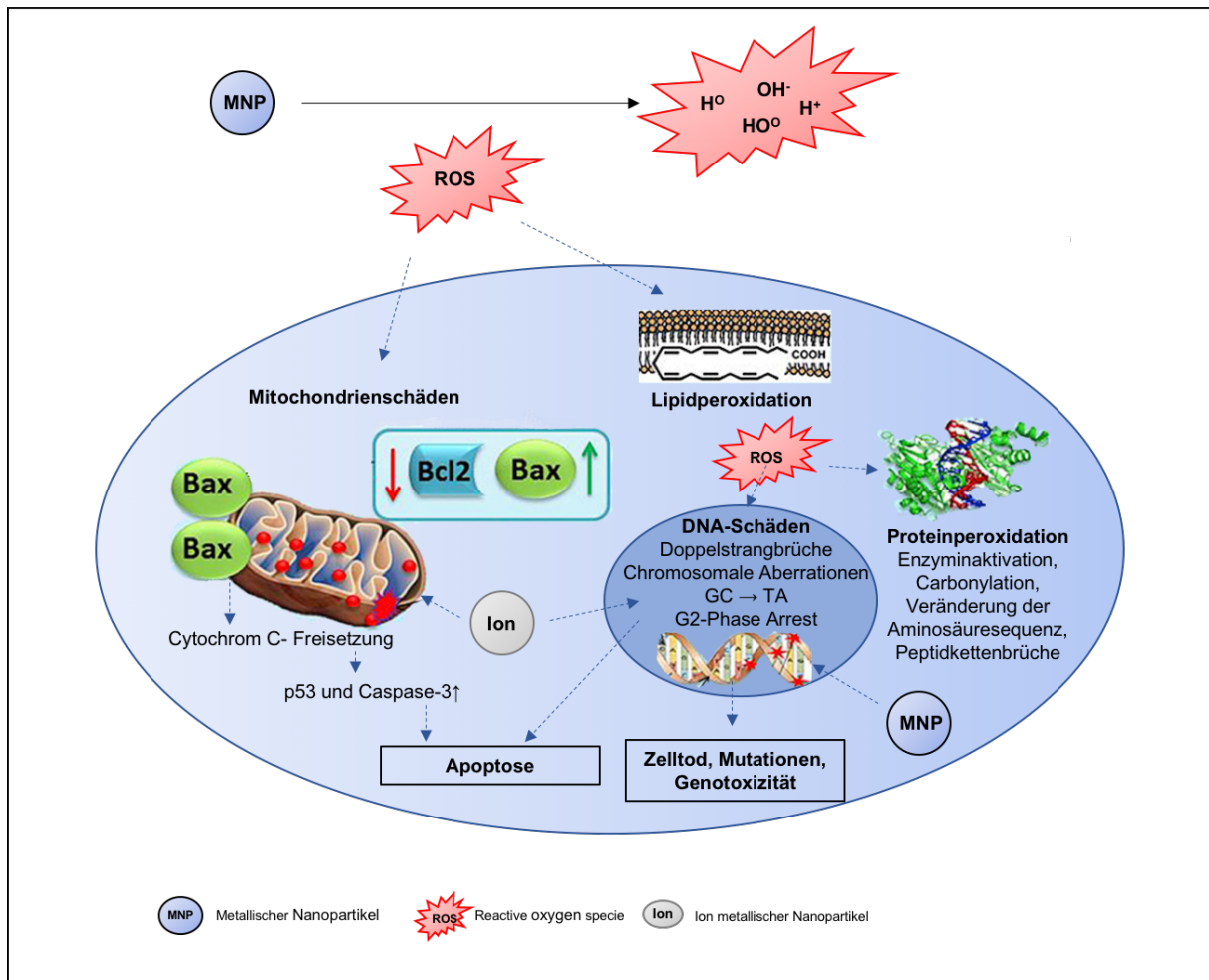


Abbildung 4 Genotoxizität und ROS-Effekte metallischer Nanopartikel

Intrazelluläre genotoxische Mechanismen metallischer Nanopartikel. Abbildung modifiziert nach Mortezaee et al. 2019 (69).

2.2.4 Verwendung in der Medizin

NP scheinen eine Vielzahl von Möglichkeiten zum Einsatz in der Medizin zu bieten und sind deswegen auch Gegenstand vieler aktueller Forschungen. Die Einsatzmöglichkeiten gehen von der Prävention bis hin zur spezifischen Therapie von Erkrankungen.

Im Bereich der primären Prävention wird der Einsatz von NP bei Impfungen erforscht. So könnten bald nicht invasive Impfungen durch Aufnahme der NP über die Mukosa möglich sein (37). Hier zeichnen sich NP nicht nur dadurch aus, dass sie die Impfstoffe vor Enzymen des Pankreas oder den niedrigen pH-Werten des Magens schützen, sondern auch selbst mit den Zellen der Immunabwehr, wie beispielsweise den Peyer-Plaques, interagieren (37). Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Rahmen einer

oralen Immunisation gegen *Helicobacter pylori* die Immunantwort gegen *polylactid-co-glycolid*-nanoparticles (PLGA-NP) mit *Helicobacter pylori* Lysaten stärker ausfiel, als eine ohne NP. Das Ausmaß der Immunantwort wurde am IgA, IgG1 und IgG2b gemessen (76). Zudem konnte im Rahmen einer inhalativen Zufuhr von Plasmid-DNA gegen *M. tuberculosis* an Chitosan-NP eine Erhöhung des Interferon- γ (INF- γ) gezeigt werden (77).

Auch in der Diagnostik könnten NP neue Möglichkeiten bieten. Beispielsweise können NP (bspw. Quantum Dots) durch fluoreszierende Kontrastmittel und spezifische Antikörper so modifiziert werden, dass sie sich in bestimmten Strukturen oder Tumoren anreichern. So bieten NP die Möglichkeit einer sehr selektiven und sensitiven Darstellung (78). Zudem haben NP den Vorteil, dass sie die BHS passieren können und so nicht nur in der Bildgebung neue Möglichkeiten bieten, sondern auch hinsichtlich des Medikamententransports ins ZNS (78).

Durch diesen zielgerichteten Transport der Medikamente werden die systemischen Nebenwirkungen reduziert und an dem gewünschten Wirkungsort, wie dem ZNS oder anderen Organen, hohe Wirkstoffkonzentrationen erreicht. Die NP agieren hierbei als Vehikel und werden über Endozytose in die Zellen aufgenommen. Die Freigabe der Pharmaka erfolgt nach Aufnahme in die Endosomen (37, 78). Gerade für den Transport von Zytostatika in der Tumorthherapie wäre dies eine Möglichkeit, die häufig therapielimitierenden Nebenwirkungen zu minimieren und die Dosis des Zytostatikums im Tumor zu erhöhen. Die Anreicherung im entarteten Gewebe kann entweder durch z.B. Kopplung an spezifische Oberflächenantikörper stattfinden oder durch eine erhöhte Permeabilität der Tumorgefäße ((37, 79). *Enhanced permeability and retention* (EPR) beschreibt eine vermehrte Anreicherung sowie auch einen verzögerten Abtransport von Nanomaterialien in Tumoren als in nicht-neoplastisch-veränderten Gewebe. Die Gefäße der Tumore enthalten Fenestrations von bis zu 100 nm sowie Endotheldysfunktionen, wodurch Nanomaterialien das Gefäßlumen leicht in den extravasalen Raum verlassen können. Zudem besteht eine Dysfunktion des lymphatischen Systems von Tumoren, was in einem *high interstitial fluid pressure* (IFP) und einer Akkumulation von Nanomaterialien resultiert, insbesondere im Tumorzentrum (79). Bowerman et al. konnten PLGA-NP mit Docetaxel koppeln und im Mausmodell in der Brustkrebsbehandlung eine verlängerte Überlebenszeit erzielen (80). Eine weitere Möglichkeit stellen *magnetic nanoparticles* (MNP) dar, die mit

Medikamenten gekoppelt sein können. Diese können durch ein magnetisches Feld (z.B. im MRT) zielgerichtet lokalisiert werden (81).

Weiterhin könnten MNP, wie unter anderem Nickel und Cobalt, gezielt in Tumoren durch äußere magnetische Felder Hitze induzieren (82). Auch für MNP beim Prostatakarzinom und metastasierten Knochentumoren konnte eine Tumorregression durch Hyperthermie gezeigt werden (81).

Grundsätzlich stellen NP eine große Chance für die Medizin dar. Um ihren Einsatz auch in der klinischen Routine zu ermöglichen, müssen jedoch noch Bioverfügbarkeit, Löslichkeit und Stabilität verbessert werden sowie die Immunogenität verringert werden (83).

2.3 Nanopartikel als Radiosensitizer

Die Strahlentherapie ist ein in der Medizin im Rahmen von Krebserkrankungen und bei benignen Erkrankungen angewandtes Therapieverfahren (84). In den aktuellen Leitlinien zur Therapie des Lungenkarzinoms wird eine Bestrahlung von mehr als 60 Gray fraktioniert, hyperfraktioniert oder auch stereotaktisch für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom in inoperablen Stadien empfohlen. Nach stereotaktischer Bestrahlung konnten in Studien bei bis zu 80 % der Patienten eine Tumorkontrolle erzielt werden (85). In 5-15 % kommt es nach Bestrahlung zu einer Strahlenpneumonitis, die nach 6-24 Monaten in eine Strahlenlungenfibrose übergehen kann (15). Bei einer kurativen therapeutischen Absicht kann die Lungenfibrose dosislimitierend sein (86). Folglich ist es notwendig, die Nebenwirkungen bei gleichbleibender Wirkung zu reduzieren.

Bei der Bestrahlung entstehen Ionen wie Hydrogen- und Hydroxylradikale aus Wasser (Radiolyse), aus denen sich wiederum Wasserstoffperoxid bilden kann (87, 88). Das Wasserstoffperoxid kann zu der Bildung von ROS und reaktiven Stickstoffverbindungen führen. Diese beiden Substanzen sind die Hauptursachen für die Nebenwirkungen einer Bestrahlung (88). Die Erhöhung des ROS-Levels durch Bestrahlung konnte bereits bei A549-Zellen gezeigt werden (89).

Das Hydroxylradikal führt zu einer Oxidation von Aminosäuren, was zur Hydroxylierung von aromatischen und aliphatischen Seitenketten sowie zu dem Hinzufügen von Gruppen in den aromatischen Ring führen kann. Dies führt sowohl zu Veränderungen der Proteinfunktion und -struktur als auch zu einer Beeinflussung von Enzymen. Auch scheinen DNA-Crosslinks im Chromatin zu entstehen. Zudem führen ROS zu Crosslinks zwischen Proteinen und Makromolekülen, die dann biologisch inaktiv sind (88, 90).

Den toxischsten Effekt haben die DSB. Aus diesen resultieren Chromosomenaberrationen, Mutationen und eine genetische Instabilität (88, 91, 92). Sie können auch aus DNA-Crosslinks zwischen zwei Strängen hervorgehen. Insbesondere Pyrimidinradikale scheinen DNA-Crosslinks zu begünstigen (93, 94). Die bei der Bestrahlung entstehenden Nukleotid-Radikale können an die Desoxyribose desselben oder benachbarter Nukleotide kovalent binden, sodass die Crosslinks innerhalb eines DNA-Stranges entstehen (88, 95). Außerdem sind Crosslinks

zwischen der DNA und Proteinen möglich, sodass eine Transkription und Replikation der entsprechenden Abschnitte nicht mehr möglich ist (88).

Um diese Effekte zu verhindern, gibt es zahlreiche zelluläre Mechanismen, die die Zellen schützen. Den größten protektiven Effekt hat die Superoxiddismutase (SOD) (96). Zudem kann zelluläres GSH mit seiner Thiol-Gruppe die entstandenen Radikale binden (88).

Ziel aktueller Studien ist es, die Wirkung der Strahlentherapie bei gleichbleibender oder verringerter Dosis zu verstärken (84). Kombinierte Chemotherapie und Immuntherapie sowie Radiosensitizer werden hierfür genutzt.

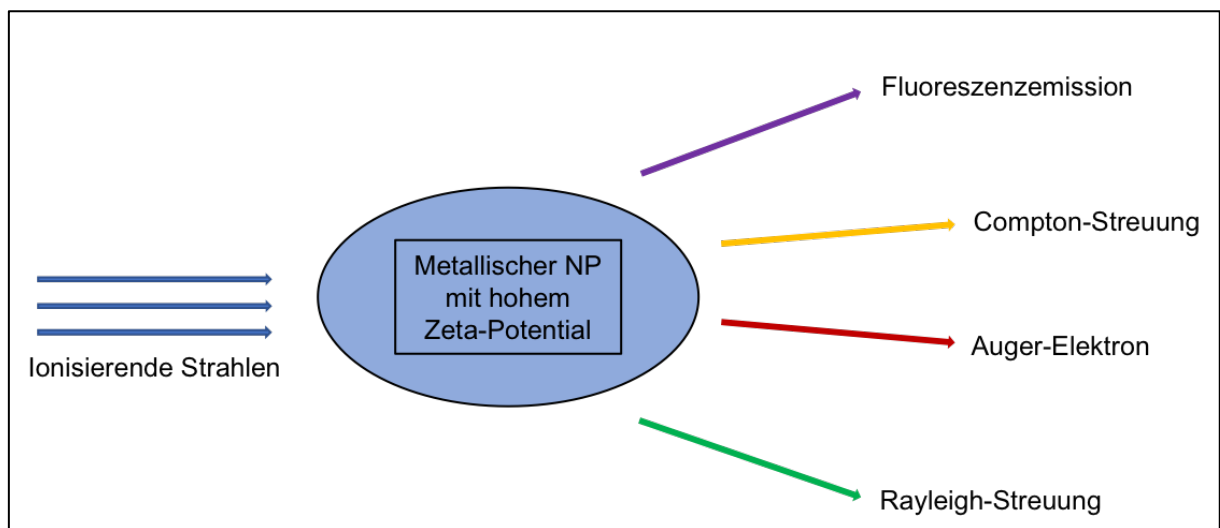


Abbildung 5 Nanopartikel als Radiosensitizer

Effekte radioaktiver Strahlung auf Nanopartikel mit hohem Zeta-Potential. Grafik modifiziert nach Klębowski et al. 2012 (87).

Insbesondere NP mit einem hohen Zeta-Potential (z.B. Gold-NP oder ZnO-NP) geben bei Bestrahlung Elektronen an das umgebende Gewebe ab und steigern so die Wirkung der Radiotherapie (87, 97), was Abbildung 5 zeigt. Zudem können durch den Auger-Effekt lokal die ionisierenden Effekte verstärkt werden. Dabei spaltet sich durch Ionsation ein Elektron aus einem Atom ab. Der Platz wird durch ein Elektron der äußeren Schale wieder eingenommen, sodass Energie frei wird, die in der Emission eines weiteren Elektrons resultiert (87, 98). Letztendlich generieren NP wie ZnO-NP ROS zusätzlich zu den bei der Radiotherapie entstehenden Radikalen (58). Die negativ geladene Glykokalyx von Tumorzellen ermöglicht zudem ein selektives

Penetrieren durch kationische NP unter Schonung des umgebenden nicht-neoplastischen Gewebes (87, 99-101). Dadurch wird eine zielgerichtete Therapie mit Verminderung der Nebenwirkungen auf das nicht-neoplastische Gewebe möglich. Auch können Magnetfelder oder Kurzwellenradiotherapie zu einer Hyperthermie im Gewebe führen, die durch die NP verstärkt wird (102).

2.4 Zink

2.4.1 Chemische und biologische Eigenschaften

Zink ist ein unedles Metall, das an 30. Stelle im Periodensystem steht und zu den Übergangsmetallen zählt. Durch seine abgeschlossenen d-Schale kommt es in seinen Eigenschaften jedoch den Erdalkalimetallen näher. Das Redoxpotential liegt bei -0,763 Volt. Das hohe Redoxpotential ermöglicht ein leichtes Oxidieren und so eine Bildung von ZnO-NP (103, 104). In Verbindungen weist Zink meist die Oxidationszahl +2 auf (104).

Im Rahmen dieser Arbeit ist Zinkoxid in Form von NP verwendet worden. Zinkoxid ist ein farbloses Pulver, das in Medizin schon lange in Form von Wundsalben angewandt wird, da es antiseptisch und schwach adstringierend wirkt. Zudem absorbiert ZnO UV-Licht, weshalb es ein häufiger Bestandteil von Sonnenschutzmitteln ist (103, 105).

Im menschlichen Körper ist Zink essentiell, da es Bestandteil der aktiven Zentren vieler Enzyme ist (103). Die Aufnahme erfolgt mit der Nahrung. Empfohlen werden von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) täglich 11-16 mg für Männer und bis zu 7-12 mg für Frauen in Abhängigkeit von der Phytatzufuhr (106). Es wird als Bestandteil des aktiven Zentrums von mehr als 300 Enzymen benötigt. Die Alkohol-Dehydrogenase, die Malatdehydrogenase, Carboanhydrase und die SOD sind nur einige Beispiele. Des Weiteren ist Zink auch Bestandteil der Zinkfingerdomäne, es ist an der Speicherung von Insulin beteiligt und spielt eine Rolle bei der Immunabwehr sowie der Zellproliferation.

Bei einer erhöhten Zinkzufuhr von 1-2 g treten Vergiftungserscheinungen wie Übelkeit, Erbrechen und Koliken auf (107). Ein Zinkmangel hingegen führt zu Wachstumsstörungen, Haarausfall, Wundheilungsstörungen und krustig-blasigen Hautveränderungen (108, 109).

2.4.2 Verteilung im menschlichen Körper

Der menschliche Körper enthält 2-3 g Zink. Dieses wird in der Skelettmuskulatur (60 %), den Knochen (30 %), der Leber (5 %) und der Haut (5 %) gespeichert (110). Das intrazelluläre Zink verteilt sich auf den Nukleus (30-40 %), das Zytoplasma und die Organellen (50 %) sowie die Zellmembran (111).

Die Resorption erfolgt im Duodenum und Jejunum über zinkselektive Transporter (*zrt- and irt-like protein*, ZIP). Auch die Zink-Abgabe in den extrazellulären Raum und transzelluläre Transporte werden über zinkselektive Transporter (*zinc transporter*, ZnT; ZIP) gesteuert (112). Hierbei werden lediglich 20-30 % der aufgenommenen Zinkmenge absorbiert. Intrazellulär wird Zink an Metallothionin gebunden. Bei bestehendem Zinkbedarf wird Zink im Weiteren an das Blut abgegeben. Im Blut bindet es an Albumin oder zu geringerem Anteil auch an Transferrin (109, 113). Die Plasmakonzentration beträgt circa 0,9 mg/l (114), wohingegen bei Patienten mit Metaldampffieber eine Plasmakonzentration von bis zu 400 mg/l gemessen werden konnte (114).

2.4.3 Aufnahmewege in die Zelle von ZnO-NP

Kao et al. gliedern die zelluläre Aufnahme von ZnO-NP in zwei Phasen, die in Abbildung 6 dargestellt sind (115).

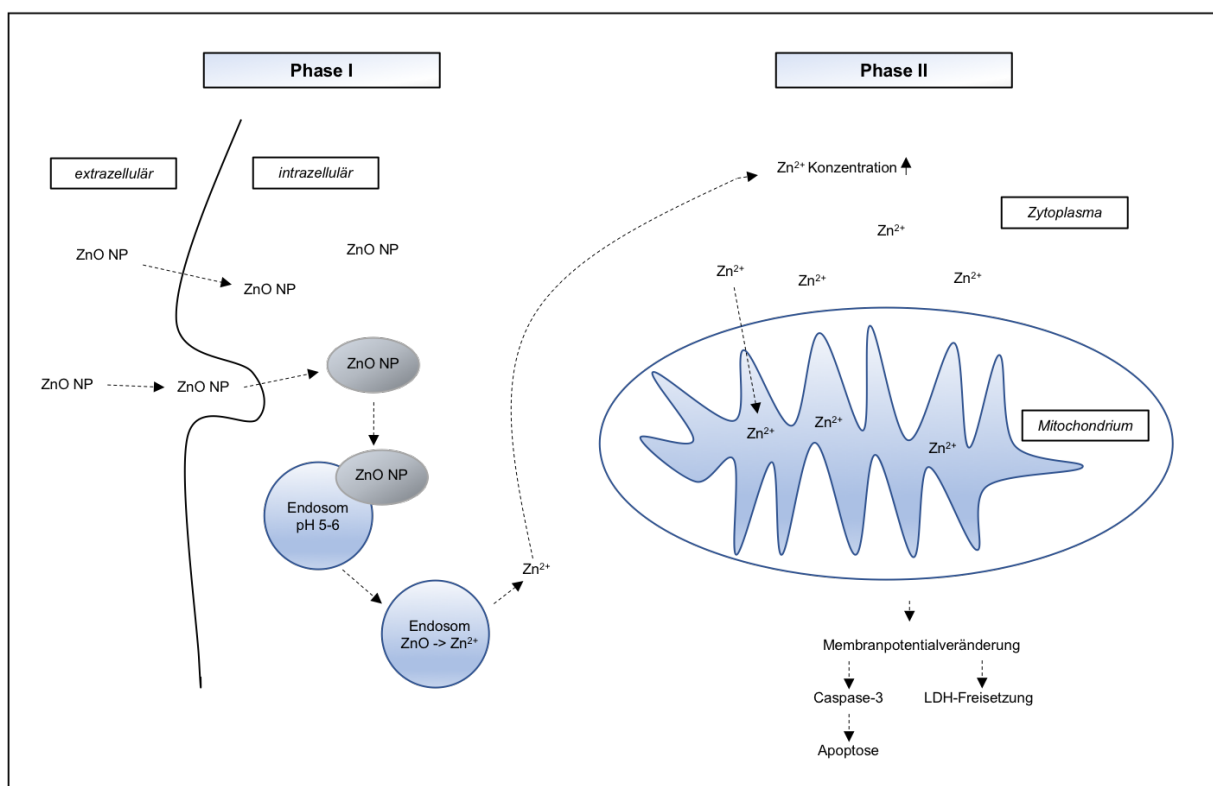


Abbildung 6 Aufnahme von ZnO-NP in die Zelle

Graphische Darstellung der Phase I und Phase II der intrazellulären ZnO-NP Aufnahme modifiziert nach Kao et al. 2012 (115).

In der ersten Phase werden die ZnO-NP durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die endozytotischen Vesikel fusionieren daraufhin mit den Endosomen. Da diese niedrige pH-Werte von 5-6 haben, dissoziieren die ZnO-NP hier in Zn^{2+} -Ionen, welche in das Zytoplasma übertreten (115).

Daraufhin beginnt die Phase II mit der Aufnahme der Zn^{2+} -Ionen in die Mitochondrien. Das mitochondriale Membranpotential kann nicht gehalten werden und die Caspase-3 wird aktiviert, als erster Schritt der initiierten intrinsischen Apoptose (115, 116). Jedoch konnten andere Arbeitsgruppen keinen Anstieg der Caspase-3 Aktivität zeigen (117). Hackenberg et al. beschreiben zudem eine direkte Membranüberschreitung von im Medium enthaltenden Zn^{2+} -Ionen (118).

Die zelluläre ZnO-NP Aufnahme scheint auch zeitabhängig zu sein. In mesenchymalen Stammzellen konnte nach 30 Minuten Exposition keine ZnO-NP Aufnahme festgestellt werden. Lediglich nach 60 Minuten konnten intrazelluläre Aggregate und einzelne NP transmissionselektronenmikroskopisch gesehen werden (119).

2.4.4 Zyto- und Genotoxizität von ZnO-NP

Auf der einen Seite scheinen die Effekte der ZnO-NP auf die Zellen von der Partikelgröße, -form und der -konzentration abhängig zu sein. So konnte gezeigt werden, dass unterschiedlich große Partikel eine unterschiedliche Wirkung auf menschliche Leukämiezellen haben und auch höhere Konzentrationen eine stärkere Herabsetzung der Proliferationsrate bewirken können (103, 120). Eine größenabhängige und zudem auch formabhängige Wirkung auf die mitochondriale Aktivität von A549-Zellen wurde gezeigt (121).

Auf der anderen Seite scheint auch die Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen wesentlich für die Wirkung von ZnO-NP zu sein. Hackenberg et al. zeigten eine Herabsetzung der Zellviabilität durch ZnO-NP, aber nicht bei der Exposition von ZnO-Puder. Zudem stellte die Arbeitsgruppe eine Zunahme der *olive tail moment* (OTM) als Indikator der Genotoxizität nach Exposition dar (122). Auch das Hervorrufen einer Inflammation konnte durch den Anstieg der Sekretion von IL-8 gezeigt werden (122, 123). ZnO-NP scheinen zu einem Mitosearrest führen zu können. Nach Modifikation der Oberfläche

von ZnO-NP mit TiO₂ nahm eine Freisetzung von Zn²⁺-Ionen ab und die Toxizität sank (124). Es zeigte sich eine Zunahme der Zellen in der S-Phase nach Exposition durch NP, während der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase und G2/M-Phase abnahm (125). Eine hohe Konzentration von Zn²⁺ wurde mit einem hohem intrazellulärem ROS-Gehalt in Verbindung gebracht, was letztendlich zu einer Apoptose führte (126). Als mögliche Ursachen hierfür wurden eine Verminderung der Atmungskette durch Inhibition des mitochondrialen Komplexes III, die Inhibition der Glutathion-Reduktase sowie der LADH beschrieben (117). Zhang et al. konnten für A549-Zellen eine Akkumulation von Autophagosomen nach ZnO-NP Exposition zeigen. Die ZnO-NP setzten in Lysosomen Zn²⁺-Ionen frei, die wiederum die Lysosomen schädigten und über mitochondriale Schäden und ROS Elevation zum Zelltod führten (127). Zudem führten intrazelluläre Aggregate der Mikrotubuli und der Aktinfilamente nach ZnO-NP Exposition zu Nekrosen (128).

Zusammenfassend kann eine veränderte intrazelluläre Zinkkonzentration durch Beeinflussung unterschiedlicher Signalwege in Apoptose und Nekrose resultieren (128).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

A549	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA
------	--

3.1.2 Eier

Eier, weiß (Leghorn)	LSL, Dieburg, Deutschland
----------------------	---------------------------

3.1.3 Zellkulturmedium und Puffer

Tabelle 1 Zellkulturmedium und Puffer

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium, DMEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline	Life technologies, Carlsbad, USA
Fetales Kälberserum 500 ml, FCS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/ Streptomycin, (100 U/ml/ 100 µg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent	Life technologies, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Geräte

CASY Cell counter, Model TT	Roche Diagnostics International AG, Basel, Schweiz
Dentaler Silikonring (6,4 mm)	Dentaurium, Ispringen, Deutschland
Fluoroskan Ascent Microplate	Thermo Fisher Scientific GmbH, Rockford, USA
Gammacell 2000, γ -Quelle (Cs137)	Mølgaard Medical, Risø, Dänemark
Inkubator, Heracell 150i CO2 Incubators	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Kühlschrank -25°C	Liebherr Premium, Bulle, Schweiz
Mikroskop, Leitz Orthoplan	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop, Nikon TMS	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Multiskan Ascent	Thermo Electron Cooperation, Dreieich, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Skalpell No. 11	Feather, Osaka, Japan
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 210 H, Berlin, Deutschland

Waage	Precision Advanced OHAUS, Gießen, Deutschland
Wasserbad	INFORS HT, Bottmingen, Schweiz
Vortex	Fisherbrand Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge, 100 VAC Fisherbrand	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, Multifuge 1L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

Cell culture dishes cellstar 96 well plate, black, 15MM REF 655090 µCLEAR	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon 15 ml/ 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Microcentrifugen Eppendorfgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Parafilm „M“™ Laboratory Film	Pechiney, Chicago, USA
Pipette cellstar®, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten für Pipetus	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitze; 0,5-20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland

Zellkulturflaschen; 175 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ²	Cellstar, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
---	---

3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4 Chemikalien und Reagenzien

AlamarBlue	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Antikörper (Von-Willebrand-Faktor, Zytokeratin)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Casy-Toner	Roche Diagnostics International AG, Basel, Schweiz
Destilliertes Wasser	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
En Vision	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Eosin	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	AppliChem, Inc., St. Louis, USA
Hämalaun	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypan Blau 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tween	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
ZnO-Nanopartikel (15-18 nm)	

3.1.6 Software

Tabelle 5 Software

Ascent Software, Version 2.6	Thermo Electron Corporation, Dreieich, Deutschland
CASY 1 TT®	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Fluoroskan Software, Version 2.4	Thermo Fisher Scientific GmbH, Rockford, USA
Microsoft Office 2003/2007/2011	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Stata 15.1 SE	StataCorp LLC, College Station, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Die Zelllinie A549 wurde aufgetaut und in DMEM-Nährmedium (10 % FCS, 2 % Penicillin/Streptomycin) für 24 Stunden in einer 25 cm²-Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ angezüchtet. Daraufhin erfolgte ein Austausch des DMEM-Nährmediums (5 % FCS, 2 % Penicillin/Streptomycin) und die weitere Kultivierung für 24 Stunden.

Die Mobilisation der adhärennten Zellen fand durch zweimaliges Waschen mit PBS und einer 5-minütigen Trypsin-EDTA-Inkubation statt. Nach Verdünnung mit Medium wurde das Trypsin-EDTA durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 1400 rpm entfernt. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung der A549-Zellen in DMEM-Nährmedium (5 % FCS, 2 % Penicillin/Streptomycin).

Zum Erhalt der Zelllinie wurden diese in 25 cm²- oder 75 cm² -Zellkulturflaschen mit DMEM-Nährmedium (5 % FCS, 2 % Penicillin/Streptomycin) kultiviert und alle 2 Tage auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt, um die Zell-Zell-Kontakte zu verringern und eine weitere Proliferation zu ermöglichen.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Es wurden 20 µl der abgelösten und resuspendierten Zellen mit 20 µl Trypan-Blau vermischt und auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Das Trypan-Blau dringt in nicht vitale Zellen mit geschädigter Membran ein und färbt diese blau. Daraufhin wurden die ungefärbten, vitalen Zellen in allen 4 Quadranten (= x) gezählt.

Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = (x * 10000 * \text{Verdünnungsfaktor})/4$$

3.2.3 Herstellung der Nanopartikel

Die ZnO-NP wurden freundlicher Weise von dem Institut für anorganische und analytische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität zur Verfügung gestellt.

Für den MTT wurden ZnO-NP mit einer Größe von 15-18 nm verwendet, welche nach dem Verfahren von Cheng et al. synthetisiert wurden (129). Hierfür wurden $\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.09 g) in 10 ml Methanol gelöst und 20 ml Tetramethylammonium Hydroxid (25 % w/w) in Wasser sowie Tetramethylammonium Hydroxid (25 % w/w in Methanol) in dem Verhältnis von 1:3 hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung bei 50 °C für 24 Stunden in einem teflonbeschichteten Stahlautoklaven erhitzt und zuletzt mit Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.4 MTT mit A549-Zellen

3.2.4.1 Aussaat der Zellen

Die A549-Zelllinie wurde in 9 Zellkulturflaschen mit jeweils 25 cm² ausgesät und wie unter 3.2.1 beschrieben weitere 48 Stunden inkubiert.

3.2.4.2 Inkubation mit ZnO-NP

Die ZnO-NP wurden mit Hilfe einer Feinwaage auf 1 mg abgewogen. Entsprechend der Konzentration wurden 1 mg ZnO-NP in 100 µl (Konzentration 100 µg/ml), 1000 µl (Konzentration 10 µg/ml) und 100000 µl (Konzentration 0,1 µg/ml) gelöst und 5 Minuten im Ultraschallbad suspendiert.

Daraufhin wurden zu 4,95 ml Medium 50 µl ZnO-NP Suspension, beziehungsweise für die Kontrolle 50 µl H₂O, pipettiert und in je eine 25 cm² Flasche gegeben. Diese wurden dann weitere 15 Minuten, 60 Minuten oder 240 Minuten inkubiert. Bei der Kontrolle (0 Minuten) erfolgte ein sofortiges Abwaschen der ZnO-NP nach der Applikation. Allein bei der Totkontrolle fand nur ein Mediumwechsel (5 ml) statt.

Nach abgelaufener Inkubationszeit von 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten wurden die 25 cm² Flaschen mit 3-4 ml PBS gespült und im Folgenden für 5-15 Minuten mit 3 ml Acutase inkubiert, um die Zellen zu mobilisieren. Die gelösten A549-Zellen wurden auf 9 Falcons aufgeteilt und in 7 ml Medium pipettiert. Des Weiteren wurden die Falcons bei 1400 rpm zentrifugiert und anschließend in 6 ml Medium resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 400 µl entnommen und zur Zellzahlbestimmung und Vitalitätsbestimmung mit Hilfe des CASY-TT verwendet. Weiterhin wurden für jede Inkubationszeit die mit ZnO-NP inkubierte Probe und die Kontrolle auf je 4 Falcons (je Falcon 300.000 Zellen) aufgeteilt.

Daraufhin wurden die A549-Zellen in Falcons mit 2 Gray, 4 Gray oder 8 Gray bestrahlt. Es folgte die Aufteilung der Zellen auf 4 96-Wellplatten, für jede Bestrahlungsdosis sowie für die Kontrolle (0 Gray) jeweils eine. In jedes Well wurden 250 µl der Suspension pipettiert. Die Platten wurden für weitere 48 Stunden inkubiert.

3.2.4.3 CASY-TT

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte nach der ZnO-NP Inkubation mit Hilfe des CASY-TT. Zu diesem Zeitpunkt hatte noch keine Bestrahlung der Zellen stattgefunden.

CASY-TT misst die Widerstandsänderung in einer Messkapillare zwischen zwei Elektroden als Maß für das Zellvolumen. Bei Durchtritt durch die Messkapillare kann der Strom nicht durch die Membran vitaler Zellen dringen, so wird ihr vollständiges Volumen gemessen. Geschädigte oder avitale Zellen zeigen eine Durchlässigkeit der Zellmembran für den elektrischen Strom, sodass ihre Größe als etwa zellkerngroß bestimmt wird. So kann das CASY-TT die Zellgröße, den Zellgehalt, die Zellvitalität und Agglomerate bestimmen (130).

3.2.4.4 Alamar-Blue Assay

Der Alamar-Blue Assay diente der Bestimmung der metabolischen Aktivität. Es wurden 200 µl einer 10 % Alamar-Blue-Medium Lösung in die Wellplattenfelder pipettiert und nach einer dreistündigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Farbänderung am Fluoroscan (Ex: 540 nm, Em: 600 nm) detektiert, als Indikator für die mitochondriale Aktivität der Zellen.

3.2.4.5 Kristallviolett Assay

Der Kristallviolett Assay diente der Zellquantifizierung. Nach der Bestimmung der metabolischen Aktivität durch den Alamar-Blue Assay wurden die Zellen zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 40 µl Kristallviolett inkubiert. Es folgte das erneute dreimalige Spülen mit 200 µl PBS und das Lösen des verbleibenden Kristallviolett mit 40 µl 10 %iger Essigsäure. Anschließend fand die Messung am Multiscan (540 nm) statt.

Setzt man die Ergebnisse des Alamar-Blue Assays zu denen des Kristallviolett Assays ins Verhältnis, erhält man den Stoffwechsel je Zelle.

3.2.5 CAM Assay

3.2.5.1 Das Chorioallantoismembran-Modell

Das Chorioallantoismembran-Modell (CAM-Modell) ist ein beliebtes Xenograft-Modell für die Tumorangienese und -metastasierung. Es stellt einen Zwischenschritt in dem Übergang der *in vitro*- zu den *in vivo*-Modellen dar, da es sich um ein einfaches *in vivo*-Modell mit einem geschlossenen System handelt - deswegen häufig auch als *in ovo*-Modell bezeichnet.

Die CAM besteht aus einer ektodermale, mesodermalen und endodermalen Schicht und ist sehr gefäßreich (131, 132). Sie entwickelt sich zwischen dem 3. und 13. Entwicklungstag bis sie den Embryo komplett umgibt und ausgereift ist (132). Die physiologische Aufgabe der CAM ist der Gasaustausch von O₂ und CO₂ über die Poren der Eischale (133).

Die Tumorzellen können nach Öffnung des Eies auf die ektodermale Seite aufgetragen werden. Die tumorinduziert gesteigerte Angiogenese ermöglicht eine frühzeitige Metastasierung der Tumore in den Hühnerembryo oder andere Teile der CAM, wie Abbildung 7 zeigt. Als Modell für die Metastasierung eignet es nicht zuletzt auch, weil es sich um ein geschlossenes System handelt, das bis zum 13. Entwicklungstag keine spezifische Immunabwehr aufweist. Dies ermöglicht zudem die Ansiedlung menschlicher Tumorzelllinien (131, 134, 135). Auch hat die CAM keine eigene nervale Innervation, sodass der Embryo keine Schmerzen empfinden kann. Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist, dass Tumore nach Applikation auf der CAM schneller wachsen als in anderen Tiermodellen, wie beispielsweise der Maus (134).

Neben der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten histologischen Aufarbeitung der CAM nach Euthanasie des Embryos besteht auch die Möglichkeit einer *in ovo* Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) oder anderer klinisch-radiologischer Verfahren. Der Gebrauch menschlicher Zelllinien ermöglicht zudem eine Evaluation der Metastasierung durch *polymerase chain reaction* (PCR) der Zielorgane (131, 135).

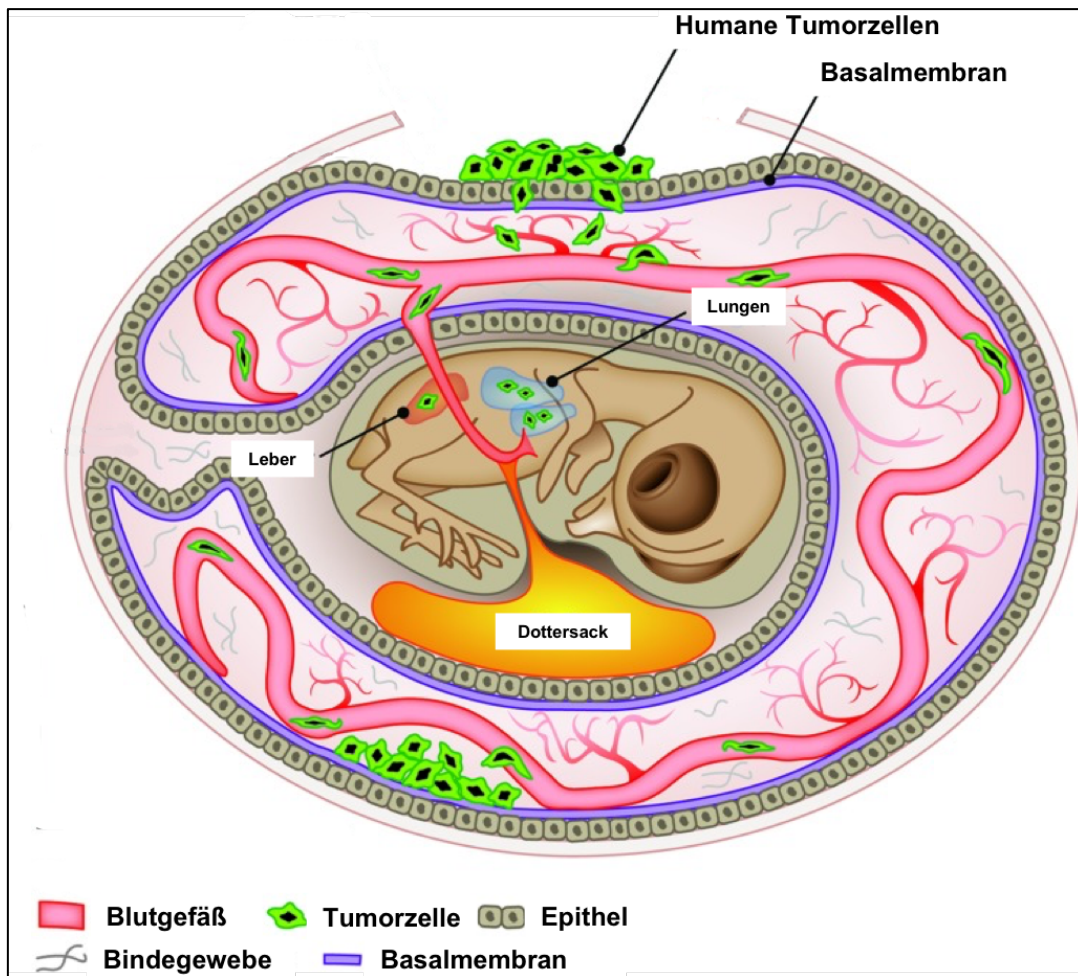


Abbildung 7 Schema des CAM-Modells

Chorioallantoismembran-Modell (CAM-Modell) mit appliziertem Tumor und induzierter Angiogenese. Die Tumorzellen nutzen die Neovaskularisation für die Metastasierung in den Hühnerembryo und weitere Areale der CAM. Abbildung modifiziert nach Liu et al. 2013 (135).

Jedoch gibt es auch limitierende Faktoren für dieses Modell. So kann aufgrund der fehlenden spezifischen Immunabwehr auch keine Beurteilung der Wechselwirkungen zwischen dem Tumor und dem Immunsystem erfolgen. Zudem kann das CAM-Modell nur eine limitierte Zeit genutzt werden (21 Tage bis zum Schlüpfen des Kükens). Dies ist deutlich kürzer als bei anderen Tiermodellen, wie beispielsweise dem Mausmodell. Außerdem sind derzeit nur eine begrenzte Anzahl von Antikörpern für das Färben von Hühnergewebe verfügbar (131).

3.2.5.2 Durchführung des CAM-Assay

Die Eier wurden 10 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Öffnung mit einem Durchmesser von 1 cm fand an dem spitzen Eipol mit Hilfe eines Skalpells und einer Schere statt, nachdem diese vorher in dieser Position gelagert wurden, um den Inhalt abzusenken. Danach wurde ein Silikonring (Durchmesser: 6,4 mm) auf der CAM in Gefäßnähe platziert. In dem Silikonring erfolgte die Ansiedlung von 1.000.000 A549-Zellen, gelöst in 10 µl Nährmedium und 10 µl Matrigel. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die den angewachsenen Tumor enthaltenden Anteile der CAM ausgeschnitten. Es erfolgte die Fixierung in Formalin und Einbettung in Paraffin.

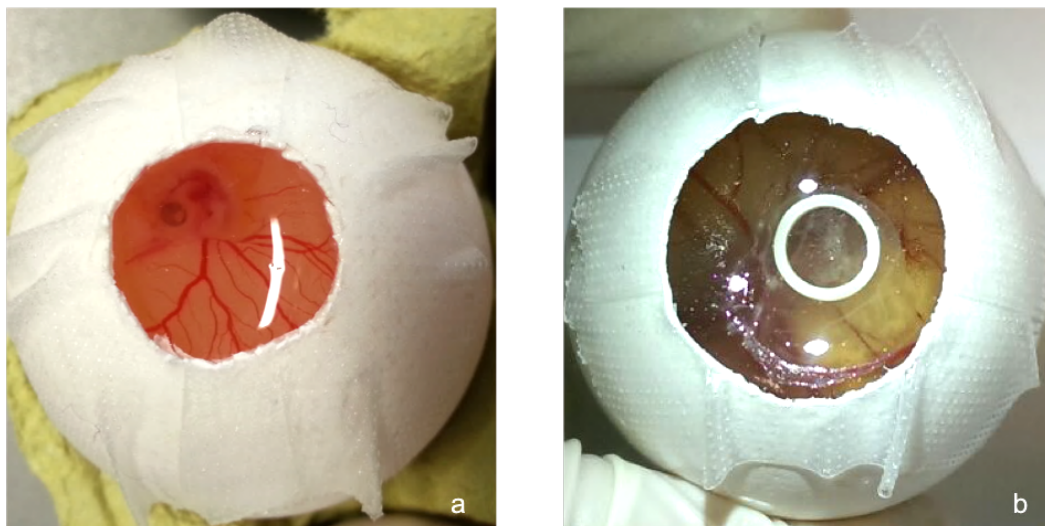


Abbildung 8 CAM-Modell

A: CAM nach Eröffnung. Embryo, B: Silikonring mit zentralen, weißen Tumor nach 24-stündiger Inkubation.

3.2.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der CAM

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HE-Färbungen der CAM wurden freundlicher Weise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt (136). Entparaffinierte Schnitte wurden in Formalin für 10 Minuten bei 4 °C gelagerten und für 5 Minuten mit Mayer's Hämalaun (Konzentration (Hämalaun: Aqua dest): 1:1) gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser und Aqua dest gespült. Daraufhin wurden sie mit 0,5 % Eosin gefärbt. Es folgte das Auswaschen überschüssiger Färbemittel mit

80 %-igen, 90 %-igen und 100 %-igen Isopropanol und Xylol. Dann wurden die gefärbten Schnitte mit Entellan eingedeckt.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung hat zum Ziel, die basophilen Strukturen mit Hilfe des Hämatoxylins blau zu färben, wie den Zellkern, die Ribosomen und das endoplasmatische Retikulum. Die azidophilen Strukturen, wie zum Beispiel das Zytoplasma, stellen sich durch das Eosin rot dar.

3.2.5.4 Immunhistochemische Färbungen der CAM

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit Unterstützung von [REDACTED] [REDACTED] angefertigt. Zunächst wurden entparaffinierte Paraffinschnitte mit 5 Minuten Zugabe mit TBS/Tween gespült. Nach weiteren 20 Minuten in Methanol/H₂O₂ wurden die Schnitte mit Aqua dest gespült. Daraufhin wurde der Antikörper (gegen Zytokeratin oder den Von-Willebrand-Faktor von Dako) für 30-60 Minuten inkubiert und der Schnitt danach 2-mal für je 5 Minuten mit TBS/Tween behandelt. Für 30 Minuten wurde En Vision inkubiert. Nach 2-maligen Spülen mit TBS/Tween wurden die Schnitte mit DAB und Hämalan gefärbt.

Es wurden zwei immunhistochemische Färbungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Eine Zytokeratinfärbung zur Färbung des menschlichen Zytokeratins für die Differenzierung zwischen avianen und humanen Tumoren sowie zur sensitiveren Darstellung von Zellvereinzelnungen im Rahmen einer Invasion. Des Weiteren wurde der endothelial gebildete Von-Willebrand-Faktor immunhistochemisch gefärbt. Kleine Gefäße konnten so besser beurteilt werden als in konventioneller HE-Färbung.

3.2.5.5 Histologische Auswertung der CAM

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte rein qualitativ nach den Kriterien *a.* mikroskopisch sichtbare Tumorzellen auf der CAM, *b.* Bestimmung der Invasion und des Ursprunges der Tumorzellen, *c.* histologische Hinweise auf eine Angiogeneese.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Stata 15.1 SE durchgeführt.

Die Auswertung der CASY-TT-Messungen erfolgte nach Bezug der Vitalitätswerte auf die Werte der unbehandelten Kontrolle (0 Minuten, keine ZnO-NP) in Prozent. Auch die Auswertung der metabolischen Aktivität erfolgte nach prozentualem Bezug der Rohwerte auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle des Durchganges (0 Minuten, keine ZnO-NP, 0 Gray). Die unbehandelten Kontrollen wurden sowohl für die Vitalität als auch für die metabolische Aktivität als 100 % angenommen. Im Rahmen der Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurden von den fünf unabhängigen Versuchsdurchläufen für jede ZnO-NP Konzentration jeweils der höchste und niedrigste Wert ausgeschlossen, dies erfolgte sowohl für die Werte der Vitalität als auch für die Werte der metabolischen Aktivität.

Die Vergleiche der exponierten Gruppen untereinander und zu der Kontrolle wurden mittels ANOVA-Testung durchgeführt. Es erfolgte eine ergänzende Bonferroni-Testung. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Alamar-Blue Assay und Kristallviolett Assay

Dieser Teil meiner Promotion beschäftigt sich mit den konzentrations- und zeitabhängigen Veränderungen des Zellstoffwechsels von A549-Zellen durch ZnO-NP mit oder ohne nachfolgende Bestrahlung. Die Veränderungen des Stoffwechsels werden als Maß für die Toxizität der ZnO-NP und der Bestrahlung betrachtet. Es soll geklärt werden, ob die Bestrahlungseffizienz durch vorangehende ZnO-NP Inkubation gesteigert werden kann.

Hierfür wurde der Alamar-Blue Assay genutzt und durch den Kristallviolett Assay ergänzt, um den Zellstoffwechsel je Einzelzelle zu bestimmen. Die Zellen wurden in vier Gruppen eingeteilt, welche gar nicht (0 Minuten), 15 Minuten, 60 Minuten oder 240 Minuten ZnO-NP ausgesetzt wurden. Daraufhin wurden die NP abgewaschen und die Vitalität der Zellen mittels CASY bestimmt. Es folgte die Bestrahlung der vier Gruppen mit jeweils 0 Gray (keine Bestrahlung), 2 Gray, 4 Gray und 8 Gray. Die Auswirkung der Bestrahlung und der ZnO-NP wurde an der metabolischen Aktivität gemessen. Dieser Ablauf erfolgte für die ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml mit jeweils einer Kontrolle, welche keinen ZnO-NP ausgesetzt wurde. Für jede Konzentration gab es 5 unabhängige Versuchsdurchläufe.

4.1.1 ZnO-NP verringern die Vitalität der A549-Zellen

Abbildung 9 zeigt eine signifikante Senkung der Vitalität nach ZnO-NP Inkubation von 100 µg/ml gegenüber den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und der Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 240 Minuten. Der Kruskal-Wallis-Test war nur für die Inkubationszeit von 240 Minuten signifikant.

Bei geringeren Inkubationszeiten von 15 Minuten, 60 Minuten und der Kontrolle (0 Minuten) unterschied sich die Vitalität der A549-Zellen für alle ZnO-NP Konzentrationen nicht signifikant.

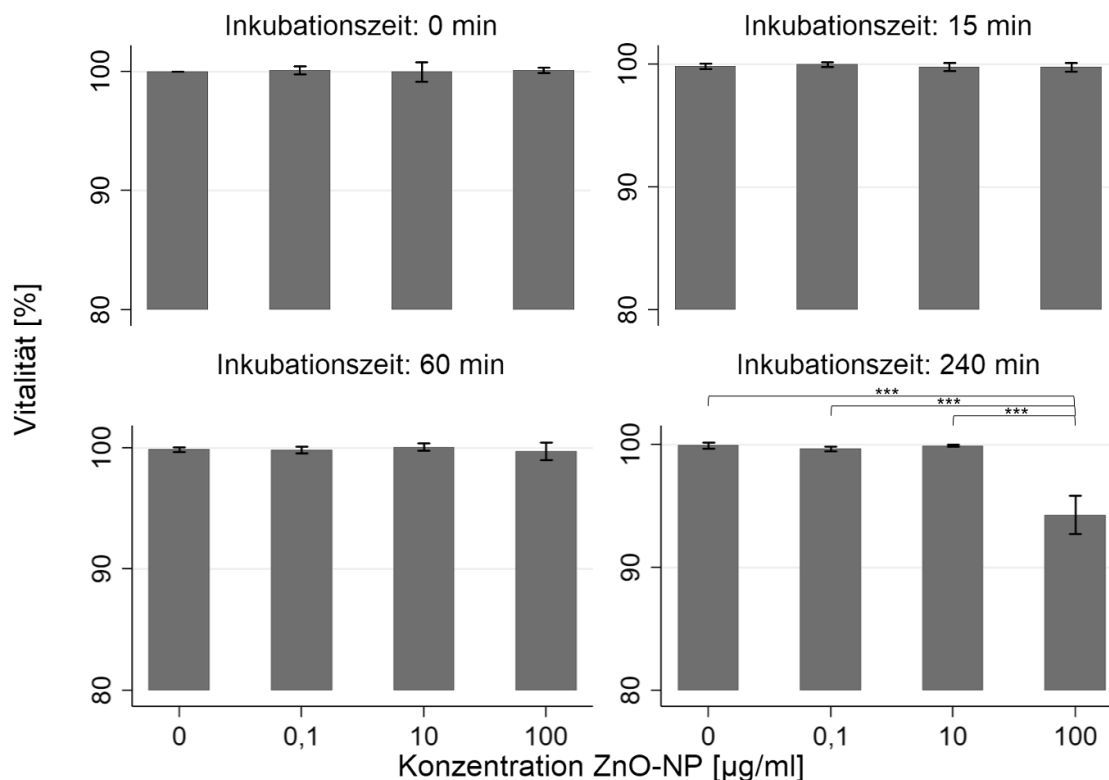


Abbildung 9 ZnO-Nanopartikel verringern die Vitalität von A549-Zellen

Dargestellt ist die Vitalität der A549-Zellen nach Exposition gegenüber 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml ZnO-NP und ohne Exposition gegenüber ZnO-NP. Es werden die Inkubationszeiten von 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten betrachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Die Signifikanzniveaus sind mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ gekennzeichnet. Rohwerte im Anhang (S. 88).

4.1.2 Einfluss der Bestrahlung auf den Zellstoffwechsel

Die Zellen wurden nach Inkubation der ZnO-NP bestrahlt. Dabei diente die Kohorte, die keine Bestrahlung (0 Gray) erhalten hatte, als Kontrolle.

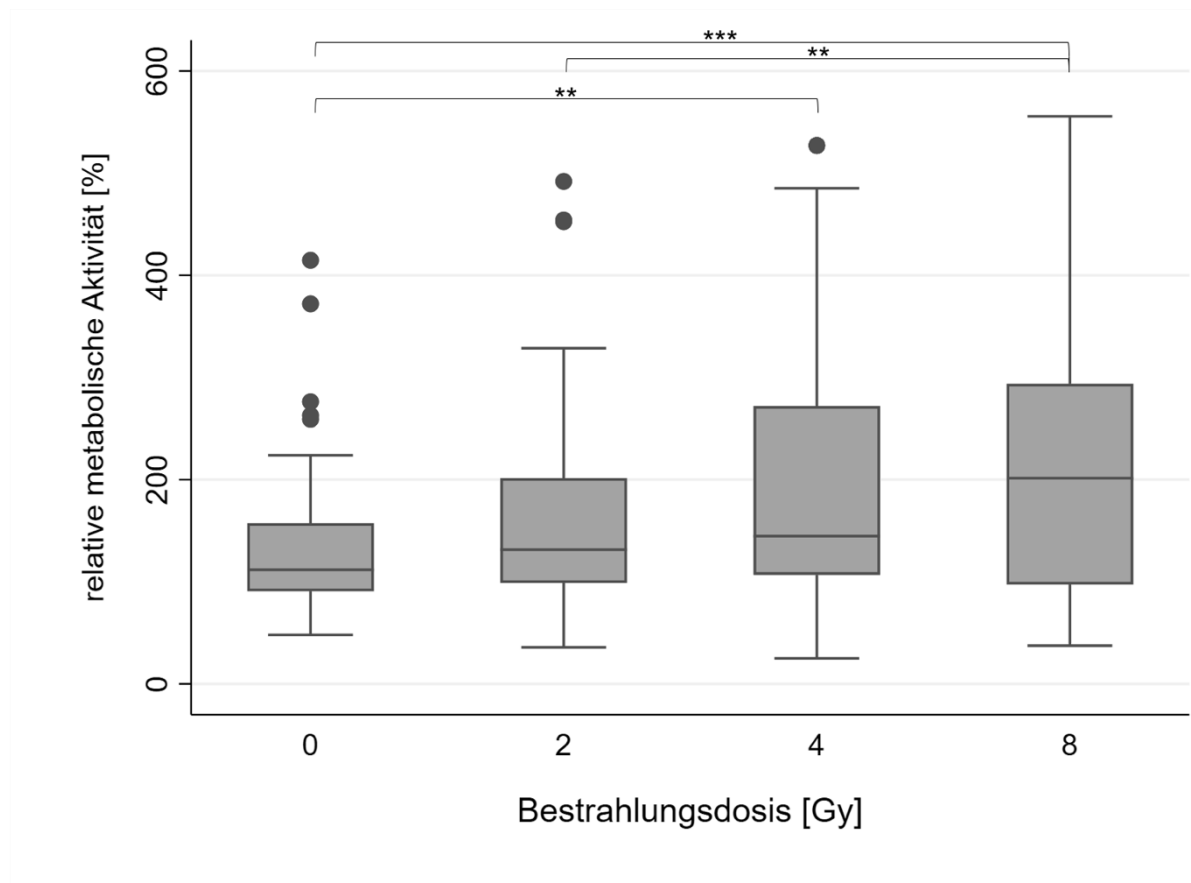


Abbildung 10 Metabolische Aktivität in Abhängigkeit von der Bestrahlung

Die metabolische Aktivität in Abhängigkeit von den Bestrahlungsdosen 0 Gray, 2 Gray, 4 Gray und 8 Gray. Die Punkte stellen Ausreißer dar. Die Signifikanzniveaus sind mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ gekennzeichnet. Rohwerte im Anhang (S. 90).

Abbildung 10 zeigt signifikante Unterschiede der metabolischen Aktivität in Abhängigkeit von der Bestrahlung zwischen der Kontrolle (0 Gray) und den Bestrahlungsdosen 4 Gray sowie 8 Gray nach Bonferroni-Testung. Auch bestand ein signifikanter Unterschied im Zellstoffwechsel zwischen den Bestrahlungsdosen 2 Gray und 8 Gray. Die metabolische Aktivität nahm mit steigender Bestrahlungsdosis zu.

4.1.3 Einfluss der ZnO-NP Konzentration auf den Zellstoffwechsel

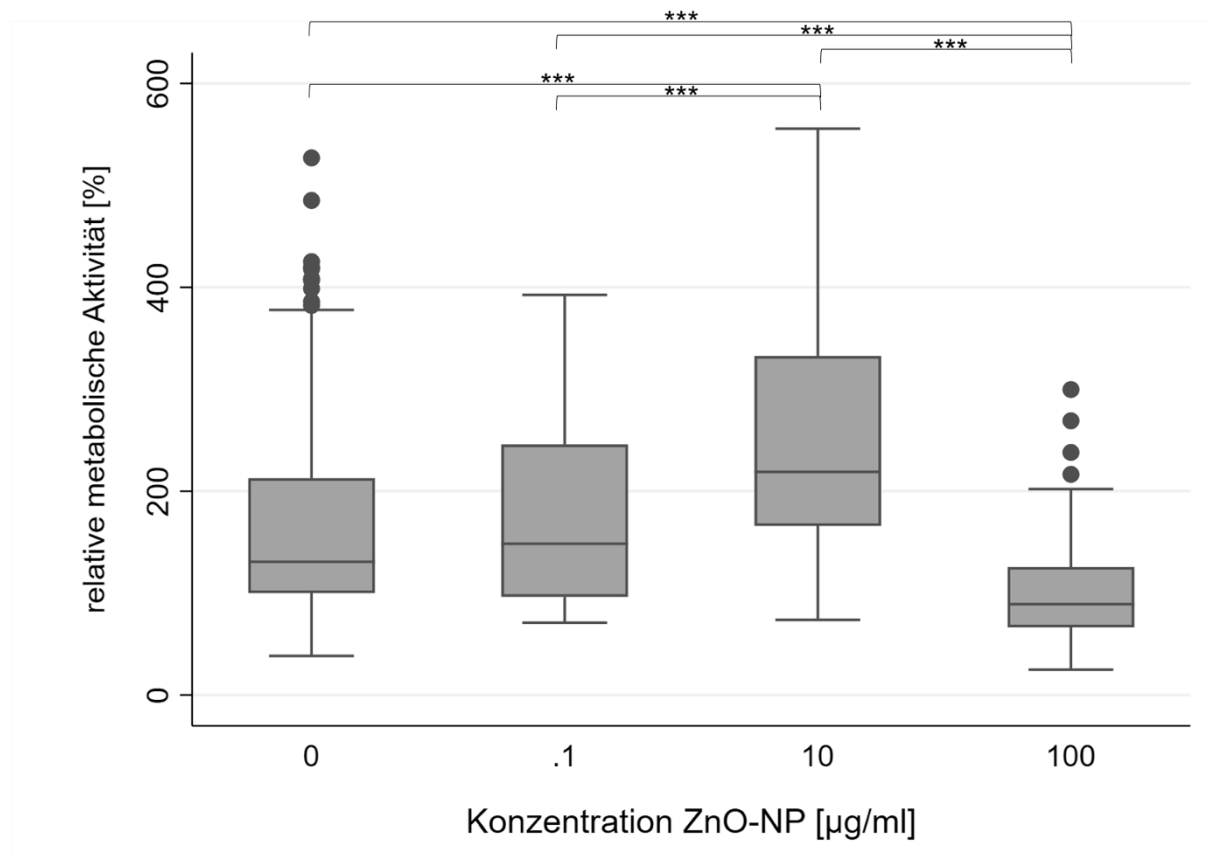
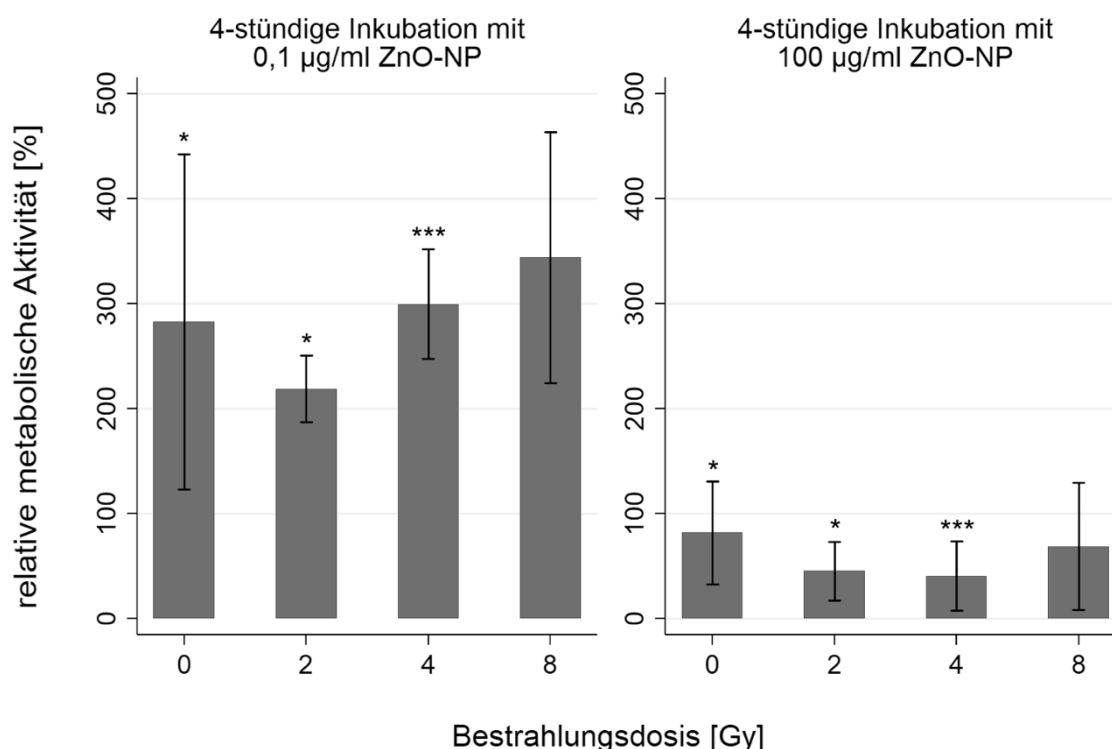


Abbildung 11 Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration

Die metabolische Aktivität in Abhängigkeit von der ZnO-NP Konzentration (keine ZnO-NP, 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml) ohne Berücksichtigung der Inkubationsdauer. Die Punkte stellen Ausreißer dar. Die Signifikanzniveaus sind mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ gekennzeichnet. Rohwerte im Anhang (S. 90).

Ein signifikanter Einfluss der ZnO-NP Konzentration auf die metabolische Aktivität konnte mit dem Kruskal-Wallis-Test ermittelt werden ($p < 0.001$). Die ZnO-NP Konzentration 0,1 µg/ml unterschied sich signifikant von den Konzentrationen 10 µg/ml und 100 µg/ml. Des Weiteren gab es signifikante Unterschiede der Konzentration 10 µg/ml zu 100 µg/ml und der unbehandelten Kontrolle. Auch die ZnO-NP Konzentration von 100 µg/ml unterschied sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle.

4.1.4 Vergleich von der ZnO-NP Konzentration und der Bestrahlungsdosis bei konstanter Inkubationszeit



Fehlerbalken: $\pm 1,96$ Std.-Dev.

Abbildung 12 Zellstoffwechsel bei 240-minütiger Inkubationszeit bei 0,1 µg/ml und 100 µg/ml

Zellstoffwechsel bei 240-minütiger Inkubation und den unterschiedlichen Bestrahlungsdosen im Vergleich zwischen der ZnO-NP Konzentration von 0,1 µg/ml und 100 µg/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Die Signifikanzniveaus sind mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ gekennzeichnet, verglichen werden die Werte der jeweils gleichen Bestrahlungsdosis der Konzentrationen 0,1 µg/ml und 100 µg/ml. Rohwerte im Anhang (S. 90).

In der Abbildung 12 ist eine generell erniedrigte metabolische Aktivität bei 240-minütiger ZnO-NP Inkubation bei der Konzentration von 100 µg/ml im Vergleich zu der Konzentration von 0,1 µg/ml zu erkennen. Die metabolische Aktivität unterschied sich zwischen den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 100 µg/ml bei den Bestrahlungsdosen 0 Gray ($p = 0,016$), 2 Gray ($p = 0,035$) und 4 Gray ($p = 0,001$) nach Bonferroni-Testung signifikant.

4.1.5 Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration und der Inkubationsdauer ohne Bestrahlung

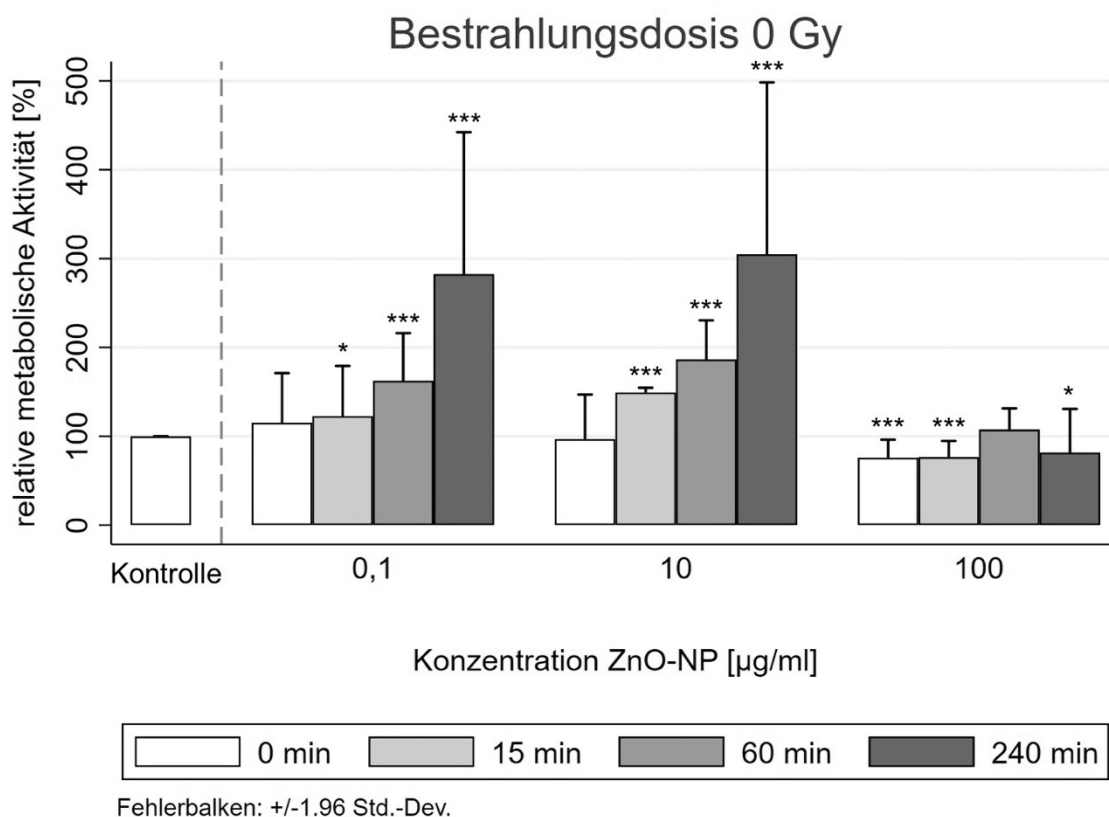


Abbildung 13 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel ohne Bestrahlung

Veränderungen des Zellstoffwechsels durch die ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml bei den Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten ohne nachfolgende Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Die Signifikanzniveaus der ANOVA-Testung im Vergleich zur Kontrolle (keine ZnO-NP, 0 Gray, 0 Minuten) sind mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ gekennzeichnet. Rohwerte im Anhang (S. 90).

In Abbildung 13 ist die metabolische Aktivität der A549-Zellen bei 0 Gray für die unterschiedlichen ZnO-NP Konzentrationen und Inkubationszeiten dargestellt. Die metabolische Aktivität stieg für die ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 10 µg/ml nach 4 Stunden an. Bei einer ZnO-NP Konzentration von 100 µg/ml war die metabolische Aktivität über alle Inkubationszeiten im Vergleich zu den ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 10 µg/ml erniedrigt.

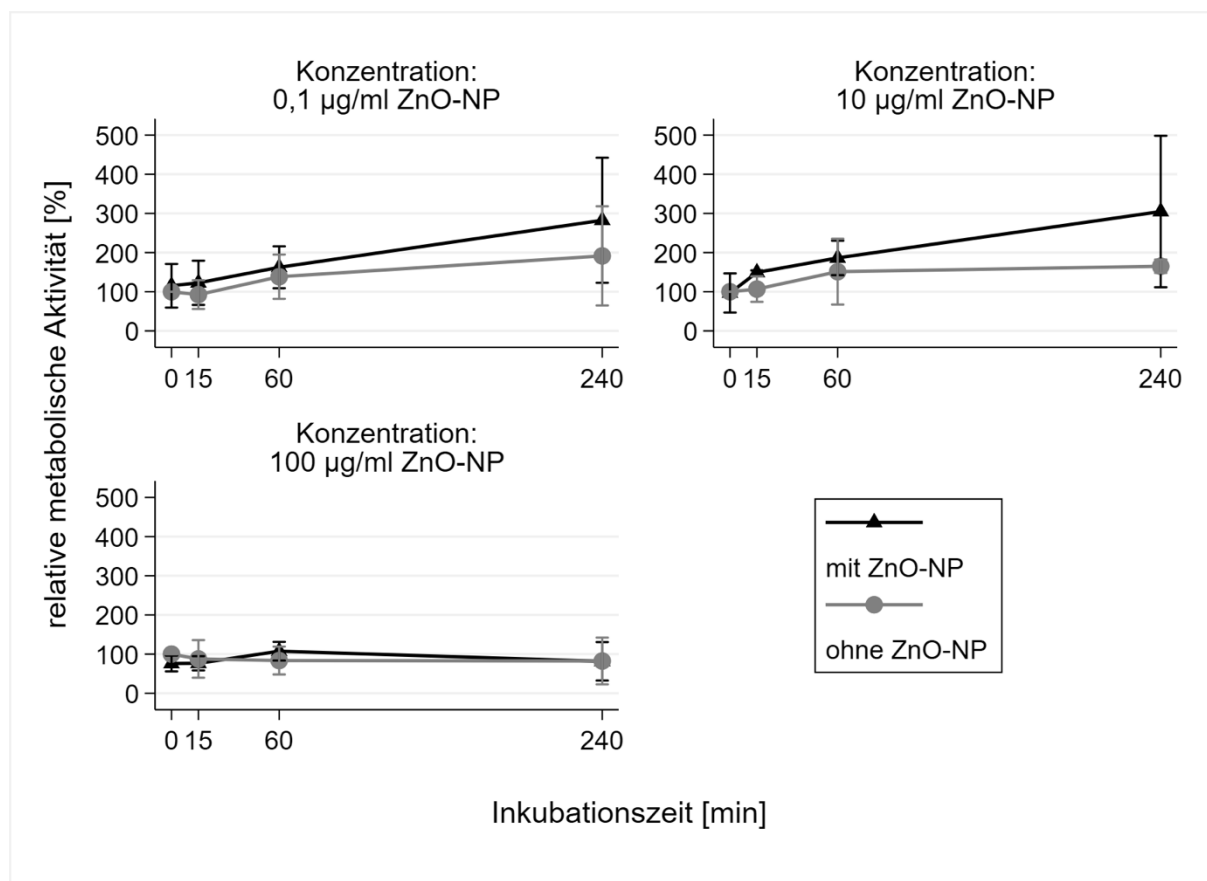


Abbildung 14 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel verglichen mit der Kontrolle ohne Bestrahlung

Zeitlicher Verlauf des Zellstoffwechsels der ZnO-NP Konzentrationen 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml für die Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten ohne nachfolgende Bestrahlung im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Rohwerte im Anhang (S. 90).

Der Vergleich der Kurven der ZnO-NP Konzentrationen zu den Kontrollen in Abbildung 14 zeigt einen Anstieg des Zellstoffwechsels für die Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 10 µg/ml mit steigender Inkubationszeit. Für die ZnO-NP Konzentration von 100 µg/ml stellt sich kein Unterschied zur Kontrolle dar.

4.1.6 Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration und der Inkubationsdauer mit 2 Gray Bestrahlung

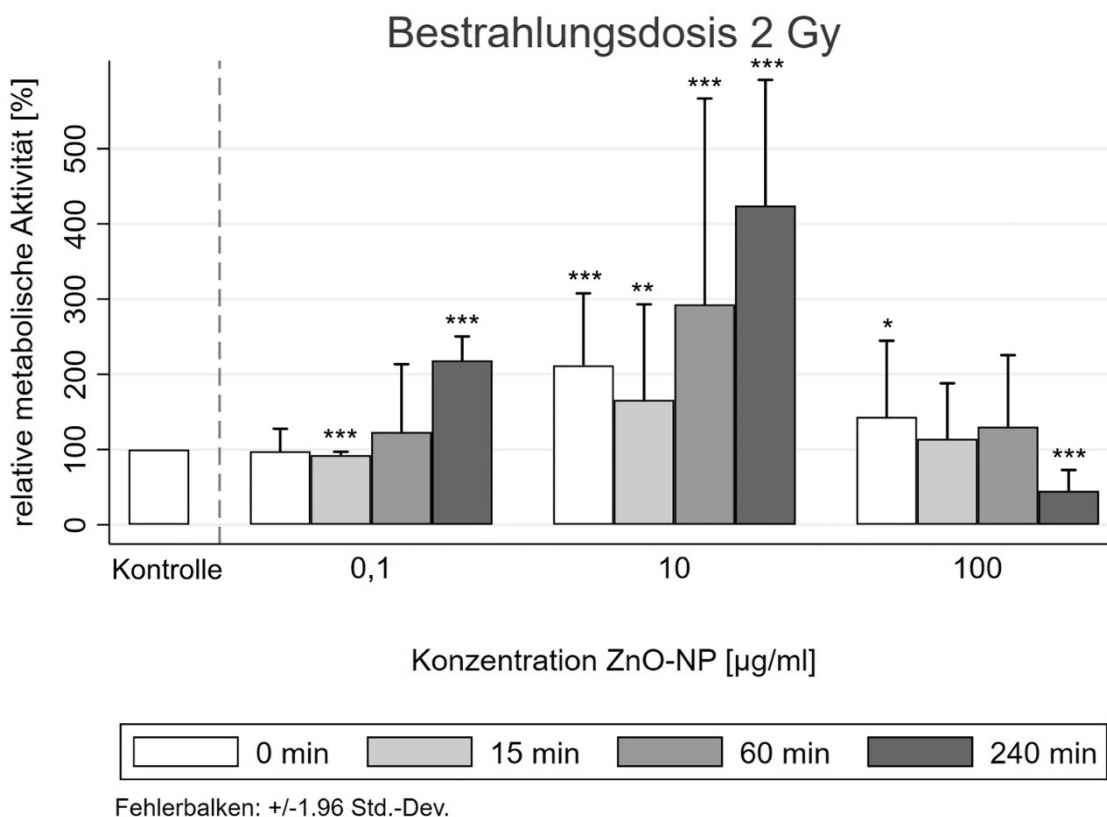


Abbildung 15 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel mit kombinierter Bestrahlung von 2 Gray

Veränderungen des Zellstoffwechsels durch die ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml bei den Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten mit nachfolgender Bestrahlung von 2 Gray. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Die Signifikanzniveaus der ANOVA-Testung im Vergleich zur Kontrolle (keine ZnO-NP, 0 Gray, 0 Minuten) sind mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ gekennzeichnet. Rohwerte im Anhang (S. 90).

Bei Kombination der ZnO-NP Inkubation mit einer Bestrahlung von 2 Gray erkennt man in Abbildung 15 für die ZnO-NP Konzentrationen 0,1 µg/ml und 10 µg/ml eine Steigerung der metabolischen Aktivität über die Inkubationszeit. Wurden 100 µg/ml ZnO-NP für 240 Minuten inkubiert, sank der Stoffwechsel im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle signifikant.

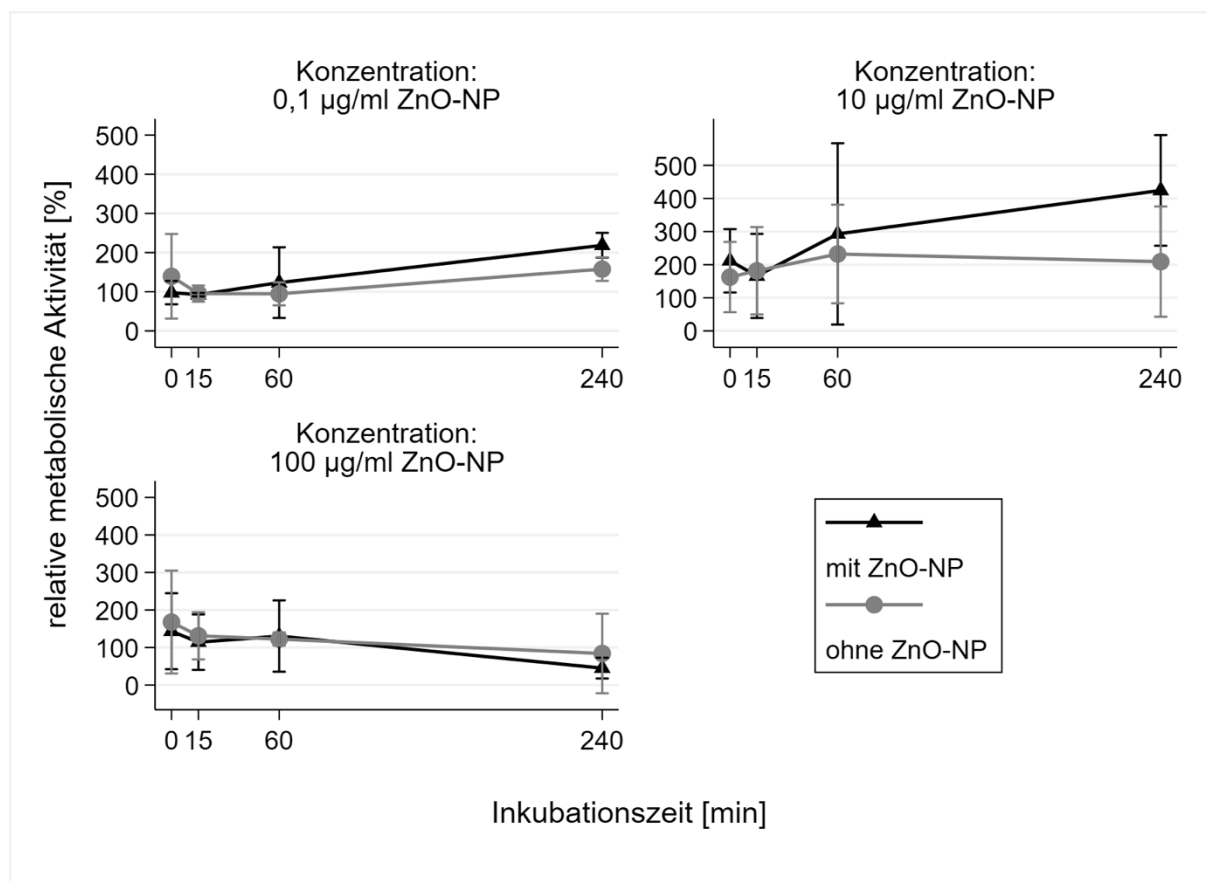


Abbildung 16 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel verglichen mit der Kontrolle bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gray

Zeitlicher Verlauf des Zellstoffwechsels der ZnO-NP Konzentrationen 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml für die Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten mit nachfolgender Bestrahlung von 2 Gray im Vergleich mit einer Kontrolle ohne ZnO-NP Inkubation, die ausschließlich die Bestrahlung erhielt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Rohwerte im Anhang (S. 90).

Auch die Liniendiagramme in Abbildung 16 zeigen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle für die ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 10 µg/ml einen Anstieg des Zellstoffwechsels bis zu einer Inkubationszeit von 240 Minuten. Das Liniendiagramm der ZnO-NP Konzentration 100 µg/ml stellt keinen signifikanten Unterschied zum Kurvenverlauf ohne NP dar.

4.1.7 Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration und der Inkubationsdauer mit 4 Gray Bestrahlung

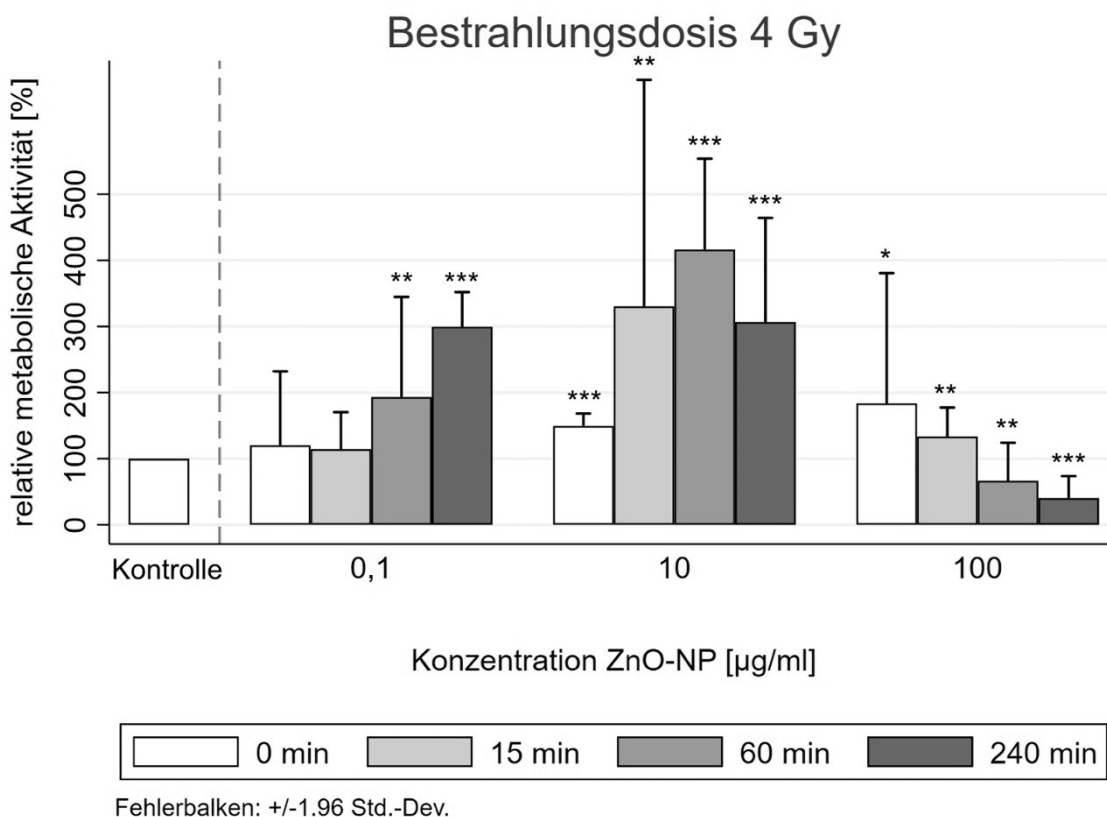


Abbildung 17 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel mit kombinierter Bestrahlung von 4 Gray

Veränderungen des Zellstoffwechsels durch die ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml ZnO-NP bei den Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten mit nachfolgender Bestrahlung von 4 Gray. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Die Signifikanzniveaus der ANOVA-Testung im Vergleich zur Kontrolle (keine ZnO-NP, 0 Gray, 0 Minuten) sind mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ gekennzeichnet. Rohwerte im Anhang (S. 90).

Bei einer Bestrahlungsdosis von 4 Gray zeigte sich für eine ZnO-NP Konzentration von 0,1 µg/ml eine Steigerung des Stoffwechsels mit der Inkubationszeit. Nach der Inkubation mit 10 µg/ml ZnO-NP sank die metabolische Aktivität nach 240 Minuten, nach vorangegangen Anstieg, ab. Die ZnO-NP Konzentration von 100 µg/ml zeigte mit steigender Inkubationsdauer eine Abnahme der metabolischen Aktivität.

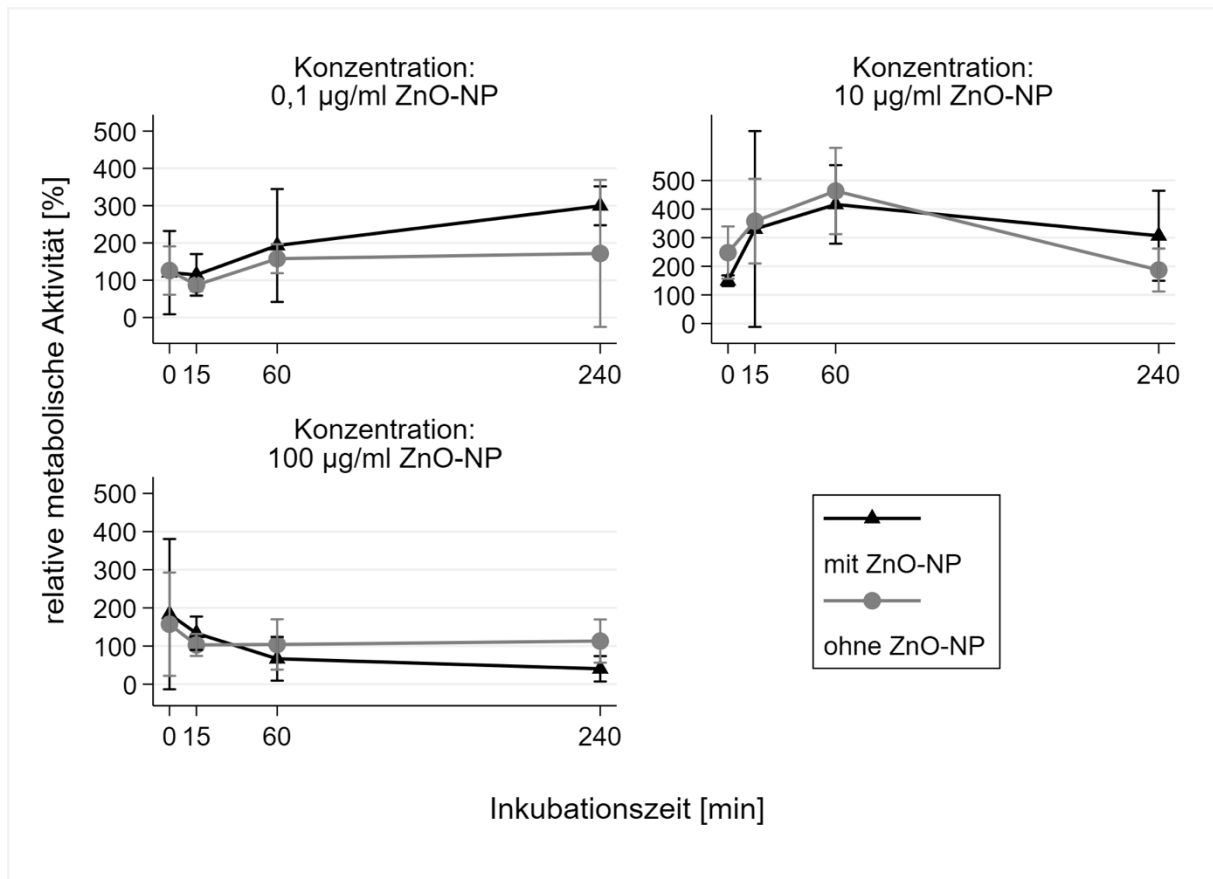


Abbildung 18 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel verglichen mit der Kontrolle bei kombinierter Bestrahlungsdosis von 4 Gray

Zeitlicher Verlauf des Zellstoffwechsels der ZnO-NP Konzentrationen 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml für die Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten mit nachfolgender Bestrahlung von 4 Gray im Vergleich mit einer Kontrolle ohne ZnO-NP Inkubation, die ausschließlich die Bestrahlung erhielt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Rohwerte im Anhang (S. 90).

Auch in Abbildung 18 wird dargestellt, dass der Zellstoffwechsel bei einer Bestrahlungsdosis von 4 Gray für die ZnO-NP Konzentration von 0,1 µg/ml im Vergleich zu der Kontrolle ohne ZnO-NP nach 240 Minuten anstieg. Nach vorangegangener Steigerung der metabolischen Aktivität nach ZnO-NP Inkubation von 10 µg/ml nahm der Zellstoffwechsel nach 240 Minuten ab. Für die ZnO-NP Konzentration von 100 µg/ml wurde ein Abfall der metabolischen Aktivität über die gesamte Inkubationszeit deutlich.

4.1.8 Abhängigkeit des Zellstoffwechsels von der ZnO-NP Konzentration und der Inkubationsdauer mit 8 Gray Bestrahlung

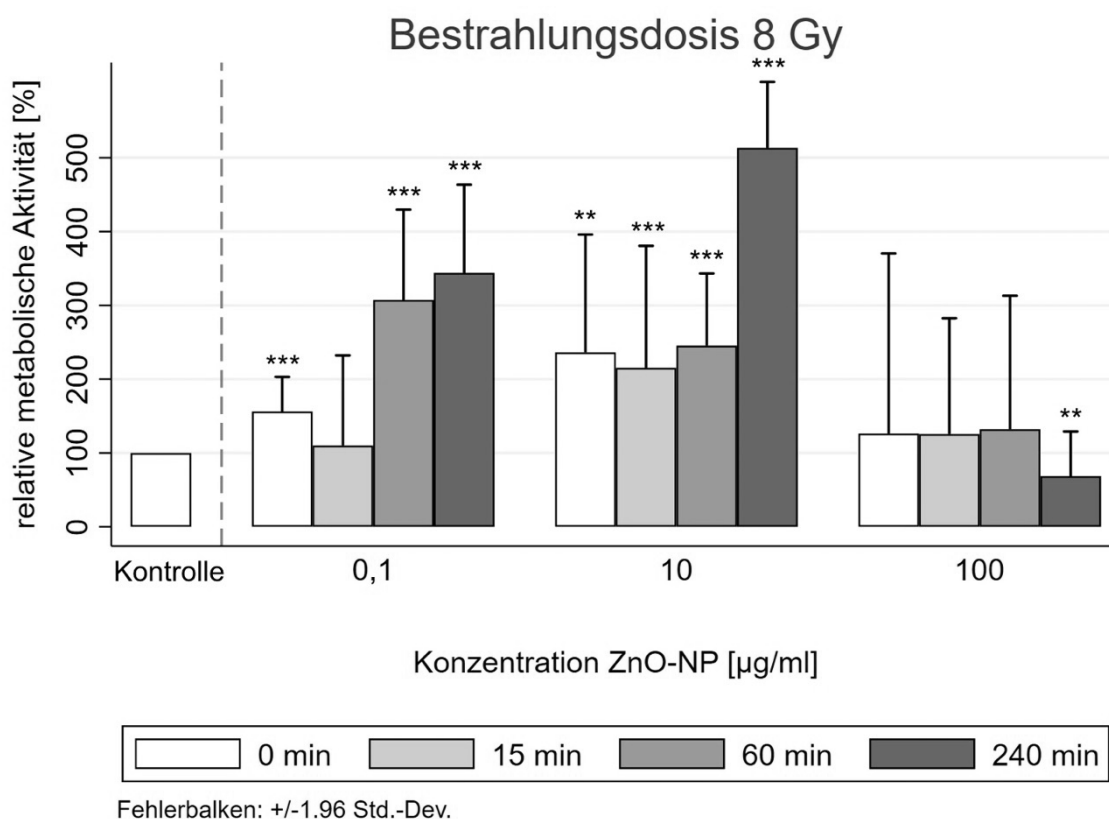


Abbildung 19 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel mit kombinierter Bestrahlung von 8 Gray

Veränderungen des Zellstoffwechsels durch die ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml ZnO-NP bei den Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten mit nachfolgender Bestrahlung von 8 Gray. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Die Signifikanzniveaus der ANOVA-Testung im Vergleich zur Kontrolle (keine ZnO-NP, 0 Gray, 0 Minuten) sind mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ gekennzeichnet. Rohwerte im Anhang (S. 90).

Abbildung 19 zeigt einen Anstieg der metabolischen Aktivität mit steigender Inkubationsdauer für die ZnO-NP Konzentrationen 0,1 µg/ml und 10 µg/ml.

Der Zellstoffwechsel der ZnO-NP Konzentration 100 µg/ml unterschied sich nicht zwischen den Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten und 60 Minuten. Nach 240 Minuten sank die metabolische Aktivität.

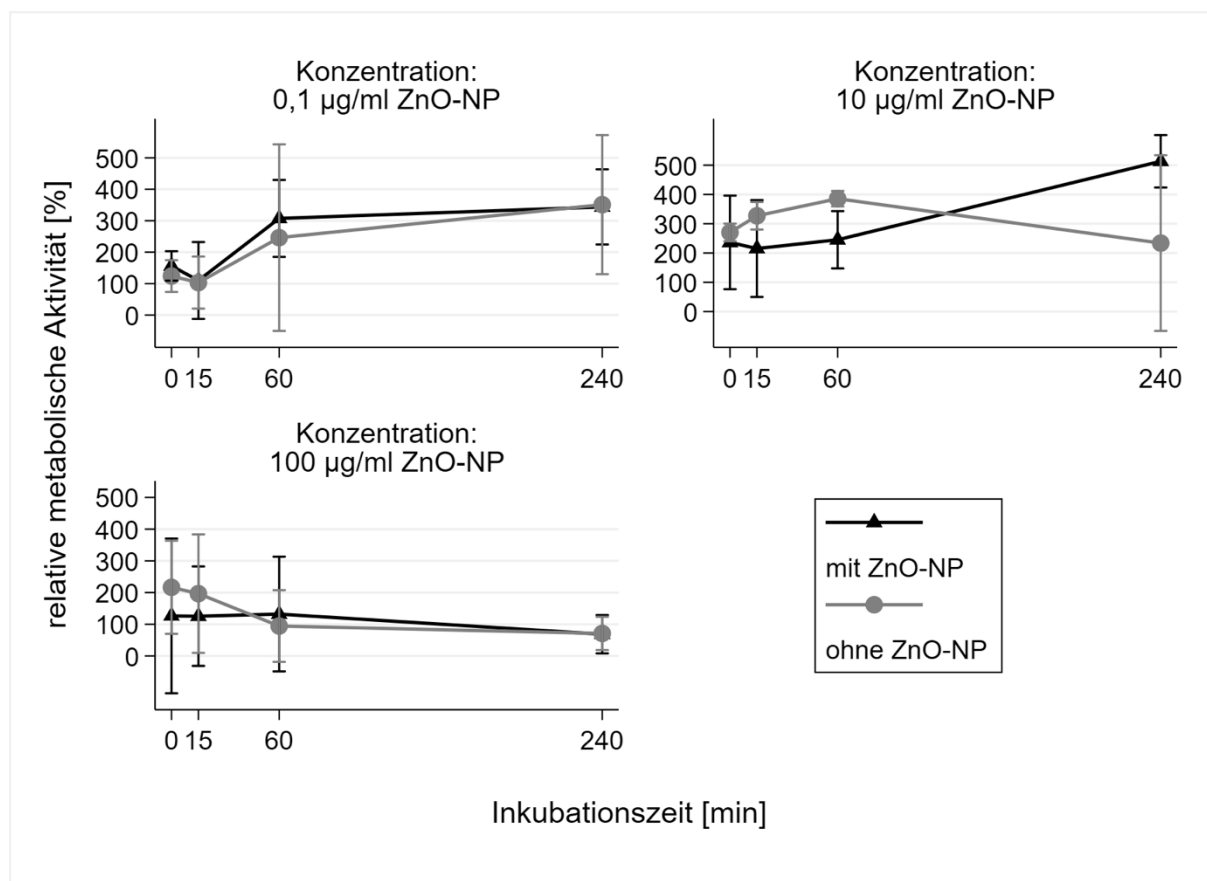


Abbildung 20 Einfluss der ZnO-NP Konzentration und Inkubationsdauer auf den Zellstoffwechsel verglichen mit der Kontrolle bei einer kombinierten Bestrahlungsdosis von 8 Gray

Zeitlicher Verlauf des Zellstoffwechsels der ZnO-NP Konzentrationen 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml für die Inkubationszeiten 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten mit nachfolgender Bestrahlung von 8 Gray im Vergleich mit einer Kontrolle ohne ZnO-NP Inkubation, die ausschließlich die Bestrahlung erhielt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- die Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsdurchläufe (N=3). Rohwerte im Anhang (S. 90).

Abbildung 20 zeigt keinen Unterschied der metabolischen Aktivität der ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 100 µg/ml im Vergleich zu der Kontrolle ohne ZnO-NP Inkubation. Die ZnO-NP Konzentration 10 µg/ml zeigte nach 240 Minuten einen Anstieg der metabolischen Aktivität, wohingegen der Zellstoffwechsel der Kontrolle sank.

4.2 CAM-Modell

Das CAM-Modell gilt als ein beliebtes Xenograft-Modell, das in der Darstellung von Tumorangiogenese sowie –metastasierung etabliert ist. Es stellt einen Zwischenschritt zwischen der *in vitro*-Zellkultur zu *in vivo*-Tierversuchen dar und gilt als ein einfaches *in vivo* bzw. *in ovo* 3D-Modell.

Es sind in der Arbeitsgruppe zukünftige Versuche geplant, bei denen die Tumore der CAM nach vorheriger NP-Applikation radioaktiv bestrahlt werden. Um dies zu ermöglichen, sollten im Rahmen dieser Promotionsarbeit Tumorzellen auf die CAM angesiedelt werden und eine mögliche Angiogenese betrachtet werden.

Die Auswertung der CAM erfolgte nach Paraffineinbettung und histologischer Färbung ausschließlich lichtmikroskopisch. Zunächst wurde mit Hilfe der HE-Färbung⁵ das Vorhandensein atypischer Zellen auf der CAM überprüft sowie deren Morphologie beurteilt (136). Für die weitere Validierung der Tiefeninfiltration und Ausdehnung der Tumore fand eine immunhistochemische Gesamt-Zytokeratinfärbung statt. Zur Evaluation der Angiogenese wurde der Von-Willebrand-Faktor immunhistochemisch angefärbt. Die Infiltration und induzierte Angiogenese gestalteten sich sehr heterogen.

⁵ Bilder der HE-Färbung wurden freundlicher Weise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt (136).

4.2.1 Invasion der Tumorzellen und Angiogenese in der CAM

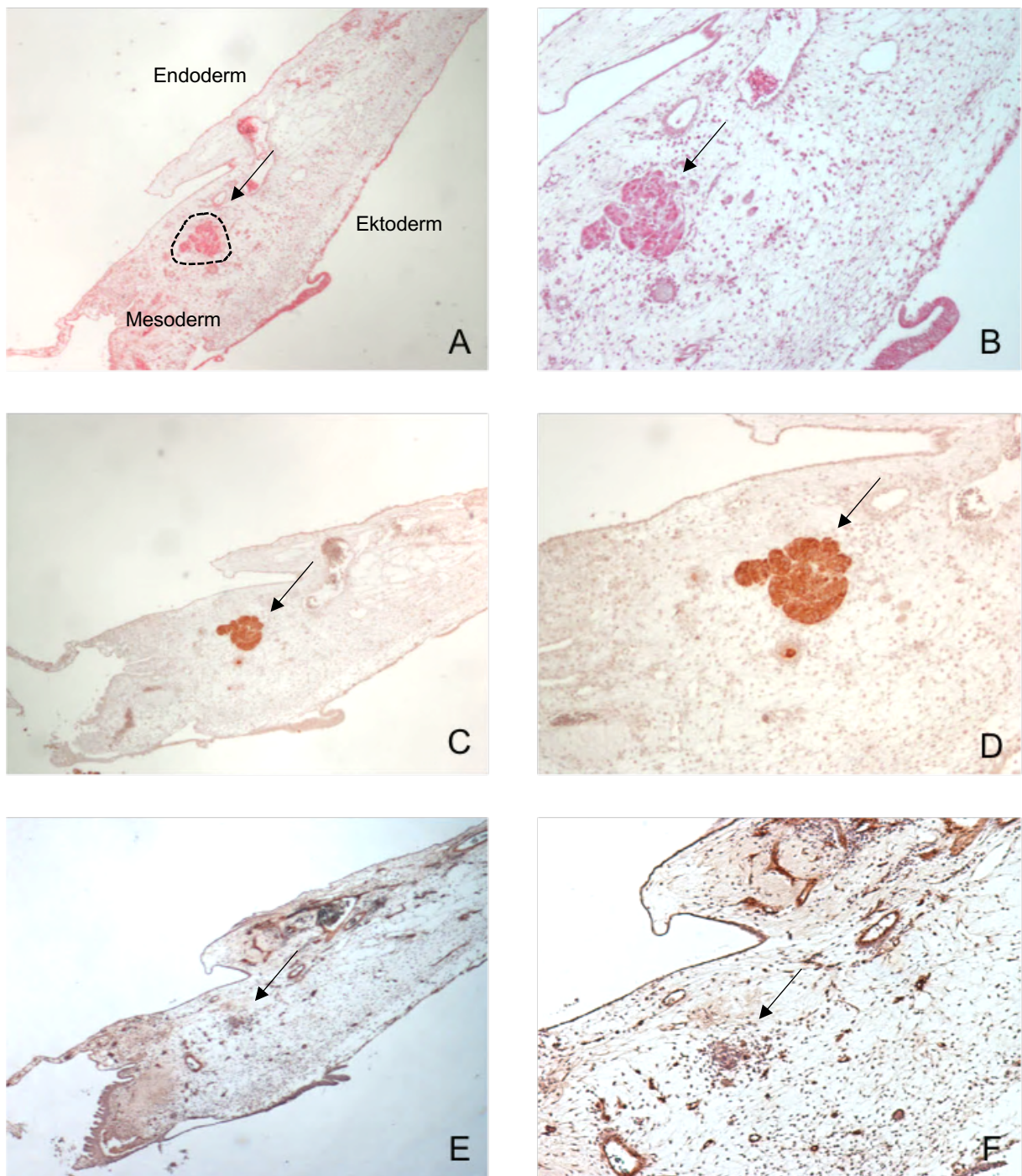


Abbildung 21 Histologische Bilder der CAM mit erfolgreicher Tumorinvasion und peritumoraler Angiogenese

Lichtmikroskopische Bilder der CAM nach Tumoransiedlung. Tumore durch Pfeile gekennzeichnet. A: HE-Färbung 40-fache Vergrößerung⁵, B: HE-Färbung 100-fache Vergrößerung⁵, C: Gesamt-Zytokeratinfärbung 40-fache Vergrößerung, D: Gesamt-Zytokeratinfärbung 100-fache Vergrößerung, E: Von-Willebrand-Faktor-Färbung 40-fache Vergrößerung, F: Von-Willebrand-Faktor-Färbung 100-fache Vergrößerung.

Abbildung 21 zeigt einen invasiven, in die CAM wachsenden Tumor nach 24-stündiger Inkubation. Die Tumorzellen wachsen solide in der mesodermalen Schicht der CAM. Der epitheliale Ursprung konnte durch die Zytokeratinfärbung bestätigt werden. Peritumorale kleinlumige Gefäße mit Expression des Von-Willebrand-Faktors konnten nachgewiesen werden.

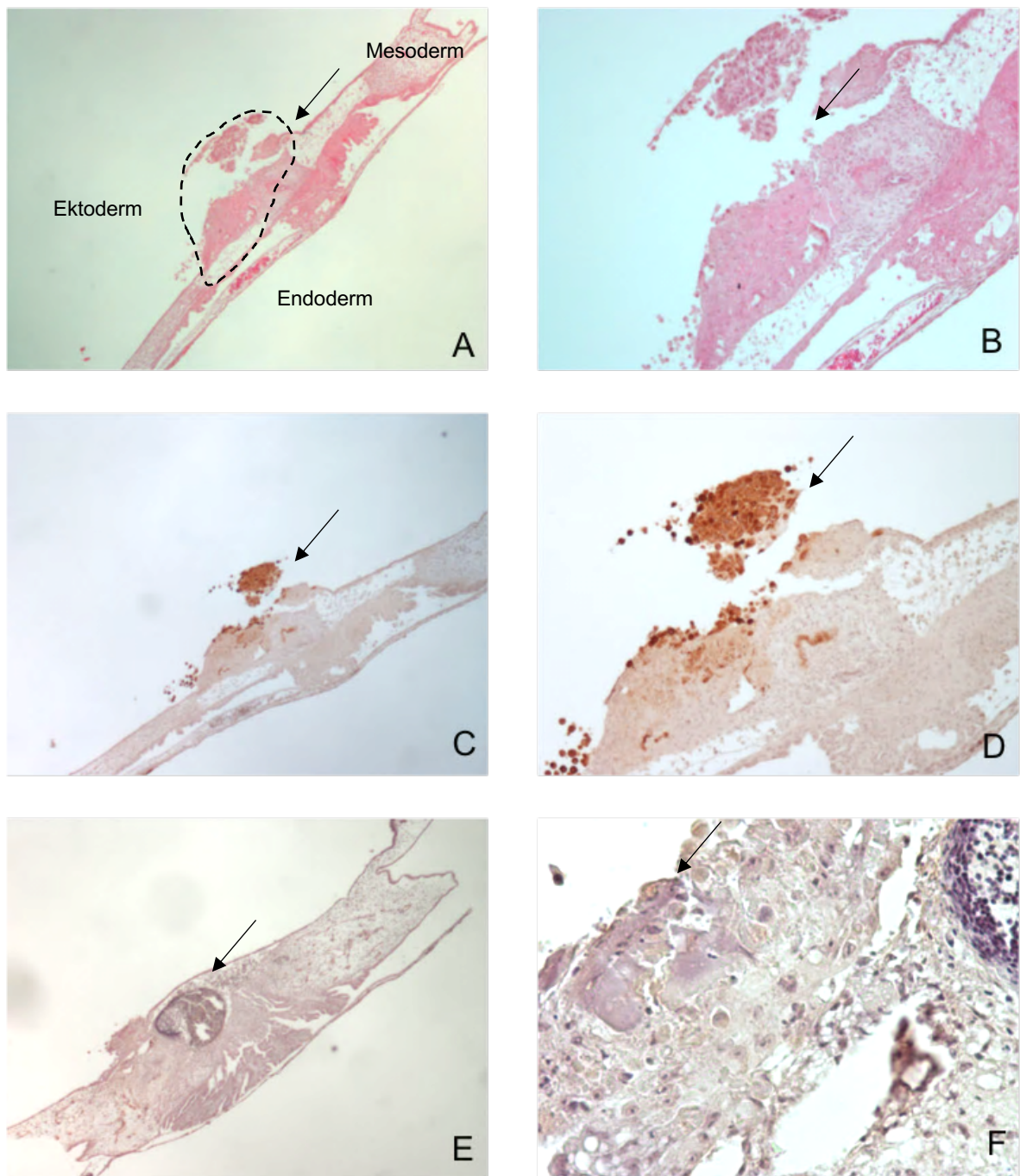


Abbildung 22 Histologische Bilder der CAM mit Tumorinvasion

Lichtmikroskopische Bilder der CAM nach Tumoransiedlung. Tumore durch Pfeile gekennzeichnet. A: HE-Färbung 40-fache Vergrößerung⁵, B: HE-Färbung 100-fache Vergrößerung⁵, C: Gesamt-Zytokeratinfärbung 40-fache Vergrößerung, D: Gesamt-Zytokeratinfärbung 100-fache Vergrößerung, E: Von-Willebrand-Faktor-Färbung 40-fache Vergrößerung, F: Von-Willebrand-Faktor-Färbung 100-fache Vergrößerung.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit der Tumorzellen sieht man in Abbildung 22 Zellvereinzelnungen in das Stroma der CAM hinein, welche insbesondere in der

Ergebnisse

Zytokeratinfärbung sichtbar werden. Es konnte keine tumorinduzierte Angiogenese nachgewiesen werden.

4.2.2 Keine Invasion der Tumorzellen in die CAM und keine tumorinduzierte Angiogenese

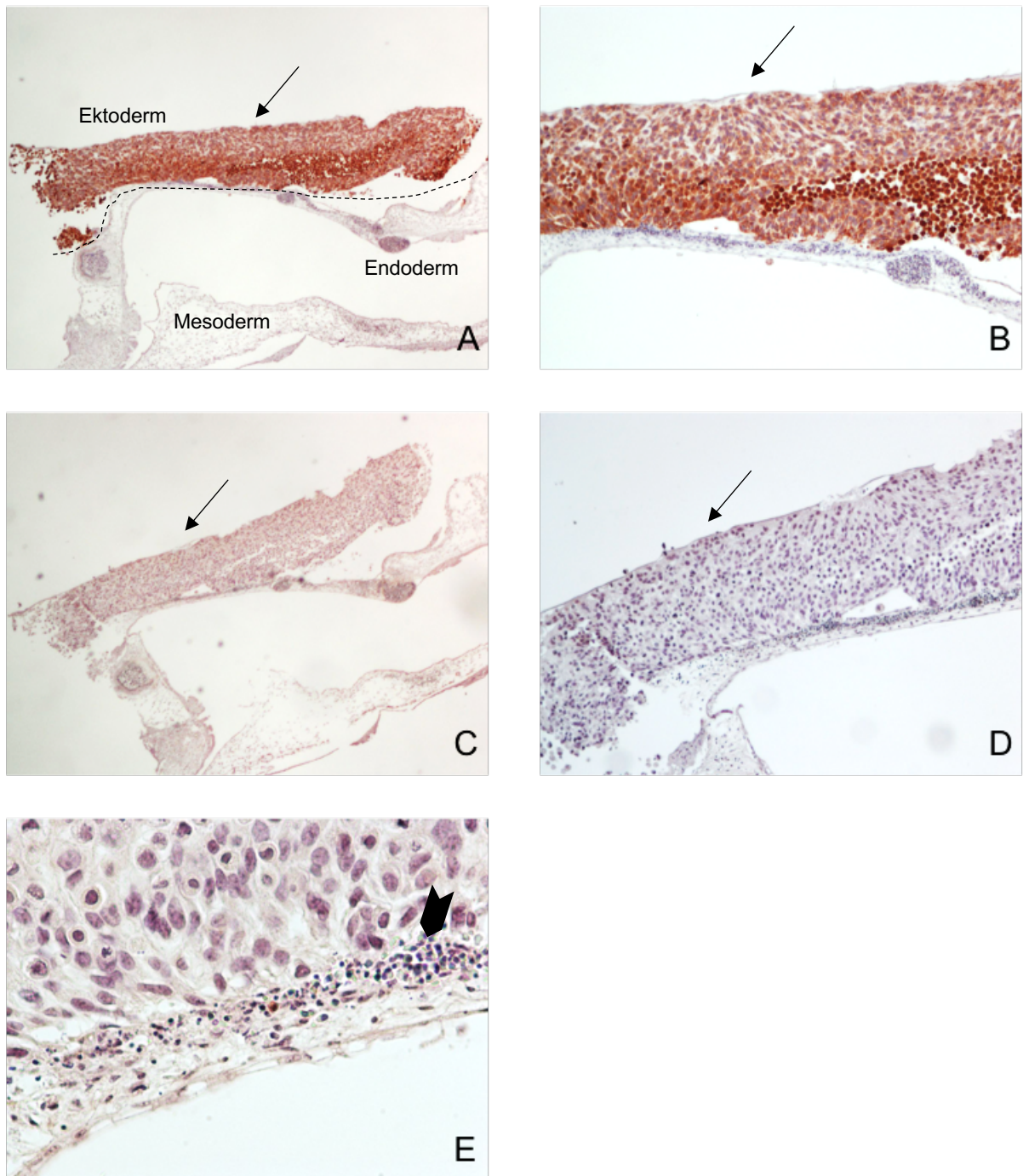


Abbildung 23 Histologische Bilder der CAM ohne Tumorinvasion und ohne Angiogenese, sub tumorale Lymphozyten

Lichtmikroskopische Bilder der CAM nach Tumoransiedlung. Pfeile kennzeichnen den Tumor, die Pfeilspitze die Lymphozyten. A: Gesamt-Zytokeratinfärbung 40-fache Vergrößerung, B: Gesamt-Zytokeratinfärbung 100-fache Vergrößerung, C: Von-Willebrand-Faktor-Färbung 40-fache Vergrößerung, D: Von-Willebrand-Faktor-Färbung 100-fache Vergrößerung, E: Von-Willebrand-Faktor-Färbung 400-fache Vergrößerung.

Abbildung 23 zeigt solide wachsende, epitheliale Tumorzellen ohne Infiltration in die CAM. Die immunhistochemische Färbung des Von-Willebrand-Faktors ist negativ. Unterhalb des Tumors zeigen sich zahlreiche Lymphozyten.

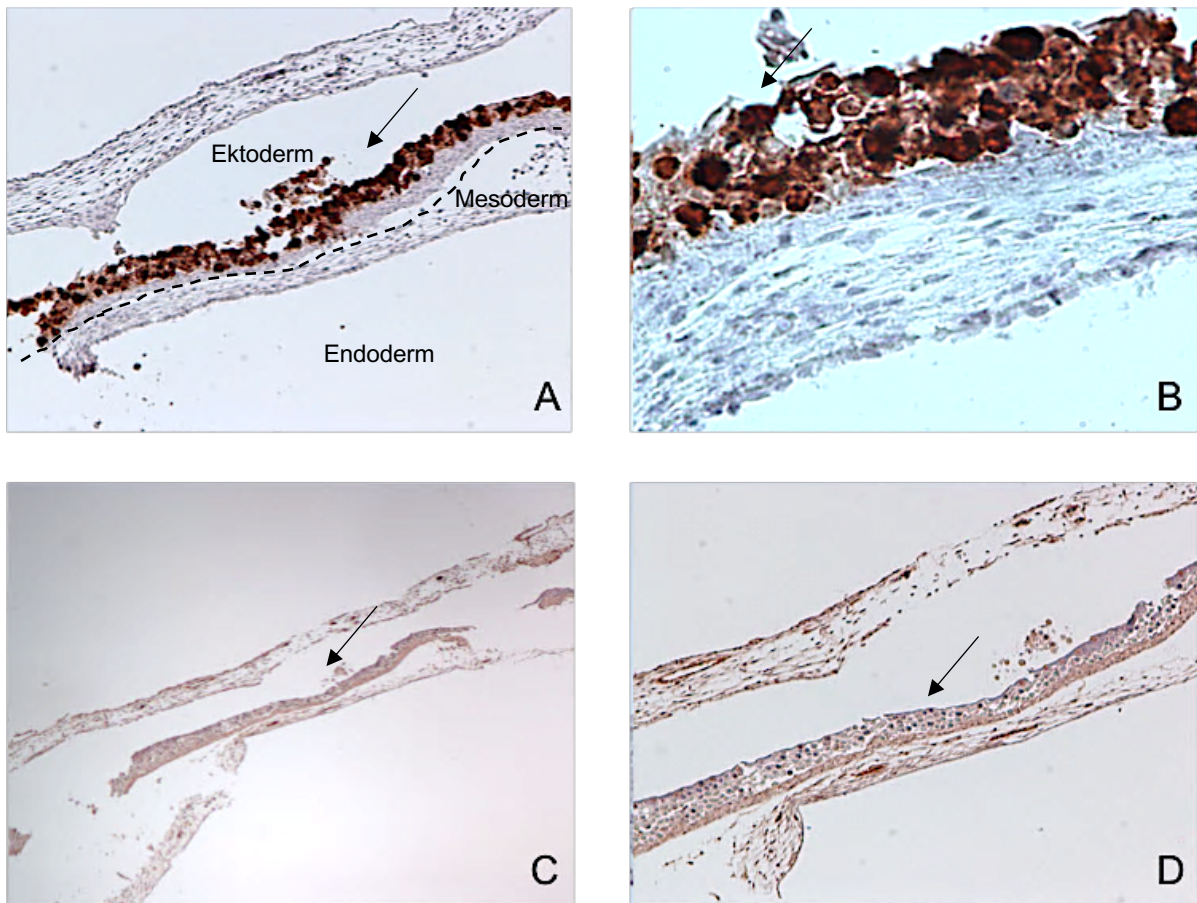


Abbildung 24 Histologische Bilder der CAM ohne Tumorinvasion und ohne Angiogenese

Lichtmikroskopische Bilder der CAM nach Tumoransiedlung. Die Pfeile kennzeichnen den Tumor, die Pfeilspitze die Lymphozyten. A: Gesamt-Zytokeratinfärbung 100-fache Vergrößerung, B: Gesamt-Zytokeratinfärbung 400-fache Vergrößerung, C: Von-Willebrand-Faktor-Färbung 40-fache Vergrößerung, D: Von-Willebrand-Faktor-Färbung 100-fache Vergrößerung.

In Abbildung 24 kann man solide Formationen der Karzinomzellen erkennen. Die Tumorzellen wachsen nicht invasiv und es konnten auch keine Gefäße durch die Von-Willebrand-Faktor-Färbung nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Toxizität von ZnO-NP

NP gelten als ein vielversprechendes Material, das auch in der Medizin erforscht wird. Sie sollen unter anderem gezielt in der Tumorbehandlung eingesetzt werden, um die toxische Wirkung auf Tumore zu verstärken und die Nebeneffekte auf das gesunde Gewebe zu verringern. Im Rahmen dieser Promotion wurden hierfür *in vitro*-Veränderungen von A549-Zellen nach ZnO-NP Exposition untersucht.

5.1.1 Toxizität von ZnO-NP

Nach der Inkubation über einen längeren Zeitraum (240 Minuten) konnten ZnO-NP in hohen Konzentrationen von 100 µg/ml eine signifikante Abnahme der Zellvitalität *in vitro* bewirken. Kürzere Inkubationszeiten und geringere ZnO-NP Konzentrationen führten zu keiner signifikanten Verminderung der Zellvitalität. Die toxische Wirkung auf A549-Zellen und Lungenepithelzellen konnte auch durch andere Arbeitsgruppen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. So konnten nach intratrachealen Instillationen von Zn-Lösungen Entzündungsreaktionen sowie Nekrosen in Mäusen hervorgerufen werden (137). Zudem konnte sowohl bei akuter als auch bei subakuter Exposition eine dosisabhängige pulmonale Toxizität bei Mäusen nach ZnO-NP Exposition gezeigt werden (27). Andere Arbeitsgruppen konnten *in vivo* nur eine geringfügige Zytotoxizität und Inflammation durch Exposition mit ZnO-NP nachweisen (138, 139).

Die Toxizität der ZnO-NP auf A549-Zellen scheint auch von der Art der Kultivierung abhängig zu sein. Eine ZnO-NP Exposition von A549-Zellen, die auf Zellkulturplatten epitheliale Verbände ausbildeten, schien eine geringere Toxizität hervorzurufen als eine vergleichbare Exposition gegenüber A549-Zellen auf 96-Wellplatten (140). Zudem wiesen die epithelialen Verbände keine erhöhte Membranpermeabilität gegenüber ZnO-NP auf (140). Im Hinblick darauf sollte eine Toxizität der ZnO-NP auf die hier verwendeten Einzelzellen nicht überschätzt werden. Mehrere Arbeitsgruppen konnten eine Korrelation zwischen intrazellulärer Löslichkeit und Zytotoxizität von ZnO-NP in Lungenepithelzellen zeigen (140, 141). Insbesondere Zn^{2+} Ionen scheinen eine zytotoxische Wirkung zu haben (141). Deswegen sollte bei der Beurteilung der

Zytotoxizität der ZnO-NP auch immer die Partikelgröße und das Zeta-Potential Berücksichtigung finden.

5.1.2 Toxizität von ZnO-NP auf A549-Zellen durch Beeinflussung der metabolischen Aktivität

Es wurde der Einfluss auf die metabolische Aktivität der A549-Zellen durch ZnO-NP in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml bei den Inkubationszeiten von 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 240 Minuten untersucht. Es erfolgte keine oder eine parallele Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray, 4 Gray oder 8 Gray. Die ZnO-NP Konzentrationen 0,1 µg/ml und 10 µg/ml zeigten eine Steigerung des Zellstoffwechsels mit steigenden Inkubationszeiten. Eine mögliche Zunahme von Reparaturmechanismen bei entstandenen Schäden durch die ZnO-NP könnte hierfür eine mögliche Erklärung sein. Hingegen zeigte die ZnO-NP Konzentration 100 µg/ml ohne und mit Bestrahlung von 2 Gray, 4 Gray und 8 Gray nach 240 Minuten Inkubationszeit eine Abnahme der metabolischen Aktivität als mögliches Korrelat einer starken Zellschädigung und eingetretenen Zelluntergängen. Dies kann durch die geringere Vitalzellzahl mit steigender Inkubationsdauer gestützt werden. Jedoch nahm mit steigender Bestrahlungsdosis der Effekt der ZnO-NP Konzentration und Inkubationszeit ab. Die Zellschäden durch die Bestrahlung schienen so ausgeprägt zu sein, dass die ZnO-NP Inkubation nur noch eine untergeordnete Rolle spielte.

Innerhalb der Arbeitsgruppe konnten bereits von Judith Hill an der Monolayerkultur für die ZnO-NP Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 10 µg/ml keine oder nur geringe Veränderungen der Zelldichte aufgezeigt werden, sodass die durch ZnO-NP hervorgerufenen Zellschäden repariert worden sein könnten (136). Auch in der Monolayerkultur zeigte sich bei der ZnO-NP Konzentration von 100 µg/ml und hohen Bestrahlungsdosen eine Verringerung der Zellzahl und Einzelzellnekrosen (136), was die These der Zelluntergänge bei ZnO-NP Konzentration von 100 µg/ml bekräftigt. Zudem konnte innerhalb der Arbeitsgruppe bereits eine Kumulation von Zellschäden mit resultierender Apoptose 48 Stunden nach ZnO-NP Exposition nachgewiesen werden (142). Anhand des Kolonie-Assays wurde von Judith Hill schon eine geringere Proliferation von A549-Zellen nach ZnO-NP Inkubation gezeigt (136). Der Effekt von Bestrahlung und kombinierter ZnO-NP Inkubation auf die *surviving-fraction* war jedoch

auch hier geringer als beide Behandlungseffekte für sich allein genommen (136). Auch bei anderen Arbeitsgruppen verringerte sich die Kolonie-Größe 24 Stunden nach der ZnO-NP Exposition (143) bis hin zu einer kompletten Inhibition der Koloniebildung (126). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass alleinige Bestrahlung die *surviving-fraction* von A549-Zellen verringert (144).

Auch andere Arbeitsgruppen konnten bereits eine Verminderung der Zellviabilität von A549-Zellen nach ZnO-NP Exposition feststellen (145). Ickrath et al. konnten an mesenchymalen Stammzellen nach 24-stündiger Inkubation von 10 µg/ml und 50 µg/ml ZnO-NP eine signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität zeigen (119). Auch für Hamster-Lungenzellen (V-79) konnte eine zytotoxische Wirkung von ZnO-NP gezeigt werden (71). Liu et al. zeigten für SHSY5Y-Zellen eine Abnahme der Viabilität um mehr als 50 % nach Exposition gegenüber ZnO-NP Konzentrationen von 40-100 µg/ml für 24 Stunden (146). Die Kombination von ZnO-NP und Bestrahlung führte auch bei anderen Arbeitsgruppen zu Zelluntergängen (147). Zudem konnte eine stärkere Toxizität der ZnO-NP in Kombination mit ionisierenden Lichtquellen von Xiong et al. beobachtet werden (148). Dies zeigten auch Yang et al. bei A549-Zellen (149).

5.2 Mögliche Schädigungsmechanismen von ZnO-NP

Zunächst müssen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ZnO-NP näher betrachtet werden. Es handelte sich um runde ZnO-NP mit einer Größe von 15-18 nm. Das Zeta-Potential dieser NP betrug +40 mV. Hohen Zeta-Potentialen von mehr als 30 mV werden starke Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen NP zugeschrieben, sodass die Dispersionen als stabil gelten können und keine Agglomeratbildung aufweisen. Jedoch konnten bei den im Rahmen dieser Arbeit benutzten NP trotz des relativ hohen Zeta-Potentials Agglomerate nach einiger Zeit beobachtet werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass chemisch stabile NP keine relevante Zytotoxizität haben, wohingegen metallische NP mit hohem Redoxpotential und guter Löslichkeit, wie die verwendeten ZnO-NP, zyto- und genotoxische Effekte haben (150).

Des Weiteren können kationische NP die negativ geladenen Zellmembranen besser durchdringen als anders geladene NP (101). Tumorzellen scheinen eine negative Oberflächenladung zu haben, im Gegensatz zu nicht neoplastischen Zellen (151). Dies kann zu einer selektiven toxischen Wirkung von kationischen NP auf Tumorzellen

führen. Das peritumorale Mikromilieu ist zudem negativ geladen aufgrund vermehrter Laktat-Produktion und Efflux von H^+ -Ionen aus dem Zytoplasma des Tumors (151, 152). Diese negative Ladung des Tumormilieus scheint einen Zerfall der ZnO-NP in Zn^{2+} -Ionen zu begünstigen (152).

In wässrigem Milieu setzten ZnO-NP Zn^{2+} -Ionen frei. Zwischen den toxischen Wirkungen, welche durch die Ionen oder durch die NP hervorgerufen werden, muss differenziert werden. Bis zu 50% der ZnO-NP können im Zellkulturmedium zu Zn^{2+} Ionen dissoziieren (153). Dabei hängt die Ionenbildung von der Mediumzusammensetzung, der Partikelgröße, der Agglomeratbildung und nicht zuletzt auch vom Zeta-Potential ab (154, 155). Die Mediumzusammensetzung muss insbesondere bei Zellkultur-Modellen berücksichtigt werden, da hohe Konzentrationen von Carbonat und Phosphat-Ionen zur Bildung von Zinkcarbonat und Zinkphosphat führen. Auch können die eingesetzten Puffer die zytotoxische Wirkung durch Neutralisation der Ionen vermindern. Dies resultiert in einer veränderten Stabilität der Dispersion und folglich auch in einer anderen Zn^{2+} -Konzentration (156). Zudem bilden im Medium enthaltene Proteine einen sogenannten *protein corona* (PC) um die NP. Der PC besteht aus Zuckern, Nukleinsäuren, Aminosäuren und Lipiden (157, 158). Die von einem PC umgebenen NP wiesen veränderte physikalische und chemische Eigenschaften auf, was letztendlich auch die Toxizität beeinflusst (157). Für ZnO-NP konnte die Bildung eines PC bereits beobachtet werden (158).

Weitergehende Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zur Visualisierung der Zellveränderungen nach ZnO-NP Aufnahme zeigten fragmentierte Membranen und Kerne sowie vermehrte Autophagosomen und Lipidtropfen innerhalb des Zytoplasmas (159). Eine Anreicherung von ZnO-NP im Nukleus konnte beobachtet werden. Die ZnO-NP Konzentration des Zytoplasmas war geringer, was auf einen Zerfall der NP in Zn^{2+} -Ionen zurückgeführt wurde (61).

Es konnte bereits evaluiert werden, dass Zn^{2+} das intrazelluläre ROS-Level erhöhen und daraus vermehrte Apoptosen resultieren. Fukui et al. konnten zeigen, dass der Pearson's Korrelationskoeffizient 0.989 für das intrazelluläre ROS-Level und den intrazellulären Zn^{2+} -Spiegel beträgt. Sowohl der intrazelluläre Zn^{2+} -Spiegel als auch das ROS-Level stiegen ab Zn^{2+} -Konzentrationen von 30 $\mu g/ml$ an. Dies lässt eine wesentliche Rolle von Zn^{2+} in der zellulären Toxizität durch ROS-Erhöhung vermuten. Im Gegenzug konnte durch eine Inhibition der Zn^{2+} Freisetzung die Zytotoxizität von

ZnO-NP gesenkt werden (126). Andere Arbeitsgruppen postulieren, dass die ROS-Freisetzung ausschließlich von Zn^{2+} ausgehe (160). Auch konnte an Zebrafischen gezeigt werden, dass die Toxizität überwiegend von Zn^{2+} hervorgerufen wird, wobei jedoch die ZnO-NP als internalisierte Zn^{2+} -Quelle dienen (161). Auch nach intratrachealer Instillation in Rattenlungen erhöhte sich die ROS-Konzentration, was auf die Zn^{2+} Ionen zurückgeführt wurden. Eine Woche nach Instillation ließ der Zn^{2+} vermittelte oxidative Stress nach, gemessen an dem LDH-Level (126). Dieser oxidative Stress kann sekundär genotoxisch wirken (162).

Auch sind Änderungen des Membranpotentials der Mitochondrien durch Zn^{2+} -Ionen beschrieben, woraus durch Caspase-3 Aktivierung Apoptosen resultieren können (115, 159). Diese Caspase-3 Aktivierung konnte jedoch nicht von allen Arbeitsgruppen festgestellt werden (117).

Ebenfalls können durch ZnO-NP DNA-Schäden hervorgerufen werden, wobei die Ätiologie der Schädigung durch Zn^{2+} -Ionen oder durch ZnO-NP Bestandteil aktueller Diskussionen ist (119). Nach ZnO-NP Exposition konnten DSB mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden (61). Als mögliche Mechanismen der DSB werden Wechselwirkungen der Zn^{2+} mit den Histonen oder den Phosphaten der DNA genannt sowie eine direkte Interkalation in die DNA-Stränge (61). Es konnte gezeigt werden, dass DNA-Schäden durch ZnO-NP zur Autophagie der Zellen führen können. DNA-Reparationsmechanismen können durch die NP inhibiert werden, sodass es zu einem Arrest in der G0/G1-Phase des Zellzykluses kommt (163).

Zudem scheinen ZnO-NP adaptive Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums zu induzieren, die letztendlich auch in einer Apoptose resultieren können (164). Auch die mitochondriale Aktivität wird durch ZnO-NP beeinflusst (121). Eine Verminderung der mitochondrialen Aktivität konnte für ZnO-NP Konzentrationen von 50 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ demonstriert werden (114). DNA-Schäden und Zellmembranschädigungen sind ebenfalls als Schädigungsmechanismus von ZnO-NP zu nennen (165). Zudem konnte im Mausmodell eine *mitogen-activated protein* (MAP)-Erhöhung mit daraus resultierender Verminderung der GST und Cholin-Acetyltransferase (CAT) gezeigt werden (145).

Letztendlich sollte auch nicht außer Acht gelassen werden, dass Zink ein essentieller Bestandteil von mehr als 3000 Proteinen im menschlichen Körper ist und durch eine Veränderung der zellulären Zinkhomöostase eine Vielzahl von Wechselwirkungen

auftreten können, die mit *in vitro* und einfachen *in vivo* Modellen nicht erfasst werden können. So sind an der humanen Zinkhomöostase allein 24 Zink-Transporter beteiligt (166).

5.3 Vaskularisation der CAM

Sowohl makroskopisch als auch lichtmikroskopisch konnte nach Tumorapplikation auf die CAM eine tumornahe Angiogenese beobachtet werden. Diese Gefäße zeigten jedoch lichtmikroskopisch an repräsentativen Schnitten keinen Tumorbezug. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass eine *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und EGFR abhängige Angiogenese auf der CAM nach Applikation von A549-Zellen stattfindet (167) und dies am Mausmodell bestätigen (168). Auch eine *fibroblast growth factor 1* (FGF1), *fibroblast growth factor 2* (FGF2), *kinase insert domain receptor* (KDR) und *vascular endothelial growth factor- α* (VEGF α) abhängige Angiogenese konnte bereits nachgewiesen werden (169, 170).

Als ein Xenograftmodell für die tumorinduzierte Angiogenese eignet sich das CAM-Modell aufgrund der natürlichen Unreife des Immunsystems (171). Diese Immundefizienz ermöglicht das unkontrollierte Wachstum der Tumore. So konnten von Patienten entnommene Tumorzellen erfolgreich auf der CAM angesiedelt werden. Dies gelang unter anderen für nasopharyngeale Karzinome und das Ovarialkarzinom (172). Eine effektive zellvermittelte Immunreaktion auf fremde Tumorzellen konnte erst ab dem 12. Entwicklungstag gezeigt werden (173). In einem Fall konnte im Rahmen dieser Arbeit eine peritumorale Lymphozytenansammlung beobachtet werden, was auf eine fortgeschrittene Reife der CAM und des Immunsystems des Embryos zurückzuführen ist.

Ein weiterer Vorteil ist, dass es sich um ein geschlossenes System handelt, in dem die Tumorprogression, das heißt Wachstum, Invasion und insbesondere die Metastasierung, beurteilt werden können (132). Zudem ist die mesodermale Membran bereits vor der Tumorsiedlung gut vaskularisiert (171). Durch zwei Arterien und eine Vene besteht eine Verbindung an den Kreislauf des Hühnerembryos, sodass in weiterführenden Projekten auch eine Metastasierung untersucht werden kann. Eine Differenzierung zwischen den CAM-eigenen Gefäßen und den tumornahen Neo-Gefäßen ist konventionell-lichtmikroskopisch nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die qualitative Dichte der Gefäße im Bereich des Tumors mit der Gefäßdichte

tumorfreier Kontrollen verglichen. Es zeigte sich eine Zunahme peritumoraler Gefäße im Vergleich zu Regionen der CAM ohne Tumore. Daraus wurde geschlussfolgert, dass es sich dabei um CAM-eigene Gefäße handelte, die keine Verbindung zu den Tumoren aufwiesen.

Zudem eignet sich das Modell aufgrund seines schnellen Tumorwachstums. So konnten bereits nach 2 bis 5 Tagen nach Tumoransiedlung eine Versorgung dieser durch die CAM-Gefäße gezeigt werden (174). Dies wird durch das schnelle Wachstum der CAM mit Beginn an Tag 3 der Entwicklung bis zu der vollständigen Ausreifung an Tag 13 mit sehr kurzen Zellzyklen begünstigt (132). Danach verringert sich die Zellteilung mit einer folglich langsameren tumorinduzierten Angiogenese (175). Jedoch sollte diese natürliche, wachstumsbedingte Angiogenese nicht zu einer Überschätzung des tumorinduzierten Effektes führen. Ein Grund für die mangelnde Gefäßinvasion in die im Rahmen dieser Arbeit auf der CAM angesiedelten Tumore könnte die späte Applikation dieser an Tag 10 sein. Auch wurden die Tumore lediglich 24 Stunden auf der CAM inkubiert, was für eine in den tumorinfiltrierende Angiogenese nicht ausreichend zu sein scheint.

Des Weiteren ist es schwierig zu differenzieren, ob die Angiogenese durch den angesiedelten Tumor bzw. das aufgebrachte Fremdmaterial oder durch andere, nicht kontrollierte Einflüsse hervorgerufen wurde (132). Als weitere Mechanismen der Gefäßneuentstehung wird das *vasculogenetic mimicry* diskutiert. *Vasculogenetic mimicry* beschreibt die Fähigkeit von Tumoren zu endothelial-ähnlichen Zellen zu dedifferenzieren und gefäßähnliche Strukturen zu bilden. Diese Strukturen enthalten Plasma und Erythrozyten (176). *Vasculogenetic mimicry* konnte schon für Melanomzellen auf der CAM gezeigt werden (177). Auch für NSCLC konnte eine Gefäßbildung ohne Angiogenese dargestellt werden (178).

Die Auswertung der CAM erfolgte durch Lichtmikroskopie in Kombination mit immunhistochemischen Färbungen nach qualitativen Kriterien. Es wurden repräsentative Areale der CAM mit Tumorbezug für die Einbettung in Paraffin verwendet, das heißt ein *ex ovo*-Verfahren. Andere Arbeitsgruppen entwickelten für die Evaluation der Angiogenese teils automatisierte Methoden. Neben der Lichtmikroskopie wurden unter anderen bereits MRT, Positronen-Emissions-Tomographie (PET), optische Kohärenztomographie (OCT) oder Elektronenmikroskopie basierte Auswertungsmethoden verwendet (179-182). Die

Auflösung des MRT und des PET scheinen aber zu gering, um eine Darstellung des Gefäßsystems der CAM zu ermöglichen. Zudem konnten *in vivo* bzw. *in ovo* Methoden für die Analyse der Angiogenese entwickelt werden (132). Für eine quantitative Analyse der Angiogenese fotografierten andere Arbeitsgruppen die Gefäße zentraler Areale der CAM und verglichen die Gefäßdichte mit unbehandelten Kontrollen (183). Weiterhin wurden die Gefäßverzweigungen je mm² oder die Gefäßlänge als Maß für eine quantitative oder semiquantitative Analyse der Angiogenese genutzt (132). Als weitere qualitative Methoden konnten fluoreszierende Substanzen, wie beispielsweise *Lens culinaris agglutinin*, in das Gefäßsystem der CAM injiziert und dieses fluoro-reszenzmikroskopisch dargestellt werden (184). Um den Ursprung der neuen Gefäße zu bestimmen, können die Erythrozyten in den Gefäßen analysiert werden. So konnte bereits gezeigt werden, dass auf die CAM applizierte Rattentumore in den neu ausgebildeten intratumoralen Gefäßen ausschließlich Erythrozyten embryonaler Herkunft beinhalten, was für eine Neovaskularisation spricht (185). Als indirekter Hinweis auf eine erfolgte Gefäßinvasion in den applizierten Tumor konnten bereits Metastasen dieser nachgewiesen werden. So konnten humane Fibrosarkomzellen mit Hilfe einer PCR in der embryonalen Hühnerleber nachgewiesen werden. Mittels *fiber-optic array scanning technology* (FAST) wurden im embryonalen Kreislauf zirkulierende Tumorzellen detektiert (184). Weiterhin muss bei den betrachteten Gefäßen differenziert werden, ob es sich um bereits bestehende Gefäße handelt, entlang derer der Tumor wächst. Ein Tumorwachstum entlang der CAM-Gefäße ohne Gefäßinvasion konnte bereits für humane Melanomzellen, das Ovarialkarzinom und das Fibrosarkom gezeigt werden (132, 186).

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der Toxizität von ZnO-Nanopartikeln auf A549-Zellen mit und ohne begleitende Radiotherapie als Möglichkeit neuer Therapieoptionen in der Krebstherapie.

Es konnte gezeigt werden, dass nach 4-stündiger Inkubation von ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 100 µg/ml die Vitalität der Zellen abnahm. Geringere ZnO-Nanopartikel Konzentrationen und Inkubationszeiten zeigten keine signifikante Abnahme der Zellvitalität.

Zudem wurde bei den A549-Zellen eine geringere metabolische Aktivität nach Behandlung mit der ZnO-Nanopartikel Konzentration von 100 µg/ml über 4 Stunden gemessen. Niedrigere ZnO-Nanopartikel Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 10 µg/ml zeigten nach 4 Stunden jedoch eine Steigerung des Stoffwechsels. Diese Ergebnisse sprechen für eine Toxizität von ZnO-Nanopartikeln in hohen Konzentrationen. Der toxische Effekt konnte durch eine begleitende Bestrahlung verstärkt werden, wobei insbesondere bei hohen Bestrahlungsdosen der toxische Effekt der ZnO-Nanopartikel Konzentration in den Hintergrund trat.

Eine Tumorinvasion in die Chorioallantoismembran konnte im CAM-Modell dargestellt werden. Dies gibt die Möglichkeit, die Toxizität von ZnO-Nanopartikeln auf angesiedelten Tumoren der Chorioallantoismembran in weiterführenden Experimenten zu evaluieren.

Es konnte zudem eine Effizienzsteigerung der Radiotherapie durch ZnO-Nanopartikel insbesondere bei niedrigen Bestrahlungsdosen gezeigt werden. In weiterführenden Experimenten müssen diese Ergebnisse auf *in vivo* Modelle - oder als Zwischenschritt auf das CAM-Modell - übertragen werden. Sollte dies gelingen, eröffnen sich neue Möglichkeiten in der Krebstherapie.

Literaturverzeichnis

1. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Innere Organe. Stuttgart: Thieme; 2018.
2. Genzwürker H, Hinkelbein J, Keil J, Zimmer G, Ackermann H. ALLEX - alles fürs Examen : A. Innere Medizin. Stuttgart: Thieme; 2014.
3. Ulfing N. Kurzlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme; 2015.
4. Lüllmann-Rauch R. Taschenbuch Histologie. Stuttgart: Thieme; 2015.
5. Nicod LP. Pulmonary defence mechanisms. Respiration; International Review of Thoracic Diseases. 1999;66(1):2-11.
6. Underdown BJ, Schiff JM. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. Annual Review of Immunology. 1986;4:389-417.
7. Grassin-Delyle S, Abrial C, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P. The role of toll-like receptors in the production of cytokines by human lung macrophages. Journal of Innate Immunity. 2018:1-11.
8. Weissler JC, Nicod LP, Lipscomb MF, Toews GB. Natural killer cell function in human lung is compartmentalized. The American Review of Respiratory Disease. 1987;135(4):941-9.
9. Statistisches Bundesamt. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebserkrankungen [Internet]. 08.10.2019 [zitiert am 15.01.2020]. Webpage: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Krebserkrankungen.html>
10. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). [Internet]. 20.11.2018 [zitiert am 25.11.2018]. Webpage: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_2&OPINDEX=5&HANDLER=_XWD_CUBE.SETPGS&DATACUBE=_XWD_30&D.001=1000001&D.002=1000002&D.003=43&D.022=9991&D.007=9215
11. Herold G. Innere Medizin : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung. Köln: Herold, Gerald; 2018.
12. Statistisches Bundesamt. Rauchgewohnheiten nach Altersgruppen und Geschlecht- Ergebnisse des Mikrozensus 2017 [Internet]. 21.03.2019 [zitiert am

15.01.2020]. Webpage:

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/GesundheitszustandRelevantesVerhalten/Tabellen/Rauchverhalten.html>

13. Mengoli MC, Longo FR, Fraggetta F, Cavazza A, Dubini A, Ali G, Guddo F, Gilioli E, Bogina G, Nannini N, Barbisan F, De Rosa N, Falconieri G, Rossi G, Graziano P. The 2015 World Health Organization Classification of lung tumors: new entities since the 2004 Classification. *Pathologica*. 2018;110(1):39-67.

14. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015;10(9):1243-60.

15. Griesinger F, Eberhardt W, Früh M, Gautschi O, Hilbe W, Hoffmann H, Huber RM, Pirker R, Pöttgen C, Pritzkuleit R, Reck M, Reinmuth N, Sebastian M, Ukena D, Waller C, Wolf J, Wolf M, Wörmann B. Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC). Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO). [Internet]. November 2018 [zitiert am Webpage:

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@@view/html/index.html>

16. Lung Cancer Group Cologne. Treibermutationen [Internet]. 10.08.2018 [zitiert am 20.11.2018]. Webpage:

<https://lungcancergroup.de/molekularpathologie/treibermutationen/>

17. Roeper J, Griesinger F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced nonsmall cell lung cancer: what is the preferred first-line therapy? *Current Opinion in Oncology*. 2019;31(1):1-7.

18. (NGM). CLCGPCNGM. A genomics-based classification of human lung tumors. *Science Translational Medicine*. 2013;5(209):209ra153.

19. Europäische Kommission. Was ist ein „Nanomaterial“? Europäische Kommission legt erstmals gemeinsame Definition vor [Internet]. 19.02.2018 [zitiert am 22.11.2018]. Webpage: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_de.htm

20. Steinbach DC. Wie werden Nanomaterialien freigesetzt? [Internet]. [zitiert am 22.11.2018]. Webpage: <https://www.nanopartikel.info/nanoinfo/grundlagen/1473-freisetzung-grundlagen>
21. Ambrosetti A, Ferri N, DiStasio RA, Jr., Tkatchenko A. Wavelike charge density fluctuations and van der Waals interactions at the nanoscale. *Science (New York, NY)*. 2016;351(6278):1171-6.
22. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Moller W. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Accounts of Chemical Research*. 2013;46(3):714-22.
23. Kreyling WG, Hirn S, Moller W, Schleh C, Wenk A, Celik G, Lipka J, Schaffler M, Haberl N, Johnston BD, Sperling R, Schmid G, Simon U, Parak WJ, Semmler-Behnke M. Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS nano*. 2014;8(1):222-33.
24. Geraets L, Oomen AG, Schroeter JD, Coleman VA, Cassee FR. Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-day exposure study. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*. 2012;127(2):463-73.
25. Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdorster G, Kreyling WG. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhalation Toxicology*. 2004;16(6-7):453-9.
26. Kermanizadeh A, Balharry D, Wallin H, Loft S, Moller P. Nanomaterial translocation--the biokinetics, tissue accumulation, toxicity and fate of materials in secondary organs--a review. *Critical Reviews in Toxicology*. 2015;45(10):837-72.
27. Jacobsen NR, Stoeger T, van den Brule S, Saber AT, Beyerle A, Vietti G, Mortensen A, Szarek J, Budtz HC, Kermanizadeh A, Banerjee A, Ercal N, Vogel U, Wallin H, Moller P. Acute and subacute pulmonary toxicity and mortality in mice after intratracheal instillation of ZnO nanoparticles in three laboratories. *Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 2015;85:84-95.

28. Buckley A, Warren J, Hodgson A, Marczylo T, Ignatyev K, Guo C, Smith R. Slow lung clearance and limited translocation of four sizes of inhaled iridium nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*. 2017;14(1):5.
29. Kodali V, Littke MH, Tilton SC, Teeguarden JG, Shi L, Frevert CW, Wang W, Pounds JG, Thrall BD. Dysregulation of macrophage activation profiles by engineered nanoparticles. *ACS nano*. 2013;7(8):6997-7010.
30. Pujalte I, Dieme D, Haddad S, Serventi AM, Bouchard M. Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles after inhalation in rats. *Toxicology Letters*. 2017;265:77-85.
31. Jachak A, Lai SK, Hida K, Suk JS, Markovic N, Biswal S, Breysse PN, Hanes J. Transport of metal oxide nanoparticles and single-walled carbon nanotubes in human mucus. *Nanotoxicology*. 2012;6(6):614-22.
32. Cain JR, Fletcher RM. Diagnosing metal fume fever--an integrated approach. *Occupational Medicine (Oxford, England)*. 2010;60(5):398-400.
33. Zhang R, Dai Y, Zhang X, Niu Y, Meng T, Li Y, Duan H, Bin P, Ye M, Jia X, Shen M, Yu S, Yang X, Gao W, Zheng Y. Reduced pulmonary function and increased pro-inflammatory cytokines in nanoscale carbon black-exposed workers. *Particle and Fibre Toxicology*. 2014;11:73.
34. Brunekreef B, Beelen R, Hoek G, Schouten L, Bausch-Goldbohm S, Fischer P, Armstrong B, Hughes E, Jerrett M, van den Brandt P. Effects of long-term exposure to traffic-related air pollution on respiratory and cardiovascular mortality in the Netherlands: the NLCS-AIR study. *Research Report (Health Effects Institute)*. 2009(139):5-71; discussion 3-89.
35. Ammendolia MG, Iosi F, Maranghi F, Tassinari R, Cubadda F, Aureli F, Raggi A, Superti F, Mantovani A, De Berardis B. Short-term oral exposure to low doses of nano-sized TiO₂ and potential modulatory effects on intestinal cells. *Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 2017;102:63-75.
36. Sadio A, Amaral AL, Nunes R, Ricardo S, Sarmento B, Almeida R, Tsukamoto H, das Neves J. A mouse intra-intestinal infusion model and its application to the study of nanoparticle distribution. *Frontiers in Physiology*. 2016;7:579.

37. Irache JM, Esparza I, Gamazo C, Agueros M, Espuelas S. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary Parasitology*. 2011;180(1-2):47-71.
38. Frohlich E, Roblegg E. Oral uptake of nanoparticles: human relevance and the role of in vitro systems. *Archives of Toxicology*. 2016;90(10):2297-314.
39. Frohlich E, Roblegg E. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology*. 2012;291(1-3):10-7.
40. Bellmann S, Carlander D, Fasano A, Momcilovic D, Scimeca JA, Waldman WJ, Gombau L, Tsytsikova L, Canady R, Pereira DI, Lefebvre DE. Mammalian gastrointestinal tract parameters modulating the integrity, surface properties, and absorption of food-relevant nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2015;7(5):609-22.
41. Fernandez K, Roeckel M, Canales E, Dumont J. Modeling of the nanoparticles absorption under a gastrointestinal simulated ambient condition. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(7):2691-701.
42. Garg A, Bhalala K, Tomar DS, Wahajuddin. In-situ single pass intestinal permeability and pharmacokinetic study of developed Lumefantrine loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;516(1-2):120-30.
43. Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(11):1152-61.
44. Campbell CS, Contreras-Rojas LR, Delgado-Charro MB, Guy RH. Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*. 2012;162(1):201-7.
45. Leite-Silva VR, Sanchez WY, Studier H, Liu DC, Mohammed YH, Holmes AM, Ryan EM, Haridass IN, Chandrasekaran NC, Becker W, Grice JE, Benson HA, Roberts MS. Human skin penetration and local effects of topical nano zinc oxide after occlusion and barrier impairment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2016;104:140-7.

46. Monteiro-Riviere NA, Wiensch K, Landsiedel R, Schulte S, Inman AO, Riviere JE. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*. 2011;123(1):264-80.
47. Roberts MS, Mohammed Y, Pastore MN, Namjoshi S, Yousef S, Alinaghi A, Haridass IN, Abd E, Leite-Silva VR, Benson H, Grice JE. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*. 2017;247:86-105.
48. Rouse JG, Yang J, Ryman-Rasmussen JP, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Letters*. 2007;7(1):155-60.
49. Kao YY, Cheng TJ, Yang DM, Wang CT, Chiung YM, Liu PS. Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*. 2012;48(2):464-71.
50. Persson E, Henriksson J, Tallkvist J, Rouleau C, Tjalve H. Transport and subcellular distribution of intranasally administered zinc in the olfactory system of rats and pikes. *Toxicology*. 2003;191(2-3):97-108.
51. Kniesel U, Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2000;20(1):57-76.
52. Kim HR, Gil S, Andrieux K, Nicolas V, Appel M, Chacun H, Desmaele D, Taran F, Georgin D, Couvreur P. Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. 2007;64(3):356-64.
53. Chen L, Yokel RA, Hennig B, Toborek M. Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature. *Journal of Neuroimmune Pharmacology : the Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology*. 2008;3(4):286-95.
54. Simko M, Mattsson MO. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010;7:42.

55. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2010;48(6):749-62.
56. Panth N, Paudel KR, Parajuli K. Reactive oxygen species: A key hallmark of cardiovascular disease. *Advances in Medicine*. 2016;2016:9152732.
57. Couto D, Freitas M, Vilas-Boas V, Dias I, Porto G, Lopez-Quintela MA, Rivas J, Freitas P, Carvalho F, Fernandes E. Interaction of polyacrylic acid coated and non-coated iron oxide nanoparticles with human neutrophils. *Toxicology Letters*. 2014;225(1):57-65.
58. Fu PP, Xia Q, Hwang HM, Ray PC, Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014;22(1):64-75.
59. Ahamed M, Alhadlaq HA, Alam J, Khan MA, Ali D, Alarafi S. Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines. *Current Pharmaceutical Design*. 2013;19(37):6681-90.
60. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters*. 2006;6(8):1794-807.
61. Heim J, Felder E, Tahir MN, Kaltbeitzel A, Heinrich UR, Brochhausen C, Mailander V, Tremel W, Brieger J. Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale*. 2015;7(19):8931-8.
62. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;160(1):1-40.
63. Ciappellano SG, Tedesco E, Venturini M, Benetti F. In vitro toxicity assessment of oral nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;106(Pt B):381-401.
64. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(23):5839-48.

65. Deepa S, Murugananthkumar R, Raj Gupta Y, Gowda KSM, Senthilkumaran B. Effects of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate on the testis of common carp, *Cyprinus carpio*. *Nanotoxicology*. 2019;1-18.
66. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*. 2000;25(10):502-8.
67. Andon FT, Fadeel B. Programmed cell death: molecular mechanisms and implications for safety assessment of nanomaterials. *Accounts of Chemical Research*. 2013;46(3):733-42.
68. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(1):44-84.
69. Mortezaee K, Najafi M, Samadian H, Barabadi H, Azarnezhad A, Ahmadi A. Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles: A comprehensive review. *Chemico-Biological Interactions*. 2019;312:108814.
70. Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(2):564-74.
71. Jain AK, Singh D, Dubey K, Maurya R, Pandey AK. Zinc oxide nanoparticles induced gene mutation at the HGPRT locus and cell cycle arrest associated with apoptosis in V-79 cells. *Journal of Applied Toxicology : JAT*. 2019;39(5):735-50.
72. Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *The Science of the Total Environment*. 2012;438:225-32.
73. Hong SC, Lee JH, Lee J, Kim HY, Park JY, Cho J, Lee J, Han DW. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:3219-31.
74. Zastawny TH, Altman SA, Randers-Eichhorn L, Madurawe R, Lumpkin JA, Dizdaroglu M, Rao G. DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995;18(6):1013-22.

75. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*. 2002;181-182:219-22.
76. Kim SY, Doh HJ, Jang MH, Ha YJ, Chung SI, Park HJ. Oral immunization with *Helicobacter pylori*-loaded poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Helicobacter*. 1999;4(1):33-9.
77. Read RC, Naylor SC, Potter CW, Bond J, Jabbal-Gill I, Fisher A, Illum L, Jennings R. Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine*. 2005;23(35):4367-74.
78. Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, de la Fuente JM, Grazu V, Borm P, Estrada G, Ntziachristos V, Razansky D. Multifunctional nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010;7:3.
79. Golombek SK, May JN, Theek B, Appold L, Drude N, Kiessling F, Lammers T. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;130:17-38.
80. Bowerman CJ, Byrne JD, Chu KS, Schorzman AN, Keeler AW, Sherwood CA, Perry JL, Luft JC, Darr DB, Deal AM, Napier ME, Zamboni WC, Sharpless NE, Perou CM, DeSimone JM. Docetaxel-loaded PLGA nanoparticles improve efficacy in taxane-resistant triple-negative breast cancer. *Nano Letters*. 2017;17(1):242-8.
81. Alirezaie Alavijeh A, Barati M, Barati M, Abbasi Dehkordi H. The potential of magnetic nanoparticles for diagnosis and treatment of cancer based on body magnetic field and organ-on-the-chip. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2019;9(3):360-73.
82. Valdiglesias V, Kiliç G, Costa C, Fernández-Bertólez N, Pásaro E, Teixeira JP, Laffon B. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. 2015;56(2):125-48.
83. Hu G, Guo M, Xu J, Wu F, Fan J, Huang Q, Yang G, Lv Z, Wang X, Jin Y. Nanoparticles targeting macrophages as potential clinical therapeutic agents against cancer and inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1998.
84. Citrin DE. Recent developments in radiotherapy. *The New England Journal of Medicine*. 2017;377(11):1065-75.

85. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0 [Internet]. 15.03.2018 [zitiert am 15.01.2020]. Webpage: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>
86. Zhou C, Jones B, Moustafa M, Schwager C, Bauer J, Yang B, Cao L, Jia M, Mairani A, Chen M, Chen L, Debus J, Abdollahi A. Quantitative assessment of radiation dose and fractionation effects on normal tissue by utilizing a novel lung fibrosis index model. *Radiation Oncology (London, England)*. 2017;12(1):172.
87. Kłębowski B, Depciuch J, Parlińska-Wojtan M, Baran J. Applications of noble metal-Based nanoparticles in medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(12).
88. Hosseinimehr SJ. Flavonoids and genomic instability induced by ionizing radiation. *Drug Discovery Today*. 2010;15(21-22):907-18.
89. Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O. 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 Radical Biology & Medicine*. 2012;53(2):260-70.
90. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):207-18.
91. Dextraze ME, Gantchev T, Girouard S, Hunting D. DNA interstrand cross-links induced by ionizing radiation: an unsung lesion. *Mutation Research*. 2010;704(1-3):101-7.
92. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2004;59(4):928-42.
93. Jiang Y, Hong H, Cao H, Wang Y. In vivo formation and in vitro replication of a guanine-thymine intrastrand cross-link lesion. *Biochemistry*. 2007;46(44):12757-63.
94. Zhang Q, Wang Y. The reactivity of the 5-hydroxy-5,6-dihydrothymidin-6-yl radical in oligodeoxyribonucleotides. *Chemical Research in Toxicology*. 2005;18(12):1897-906.

95. Wang Y. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chemical Research in Toxicology*. 2008;21(2):276-81.
96. Sun J, Chen Y, Li M, Ge Z. Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. *Free Radical Biology & Medicine*. 1998;24(4):586-93.
97. Zygmanski P, Sajo E. Nanoscale radiation transport and clinical beam modeling for gold nanoparticle dose enhanced radiotherapy (GNPT) using X-rays. *The British Journal of Radiology*. 2016;89(1059):20150200.
98. Nikjoo H, Emfietzoglou D, Charlton DE. The Auger effect in physical and biological research. *International Journal of Radiation Biology*. 2008;84(12):1011-26.
99. Beddoes CM, Case CP, Briscoe WH. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015;218:48-68.
100. Stylianopoulos T, Soteriou K, Fukumura D, Jain RK. Cationic nanoparticles have superior transvascular flux into solid tumors: insights from a mathematical model. *Annals of Biomedical Engineering*. 2013;41(1):68-77.
101. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2011;697:63-70.
102. Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010;7(9):1063-77.
103. Krol A, Pomastowski P, Rafinska K, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017;249:37-52.
104. Latscha HP, Mutz M. *Chemie der Elemente : Chemie-Basiswissen IV*. Berlin, Heidelberg: Springer 2011.
105. Jiang J, Pi J, Cai J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2018;2018:1062562.
106. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. Zink [Internet]. [zitiert am 19.10.2019]. Webpage: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/zink/>
107. Fosmire GJ. Zinc toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1990;51(2):225-7.

108. Ogawa Y, Kinoshita M, Shimada S, Kawamura T. Zinc and skin disorders. *Nutrients*. 2018;10(2).
109. Orino K. Inhibitory effect of transferrin on serum zinc measurement. *Biometals : an International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*. 2017;30(4):615-21.
110. Ogawa Y, Kawamura T, Shimada S. Zinc and skin biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016;611:113-9.
111. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*. 1993;73(1):79-118.
112. Cousins RJ. Gastrointestinal factors influencing zinc absorption and homeostasis. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2010;80(4-5):243-8.
113. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.
114. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. 2006;41(12):2699-711.
115. Kao YY, Chen YC, Cheng TJ, Chiung YM, Liu PS. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*. 2012;125(2):462-72.
116. Jimenez Del Rio M, Velez-Pardo C. Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an in vitro model for neurodegeneration. *Archives of Medical Research*. 2004;35(3):185-93.
117. Donadelli M, Dalla Pozza E, Scupoli MT, Costanzo C, Scarpa A, Palmieri M. Intracellular zinc increase inhibits p53(-/-) pancreatic adenocarcinoma cell growth by ROS/AIF-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1793(2):273-80.
118. Hackenberg S, Zimmermann FZ, Scherzed A, Friehs G, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Burghartz M, Hagen R, Kleinsasser N. Repetitive exposure to zinc oxide nanoparticles induces dna damage in human nasal mucosa mini organ cultures. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2011;52(7):582-9.

119. Ickrath P, Wagner M, Scherzad A, Gehrke T, Burghartz M, Hagen R, Radeloff K, Kleinsasser N, Hackenberg S. Time-dependent toxic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles after long-term and repetitive exposure to human mesenchymal stem cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017;14(12).
120. Guo D, Wu C, Jiang H, Li Q, Wang X, Chen B. Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*. 2008;93(3):119-26.
121. Hsiao IL, Huang YJ. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Science of the Total Environment*. 2011;409(7):1219- 28.
122. Hackenberg S, Scherzed A, Technau A, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Burghartz M, Hagen R, Kleinsasser N. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. *Toxicology In Vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA*. 2011;25(3):657-63.
123. De Berardis B, Civitelli G, Condello M, Lista P, Pozzi R, Arancia G, Meschini S. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;246(3):116-27.
124. Hsiao IL, Huang YJ. Titanium oxide shell coatings decrease the cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*. 2011;24(3):303-13.
125. Valdiglesias V, Costa C, Kilic G, Costa S, Pasaro E, Laffon B, Teixeira JP. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environment International*. 2013;55:92-100.
126. Fukui H, Horie M, Endoh S, Kato H, Fujita K, Nishio K, Komaba LK, Maru J, Miyauhi A, Nakamura A, Kinugasa S, Yoshida Y, Hagihara Y, Iwahashi H. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chemico-Biological Interactions*. 2012;198(1-3):29-37.

127. Zhang J, Qin X, Wang B, Xu G, Qin Z, Wang J, Wu L, Ju X, Bose DD, Qiu F, Zhou H, Zou Z. Zinc oxide nanoparticles harness autophagy to induce cell death in lung epithelial cells. *Cell Death & Disease*. 2017;8(7):e2954.
128. Garcia-Hevia L, Valiente R, Martin-Rodriguez R, Renero-Lecuna C, Gonzalez J, Rodriguez-Fernandez L, Aguado F, Villegas JC, Fanarraga ML. Nano-ZnO leads to tubulin microtubule assembly and actin bundling, triggering cytoskeletal catastrophe and cell necrosis. *Nanoscale*. 2016;8(21):10963-73.
129. Cheng B, Shi W, Russell-Tanner JM, Zhang L, Samulski ET. Synthesis of variable-aspect-ratio, single-crystalline ZnO nanostructures. *Inorganic Chemistry*. 2006;45(3):1208-14.
130. Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur : Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013.
131. Lokman NA, Elder AS, Ricciardelli C, Oehler MK. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(8):9959-70.
132. Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*. 2014;17(4):779-804.
133. Bellairs RO, M. *The Atlas of Chick Development*. United Kingdom, Europe: Academic Press; 1997.
134. Yin L, Xiao X, Georgikou C, Luo Y, Liu L, Gladkich J, Gross W, Herr I. Sulforaphane induces miR135b-5p and its target gene, RASAL2, thereby inhibiting the progression of pancreatic cancer. *Molecular Therapy Oncolytics*. 2019;14:74-81.
135. Liu M, Scanlon CS, Banerjee R, Russo N, Inglehart RC, Willis AL, Weiss SJ, D'Silva NJ. The histone methyltransferase EZH2 mediates tumor progression on the Chick Chorioallantoic Membrane Assay, a novel model of head and neck squamous cell carcinoma. *Translational Oncology*. 2013;6(3):273-81.
136. Hill J. *ZnO-Nanopartikel als Radiosensitizer in epithelialen Tumorzellen der Linie A549 [Doktorarbeit]*. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2020.

137. Adamson IY, Frieditis H, Hedgecock C, Vincent R. Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000;166(2):111-9.
138. Adamcakova-Dodd A, Stebounova LV, Kim JS, Vorrink SU, Ault AP, O'Shaughnessy PT, Grassian VH, Thorne PS. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models. *Particle and Fibre Toxicology*. 2014;11:15.
139. Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Tomonaga T, Oyabu T, Myojo T, Kawai K, Yatera K, Shimada M, Kubo M, Yamamoto K, Kitajima S, Kuroda E, Kawaguchi K, Sasaki T. Evaluation of pulmonary toxicity of zinc oxide nanoparticles following inhalation and intratracheal instillation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(8).
140. He T, Long J, Li J, Liu L, Cao Y. Toxicity of ZnO nanoparticles (NPs) to A549 cells and A549 epithelium in vitro: Interactions with dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017;56:233-40.
141. Gilbert B, Fakra SC, Xia T, Pokhrel S, Madler L, Nel AE. The fate of ZnO nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells. *ACS nano*. 2012;6(6):4921-30.
142. Wiesmann N, Klunker M, Demuth P, Brenner W, Tremel W, Brieger J. Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. 2019;51:226-34.
143. Zerboni A, Bengalli R, Baeri G, Fiandra L, Catelani T, Mantecchia P. Mixture effects of diesel exhaust and metal oxide nanoparticles in human lung A549 cells. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 2019;9(9).
144. Kobayashi A, Konishi T. Radiation quality effects alteration in COX-2 pathway to trigger radiation-induced bystander response in A549 lung carcinoma cells. *Journal of Radiation Research*. 2018;59(6):754-9.
145. El-Shorbagy HM, Eissa SM, Sabet S, El-Ghor AA. Apoptosis and oxidative stress as relevant mechanisms of antitumor activity and genotoxicity of ZnO-NPs alone and in combination with N-acetyl cysteine in tumor-bearing mice. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:3911-28.

146. Liu J, Kang Y, Yin S, Song B, Wei L, Chen L, Shao L. Zinc oxide nanoparticles induce toxic responses in human neuroblastoma SHSY5Y cells in a size-dependent manner. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:8085-99.
147. Sadjadpour S, Safarian S, Zargar SJ, Sheibani N. Antiproliferative effects of ZnO, ZnO-MTCP, and ZnO-CuMTCP nanoparticles with safe intensity UV and X-ray irradiation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2016;63(1):113-24.
148. Xiong D, Fang T, Yu L, Sima X, Zhu W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *The Science of the Total Environment*. 2011;409(8):1444-52.
149. Yang Q, Ma Y. Irradiation-enhanced cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Toxicology*. 2014;33(3):187-203.
150. Auffan M, Rose J, Wiesner MR, Bottero JY. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2009;157(4):1127-33.
151. Chen B, Le W, Wang Y, Li Z, Wang D, Ren L, Lin L, Cui S, Hu JJ, Hu Y, Yang P, Ewing RC, Shi D, Cui Z. Targeting negative surface charges of cancer cells by multifunctional nanoprobe. *Theranostics*. 2016;6(11):1887-98.
152. Sasidharan A, Chandran P, Menon D, Raman S, Nair S, Koyakutty M. Rapid dissolution of ZnO nanocrystals in acidic cancer microenvironment leading to preferential apoptosis. *Nanoscale*. 2011;3(9):3657-69.
153. Turney TW, Duriska MB, Jayaratne V, Elbaz A, O'Keefe SJ, Hastings AS, Piva TJ, Wright PF, Feltis BN. Formation of zinc-containing nanoparticles from Zn(2)(+) ions in cell culture media: implications for the nanotoxicology of ZnO. *Chemical Research in Toxicology*. 2012;25(10):2057-66.
154. Hsiao IL, Huang YJ. Effects of serum on cytotoxicity of nano- and micro-sized ZnO particles. *Journal of Nanoparticle Research : an Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology*. 2013;15:1829.
155. Mudunkotuwa IA, Rupasinghe T, Wu CM, Grassian VH. Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids*. 2012;28(1):396-403.

156. Eixenberger JE, Anders CB, Hermann RJ, Brown RJ, Reddy KM, Punnoose A, Wingett DG. Rapid dissolution of ZnO nanoparticles induced by biological buffers significantly impacts cytotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*. 2017;30(8):1641-51.
157. Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Toledano Furman NE, Salvatore F, Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine (London, England)*. 2016;11(1):81-100.
158. Yu J, Kim HJ, Go MR, Bae SH, Choi SJ. ZnO interactions with biomatrices: Effect of particle size on ZnO-protein corona. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 2017;7(11).
159. Remzova M, Zouzelka R, Brzicova T, Vrbova K, Pinkas D, Rossner P, Topinka J, Rathousky J. Toxicity of TiO₂, ZnO, and SiO₂ nanoparticles in human lung cells: Safe-by-design development of construction materials. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 2019;9(7).
160. Song W, Zhang J, Guo J, Zhang J, Ding F, Li L, Sun Z. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicology Letters*. 2010;199(3):389-97.
161. Yu LP, Fang T, Xiong DW, Zhu WT, Sima XF. Comparative toxicity of nano-ZnO and bulk ZnO suspensions to zebrafish and the effects of sedimentation, OH production and particle dissolution in distilled water. *Journal of Environmental Monitoring : JEM*. 2011;13(7):1975-82.
162. Golbamaki N, Rasulev B, Cassano A, Marchese Robinson RL, Benfenati E, Leszczynski J, Cronin MT. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale*. 2015;7(6):2154-98.
163. Scherzad A, Meyer T, Kleinsasser N, Hackenberg S. Molecular mechanisms of zinc oxide nanoparticle-induced genotoxicity short running title: Genotoxicity of ZnO NPs. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2017;10(12).
164. Hetz C, Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control. *Molecular Cell*. 2018;69(2):169-81.
165. Chiang HM, Xia Q, Zou X, Wang C, Wang S, Miller BJ, Howard PC, Yin JJ, Beland FA, Yu H, Fu PP. Nanoscale ZnO induces cytotoxicity and DNA damage in

human cell lines and rat primary neuronal cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2012;12(3):2126-35.

166. Maret W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Advances in Nutrition* (Bethesda, Md). 2013;4(1):82-91.

167. He RQ, Li XJ, Liang L, Xie Y, Luo DZ, Ma J, Peng ZG, Hu XH, Chen G. The suppressive role of miR-542-5p in NSCLC: the evidence from clinical data and in vivo validation using a chick chorioallantoic membrane model. *BMC Cancer*. 2017;17(1):655.

168. Chen H, Cong Q, Du Z, Liao W, Zhang L, Yao Y, Ding K. Sulfated fucoidan FP08S2 inhibits lung cancer cell growth in vivo by disrupting angiogenesis via targeting VEGFR2/VEGF and blocking VEGFR2/Erk/VEGF signaling. *Cancer Letters*. 2016;382(1):44-52.

169. Forough R, Weylie B, Patel C, Ambrus S, Singh US, Zhu J. Role of AKT/PKB signaling in fibroblast growth factor-1 (FGF-1)-induced angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). *Journal of Cellular Biochemistry*. 2005;94(1):109-16.

170. Druyan S, Levi E. Reduced O₂ concentration during CAM development--its effect on angiogenesis and gene expression in the broiler embryo CAM. *Gene Expression Patterns : GEP*. 2012;12(7-8):236-44.

171. Naik M, Brahma P, Dixit M. A cost-Effective and efficient chick ex-ovo CAM Assay protocol to assess angiogenesis. *Methods and Protocols*. 2018;1(2).

172. Komatsu A, Matsumoto K, Saito T, Muto M, Tamanoi F. Patient derived chicken egg tumor model (PDcE Model): Current status and critical issues. *Cells*. 2019;8(5).

173. Ribatti D. The first evidence of the tumor-induced angiogenesis in vivo by using the chorioallantoic membrane assay dated 1913. *Leukemia*. 2004;18(8):1350-1.

174. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, NY). 2017;70:97-101.

175. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Presta M. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nature Protocols*. 2006;1(1):85-91.

176. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American Journal of Pathology*. 1999;155(3):739-52.
177. Ribatti D, Nico B, Cimpean AM, Raica M, Crivellato E, Ruggieri S, Vacca A. B16-F10 melanoma cells contribute to the new formation of blood vessels in the chick embryo chorioallantoic membrane through vasculogenic mimicry. *Clinical and Experimental Medicine*. 2013;13(2):143-7.
178. Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, Tjan-Heijnen VC, Griffioen AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1806(1):18-28.
179. Liu X, Zhang K, Huang Y, Kang JU. Spectroscopic-speckle variance OCT for microvasculature detection and analysis. *Biomedical Optics Express*. 2011;2(11):2995-3009.
180. Chesnick IE, Fowler CB, Mason JT, Potter K. Novel mineral contrast agent for magnetic resonance studies of bone implants grown on a chick chorioallantoic membrane. *Magnetic Resonance Imaging*. 2011;29(9):1244-54.
181. Warnock G, Turtoi A, Blomme A, Bretin F, Bahri MA, Lemaire C, Libert LC, Seret AE, Luxen A, Castronovo V, Plenevaux AR. In vivo PET/CT in a human glioblastoma chicken chorioallantoic membrane model: a new tool for oncology and radiotracer development. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. 2013;54(10):1782-8.
182. Hlushchuk R, Ehrbar M, Reichmuth P, Heinemann N, Styp-Rekowska B, Escher R, Baum O, Lienemann P, Makanya A, Keshet E, Djonov V. Decrease in VEGF expression induces intussusceptive vascular pruning. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(12):2836-44.
183. Parsons-Wingerter P, Lwai B, Yang MC, Elliott KE, Milaninia A, Redlitz A, Clark JI, Sage EH. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. *Microvascular Research*. 1998;55(3):201-14.

184. Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008;130(6):1119-30.
185. Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *The American Journal of Pathology*. 1975;79(3):597-618.
186. Lugassy C, Kleinman HK, Vernon SE, Welch DR, Barnhill RL. C16 laminin peptide increases angiotropic extravascular migration of human melanoma cells in a shell-less chick chorioallantoic membrane assay. *The British Journal of Dermatology*. 2007;157(4):780-2.

Anhang

Tabelle 6 Rohwerte 4.1.1

ZnO-NP, Inkubationszeit	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Mean (n=3, Ko. n=9)	SD
	Alle Angaben in % (Kursive Werte wurden verworfen)						
0 min, Kontrolle	100	100	100	100	100	100	0
	100	100	100	100	100		
	100	100	100	100	100		
15 min, Kontrolle	99,23	99,97	100,36	99,38	99,63	99,85	0,30
	99,72	99,97	100,27	100,20	100,30		
	99,29	99,51	99,79	100,17	99,95		
60 min, Kontrolle	98,72	99,78	99,87	99,37	100,38	99,88	0,25
	99,74	100,27	100,00	100,17	100,01		
	99,62	100,11	99,17	100,34	100,00		
240 min, Kontrolle	96,46	100,00	99,91	99,29	100,23	99,92	0,33
	99,83	100,28	100,30	100,53	99,65		
	99,55	100,32	99,45	99,91	100,19		
0 min, 100 µg/ml	100,55	99,98	100,13	99,25	100,23	100,11	0,125
15 min, 100 µg/ml	97,17	99,88	100,12	99,55	99,92	99,78	0,20
60 min, 100 µg/ml	98,43	99,30	100,14	99,84	100,07	99,73	0,40
240 min, 100 µg/ml	89,97	93,30	94,89	94,61	95,36	94,26	0,85
0 min, 10 µg/ml	99,32	100,14	100,35	100,35	99,50	100,00	0,44
15 min, 10 µg/ml	99,96	99,82	99,62	100,46	99,54	99,80	0,17
60 min, 10 µg/ml	99,89	100,09	100,35	100,22	99,91	100,07	0,16
240 min, 10 µg/ml	99,89	99,89	99,95	100,25	99,72	99,91	0,03

ZnO-NP, Inkubationszeit	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Mean (n=3, Ko. n=9)	SD
Alle Angaben in % (Kursive Werte wurden verworfen)							
0 min, 0,1 µg/ml	99,94	100,1	99,59	<i>100,71</i>	100,30	100,12	0,18
15 min, 0,1 µg/ml	<i>100,30</i>	99,94	99,72	99,93	100,12	100,00	0,11
60 min, 0,1 µg/ml	99,28	<i>100,08</i>	99,67	99,91	99,94	99,84	0,14
240 min, 0,1 µg/ml	99,63	<i>100,13</i>	99,22	99,75	99,53	99,63	0,11

Tabelle 7 ANOVA 4.1.1

Zeit	Verglichene Gruppen	p-Werte
0 Minuten	Kontrolle vs. 0,1 µg/ml Kontrolle vs. 10 µg/ml Kontrolle vs. 100 µg/ml 0,1 µg/ml vs. 10 µg/ml 0,1 µg/ml vs. 100 µg/ml 10 µg/ml vs. 100 µg/ml	1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00
15 Minuten	Kontrolle vs. 0,1 µg/ml Kontrolle vs. 10 µg/ml Kontrolle vs. 100 µg/ml 0,1 µg/ml vs. 10 µg/ml 0,1 µg/ml vs. 100 µg/ml 10 µg/ml vs. 100 µg/ml	1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00
60 Minuten	Kontrolle vs. 0,1 µg/ml Kontrolle vs. 10 µg/ml Kontrolle vs. 100 µg/ml 0,1 µg/ml vs. 10 µg/ml 0,1 µg/ml vs. 100 µg/ml 10 µg/ml vs. 100 µg/ml	1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 0,768
240 Minuten	Kontrolle vs. 0,1 µg/ml Kontrolle vs. 10 µg/ml Kontrolle vs. 100 µg/ml 0,1 µg/ml vs. 10 µg/ml	1,00 1,00 0,00 1,00

Zeit	Verglichene Gruppen	p-Werte
	0,1 µg/ml vs. 100 µg/ml	0,00
	10 µg/ml vs. 100 µg/ml	0,00

Tabelle 8 Kruskal-Wallis-Test 4.1.1

Zeit	Kruskal-Wallis-Test, p-Werte
0 Minuten	0,6952
15 Minuten	0,5712
60 Minuten	0,4169
240 Minuten	0,0223

Tabelle 9 Rohwerte 4.1.2-4.1.8

100 µg/ml ZnO-NP Konzentration							
Inkubations-zeit, Bestrahlungs-dosis	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Mean (n=3)	SD
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle		
	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP		
	Alle Angaben in % (Kursive Werte wurden verworfen)						
0 Minuten, 0 Gray	100	100	100	100	100	100	0
	70,06	96,87	30,5	87,8	69,4	75,95	10,28
0 Minuten, 2 Gray	148,68	245,28	294,19	109,41	79,54	167,79	69,92
	104,94	202,10	209,82	123,14	95,07	143,40	51,65
0 Minuten, 4 Gray	128,25	236,08	279,85	77,78	107,5	157,28	69,03
	125,31	76,42	319,16	299,67	125,99	183,66	100,47

100 µg/ml ZnO-NP Konzentration							
Inkubations- zeit, Bestrahlungs- dosis	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Mean (n=3)	SD
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle		
	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP		
Alle Angaben in % (<i>Kursive Werte wurden verworfen</i>)							
0 Minuten, 8 Gray	131,05	247,9	334,26	270,73	30,34	216,56	74,93
	69,08	402,61	269,12	24,67	40,73	126,31	124,48
15 Minuten, 0 Gray	167,63	86,08	37,63	112,99	64,01	87,69	24,53
	126,37	85,45	26,29	77,18	66,98	76,54	9,26
15 Minuten, 2 Gray	104,94	219,78	166,92	121,61	78,54	131,16	32,07
	62,75	170,28	139,3	132,37	70,87	114,18	37,67
15 Minuten, 4 Gray	111,67	67,04	206,45	85,94	111,03	102,88	14,67
	108,60	151,76	159,29	140,21	34,88	133,53	22,34
15 Minuten, 8 Gray	88,89	32,58	230,73	270,08	410,66	196,57	95,30
	94,36	65,79	216,5	311,08	53,44	125,55	80,05
60 Minuten, 0 Gray	102,20	66,02	37,59	103,94	82,54	83,59	18,12
	173,03	116,02	32,47	112,80	93,47	107,43	12,20
60 Minuten, 2 Gray	82,23	112,78	124,24	146,15	130,42	122,48	8,95
	83,85	198,52	68,93	126,71	180,65	130,40	48,50
60 Minuten, 4 Gray	106,13	31,8	201,63	136,73	69,51	104,12	33,66
	42,85	49,77	160,55	100,42	49,8	66,66	29,23
60 Minuten, 8 Gray	66,21	49,43	258,08	160,81	56,41	94,48	57,65
	68,72	68,35	277,43	237,99	89,65	132,12	92,28

100 µg/ml ZnO-NP Konzentration							
Inkubations- zeit, Bestrahlungs- dosis	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Mean (n=3)	SD
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle		
	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	
	Alle Angaben in % (<i>Kursive Werte wurden verworfen</i>)						
240 Minuten, 0 Gray	47,96	93,41	35,09	132,05	105,78	82,38	30,45
	102,34	53,69	25,72	88,68	123,49	81,57	25,09
240 Minuten, 2 Gray	69,87	175,34	12,06	143,83	38,41	84,04	54,12
	35,76	37,95	27,05	61,22	79,15	44,98	14,11
240 Minuten, 4 Gray	80,02	31,25	153,75	133,86	125,13	113,01	28,89
	37,67	0,8	80,65	58,49	24,92	40,36	16,94
240 Minuten, 8 Gray	41,3	79,03	312,29	35,3	92,93	71,09	26,72
	37,41	126,53	99,05	11,18	69,58	68,68	30,83

10 µg/ml ZnO-NP Konzentration							
Inkubations- zeit, Bestrahlungs- dosis	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Mean (n=3)	SD
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle		
	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	
	Alle Angaben in % (Kursive Werte wurden verworfen)						
0 Minuten, 0 Gray	100	100	100	100	100	100	0
	18,66	188,8	92,6	124,23	73,76	96,86	25,51
0 Minuten, 2 Gray	123,66	224,41	139,67	116,88	233,45	162,58	54,14
	127,76	295,19	170,42	199,37	265,72	211,84	48,86

10 µg/ml ZnO-NP Konzentration							
Inkubations- zeit, Bestrahlungs- dosis	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Mean (n=3)	SD
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle		
	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP		
Alle Angaben in % (<i>Kursive Werte wurden verworfen</i>)							
0 Minuten, 4 Gray	115,70	410,67	242,25	204,22	297,02	247,83	46,65
	126,31	166,47	146,21	160,20	141,91	149,44	9,55
0 Minuten, 8 Gray	70,78	279,75	252,50	392,87	278,44	270,23	15,37
	107,35	181,38	329,83	360,92	197,39	236,20	81,48
15 Minuten, 0 Gray	86,98	119,73	88,07	145,46	112,7	106,83	16,63
	150,68	202,93	97,53	146,29	151,16	149,37	2,68
15 Minuten, 2 Gray	119,58	294,74	171,89	117,69	253,12	181,53	67,29
	91,37	199,31	91,33	207,40	298,33	166,03	64,78
15 Minuten, 4 Gray	110,07	417,96	463,00	273,09	382,26	357,77	75,47
	79,78	549,12	193,27	270,84	527,12	330,41	174,71
15 Minuten, 8 Gray	121,35	301,25	348,61	331,82	356,70	327,23	24,01
	76,80	255,61	271,93	383,86	118,34	215,30	84,35
60 Minuten, 0 Gray	154,89	2,24	100,3	192,29	106,78	151,32	42,87
	204,41	308,73	107,48	161,32	193,72	186,48	22,44
60 Minuten, 2 Gray	108,11	318,76	176,5	201,47	322,78	232,24	75,96
	108,48	454,19	214,23	210,39	556,79	292,94	139,66
60 Minuten, 4 Gray	63,55	526,98	542,21	377,80	485,22	463,33	76,96
	73,27	456,74	456,74	335,38	589,56	416,29	70,07

10 µg/ml ZnO-NP Konzentration							
Inkubations- zeit, Bestrahlungs- dosis	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Mean (n=3)	SD
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle		
	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	
	Alle Angaben in % (Kursive Werte wurden verworfen)						
60 Minuten, 8 Gray	113,31	371,89	385,96	454,07	398,76	385,54	13,44
	113,76	301,24	229,33	205,28	469,35	245,28	49,93
240 Minuten, 0 Gray	175,21	159,64	97,69	160,61	260,8	165,15	8,72
	218,72	276,2	223,73	414,7	694,43	304,88	98,66
240 Minuten, 2 Gray	112,04	268,82	86,92	247,00	625,63	209,29	84,92
	77,95	491,92	328,57	452,48	502,79	424,32	85,24
240 Minuten, 4 Gray	100,01	103,41	156,02	174,85	229,69	186,85	38,28
	159,37	954,06	399,37	257,26	263,48	306,70	80,31
240 Minuten, 8 Gray	122,45	408,42	170,90	92,19	527,94	233,92	153,05
	160,33	464,88	519,22	892,28	555,61	513,24	45,66

0,1 µg/ml ZnO-NP Konzentration							
Inkubations- zeit, Bestrahlungs- dosis	n=1 Kontrolle	n=2 Kontrolle	n=3 Kontrolle	n=4 Kontrolle	n=5 Kontrolle	Mean (n=3)	SD
	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP		
	Alle Angaben in % (Kursive Werte wurden verworfen)						
0 Minuten, 0 Gray	100	100	100	100	100	100	0
	160,34	53,07	122,28	84,05	139,60	115,31	28,42

0,1 µg/ml ZnO-NP Konzentration							
Inkubations- zeit, Bestrahlungs- dosis	n=1 Kontrolle	n=2 Kontrolle	n=3 Kontrolle	n=4 Kontrolle	n=5 Kontrolle	Mean (n=3)	SD
	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP		
	Alle Angaben in % (Kursive Werte wurden verworfen)						
0 Minuten, 2 Gray	66,60	128,66	90,59	157,00	199,21	139,49	55,11
	81,12	112,71	82,34	98,28	187,37	97,78	15,19
0 Minuten, 4 Gray	174,00	96,28	119,99	89,63	161,57	125,94	33,05
	272,27	80,70	83,76	91,13	185,91	120,26	56,97
0 Minuten, 8 Gray	75,55	106,18	153,64	112,53	570,23	124,12	25,77
	138,86	127,49	183,45	146,31	673,02	156,21	23,88
15 Minuten, 0 Gray	77,28	76,00	113,53	87,16	168,31	92,66	18,74
	158,66	18,98	124,70	93,07	150,53	122,77	28,78
15 Minuten, 2 Gray	83,33	103,25	80,37	99,20	187,20	95,26	10,53
	74,08	90,10	94,53	93,20	214,90	92,61	2,27
15 Minuten, 4 Gray	204,78	77,52	75,48	90,30	93,45	87,09	8,44
	143,15	113,80	66,83	86,22	176,17	114,39	28,47
15 Minuten, 8 Gray	95,55	65,00	148,95	65,57	516,62	103,35	42,23
	38,50	70,97	181,88	77,29	377,08	110,05	62,29
60 Minuten, 0 Gray	190,35	110,60	136,27	82,30	168,16	138,34	28,83
	184,20	171,42	131,72	111,40	284,23	162,45	27,36
60 Minuten, 2 Gray	83,80	75,46	88,58	111,82	179,87	94,74	14,99
	65,46	113,22	83,11	173,41	317,48	123,25	45,98

0,1 µg/ml ZnO-NP Konzentration							
Inkubations- zeit, Bestrahlungs- dosis	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Mean (n=3)	SD
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle		
	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP	ZnO-NP		
Alle Angaben in % (<i>Kursive Werte wurden verworfen</i>)							
60 Minuten, 4 Gray	176,68	137,15	159,30	121,55	274,76	157,71	19,81
	324,67	173,05	127,86	102,78	278,44	193,12	77,27
60 Minuten, 8 Gray	304,00	92,44	176,33	142,59	419,95	246,29	151,34
	286,31	135,90	377,58	258,19	695,53	307,36	62,41
240 Minuten, 0 Gray	283,00	16,6	185,35	130,32	259,00	191,57	64,58
	262,85	29,92	372,05	212,73	452,79	282,54	81,46
240 Minuten, 2 Gray	63,65	164,25	140,35	169,02	414,23	157,87	15,36
	131,68	201,39	220,94	233,45	589,23	218,59	16,16
240 Minuten, 4 Gray	338,22	96,46	133,10	95,29	286,08	171,88	100,58
	328,24	275,61	295,02	181,02	414,13	299,62	26,61
240 Minuten, 8 Gray	425,23	221,30	406,88	195,31	749,40	351,14	112,82
	275,55	363,75	77,36	392,54	670,07	343,94	60,96

Tabelle 10 Bonferroni-Test 4.1.2

	p-Werte
0 Gray vs. 2 Gray	0,654
0 Gray vs. 4 Gray	0,003
0 Gray vs. 8 Gray	0,000
2 Gray vs. 4 Gray	0,368
2 Gray vs. 8 Gray	0,008
4 Gray vs. 8 Gray	1,000

Kruskal-WallisTest: $p < 0,001$

Tabelle 11 Bonferroni-Test 4.1.3

	p-Werte
Kontrolle vs. 0,1 µg/ml	1,000
Kontrolle vs. 10 µg/ml	0,000
Kontrolle vs. 100 µg/ml	0,001
0,1 µg/ml vs. 10 µg/ml	0,000
0,1 µg/ml vs. 100 µg/ml	0,0001
10 µg/ml vs. 100 µg/ml	0,000

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$

Tabelle 12 Bonferroni-Test 4.1.4

Werte für 240 Minuten	p-Werte
0 Gray 0,1 µg/ml vs. 100 µg/ml	0,016
2 Gray 0,1 µg/ml vs. 100 µg/ml	0,035
4 Gray 0,1 µg/ml vs. 100 µg/ml	0,001
8 Gray 0,1 µg/ml vs. 100 µg/ml	0,089

Tabelle 13 Kruskal-Wallis-Test 4.1.4

Kruskal-Wallis-Test	p-Werte
0 Gray	0,0083
2 Gray	0,0065
4 Gray	0,0051
8 Gray	0,0152

Tabelle 14 T-Tests gegen die Kontrolle 4.1.2-4.1.8

T-Test gegen die Kontrolle (0 Minuten, 0 Gray, keine ZnO-NP)	p-Werte
0,1 µg/ml, 0 Gray, 0 Minuten	0,1009
10 µg/ml, 0 Gray, 0 Minuten	0,6889
100 µg/ml, 0 Gray, 0 Minuten	0,000
0 µg/ml, 2 Gray, 0 Minuten	0,0060
0,1 µg/ml, 2 Gray, 0 Minuten	0,6347
10 µg/ml, 2 Gray, 0 Minuten	0,000
100 µg/ml, 2 Gray, 0 Minuten	0,0182
0 µg/ml, 4 Gray, 0 Minuten	0,0049
0,1 µg/ml, 4 Gray, 0 Minuten	0,2604
10 µg/ml, 4 Gray, 0 Minuten	0,000
100 µg/ml, 4 Gray, 0 Minuten	0,0190
0 µg/ml, 8 Gray, 0 Minuten	0,008
0,1 µg/ml, 8 Gray, 0 Minuten	0,000
10 µg/ml, 8 Gray, 0 Minuten	0,002
100 µg/ml, 8 Gray, 0 Minuten	0,4945
0 µg/ml, 0 Gray, 15 Minuten	0,5209
0,1 µg/ml, 0 Gray, 15 Minuten	0,02424
10 µg/ml, 0 Gray, 15 Minuten	0,000
100 µg/ml, 0 Gray, 15 Minuten	0,000
0 µg/ml, 2 Gray, 15 Minuten	0,0592
0,1 µg/ml, 2 Gray, 15 Minuten	0,000
10 µg/ml, 2 Gray, 15 Minuten	0,0066

T-Test gegen die Kontrolle (0 Minuten, 0 Gray, keine ZnO-NP)	p-Werte
100 µg/ml, 2 Gray, 15 Minuten	0,2354
0 µg/ml, 4 Gray, 15 Minuten	0,0897
0,1 µg/ml, 4 Gray, 15 Minuten	0,1209
10 µg/ml, 4 Gray, 15 Minuten	0,0013
100 µg/ml, 4 Gray, 15 Minuten	0,005
0 µg/ml, 8 Gray, 15 Minuten	0,0095
0,1 µg/ml, 8 Gray, 15 Minuten	0,6003
10 µg/ml, 8 Gray, 15 Minuten	0,0010
100 µg/ml, 8 Gray, 15 Minuten	0,3095
0 µg/ml, 0 Gray, 60 Minuten	0,0963
0,1 µg/ml, 0 Gray, 60 Minuten	0,000
10 µg/ml, 0 Gray, 60 Minuten	0,000
100 µg/ml, 0 Gray, 60 Minuten	0,0683
0 µg/ml, 2 Gray, 60 Minuten	0,0607
0,1 µg/ml, 2 Gray, 60 Minuten	0,1207
10 µg/ml, 2 Gray, 60 Minuten	0,0009
100 µg/ml, 2 Gray, 60 Minuten	0,0618
0 µg/ml, 4 Gray, 60 Minuten	0,0260
0,1 µg/ml, 4 Gray, 60 Minuten	0,0024
10 µg/ml, 4 Gray, 60 Minuten	0,000
100 µg/ml, 4 Gray, 60 Minuten	0,0033
0 µg/ml, 8 Gray, 60 Minuten	0,0118

T-Test gegen die Kontrolle (0 Minuten, 0 Gray, keine ZnO-NP)	p-Werte
0,1 µg/ml, 8 Gray, 60 Minuten	0,000
10 µg/ml, 8 Gray, 60 Minuten	0,000
100 µg/ml, 8 Gray, 60 Minuten	0,2701
0 µg/ml, 0 Gray, 240 Minuten	0,0368
0,1 µg/ml, 0 Gray, 240 Minuten	0,000
10 µg/ml, 0 Gray, 240 Minuten	0,000
100 µg/ml, 0 Gray, 240 Minuten	0,0335
0 µg/ml, 2 Gray, 240 Minuten	0,0597
0,1 µg/ml, 2 Gray, 240 Minuten	0,000
10 µg/ml, 2 Gray, 240 Minuten	0,000
100 µg/ml, 2 Gray, 240 Minuten	0,000
0 µg/ml, 4 Gray, 240 Minuten	0,0180
0,1 µg/ml, 4 Gray, 240 Minuten	0,000
10 µg/ml, 4 Gray, 240 Minuten	0,000
100 µg/ml, 4 Gray, 240 Minuten	0,000
0 µg/ml, 8 Gray, 240 Minuten	0,0355
0,1 µg/ml, 8 Gray, 240 Minuten	0,000
10 µg/ml, 8 Gray, 240 Minuten	0,000
100 µg/ml, 8 Gray, 240 Minuten	0,0067

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich [REDACTED] dafür danken, dass er mir ermöglichte, dieses wichtige Thema zu bearbeiten im Rahmen dessen ich viele interessante Methoden erlernen durfte. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für die gute wissenschaftliche Betreuung und die Korrektur dieser Dissertation bedanken.

Ein großer Dank gilt auch [REDACTED] für die schnelle Durchsicht dieser Arbeit und ihren hilfreichen Anregungen. Auch danke ich [REDACTED], der den Beginn dieser Arbeit betreute und insbesondere bei der Methodenerlernung immer eine Lösung parat hatte. Für die geduldige und gewissenhafte Einarbeitung möchte ich mich auch bei [REDACTED] und [REDACTED] bedanken.

Bei [REDACTED] möchte ich mich für den freundschaftlichen Beistand und die schöne Zeit im Labor bedanken.

[REDACTED] gilt ein besonderer Dank für seine Unterstützung und motivierenden Worte, die ihren Zweck stets erfüllten.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt.

Lebenslauf

