

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig–Maximilians–Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. Wolfram Breuer

Angefertigt im
Walther–Straub–Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig–Maximilians–Universität München
(Prof. Dr. Elmar Richter)

Etablierung eines Systems zur Erforschung der Toxikologie von Nanopartikeln

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig–Maximilians–Universität München

von
Nadine Gabriele Haberl
aus
Weiden in der Oberpfalz

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig–Maximilians–Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Breuer
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen		III
1	EINLEITUNG	- 1 -
2	LITERATURÜBERSICHT ZUM THEMA	- 3 -
2.1	Precision-cut Lung Slices und deren Einordnung in weitere in vitro-/in vivo-Methoden im Hinblick auf toxikologische Testung	- 3 -
2.2	Geschichte und Möglichkeiten der Precision-cut Lung Slices	- 5 -
2.3	Precision-cut Lung Slices im Hinblick auf die Reduktion von Tierversuchen	- 10 -
2.4	Nanopartikel	- 12 -
2.5	Nanotechnologie	- 13 -
2.6	Toxikologie von Nanopartikeln	- 16 -
2.7	Zielsetzung der Arbeit	- 19 -
3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	- 20 -
3.1	Tiere	- 20 -
3.2	Material	- 20 -
3.2.1	Geräte	- 20 -
3.2.2	Software	- 21 -
3.2.3	Verbrauchsmaterial	- 21 -
3.2.4	Medium, Agarose	- 22 -
3.2.5	Reagenzien	- 23 -
3.2.6	Farbstoff	- 23 -
3.2.7	Nanopartikel	- 24 -
3.3	Methoden	- 25 -
3.3.1	Präparation der Lungenschnitte aus Ratten	- 25 -
3.3.2	Inkubation der Lungenschnitte mit Lipopolysaccharid (LPS)	- 26 -
3.3.3	Proteinbiochemische und gravimetrische Methoden	- 27 -
3.3.3.1	Messung der Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität	- 27 -
3.3.3.2	WST1-Assay	- 28 -
3.3.3.3	Quantitative Proteinbestimmung durch BCA-Assay	- 29 -
3.3.3.4	ELISA	- 30 -
3.3.3.5	Bestimmung des Gewichts der PCLS	- 31 -
3.3.4	Methode zur Instillation der Nanopartikel	- 32 -
3.4	Statistische Auswertung	- 33 -
4	ERGEBNISSE	- 34 -
4.1	Etablierung des Systems zur Herstellung von PCLS	- 34 -
4.1.1	Bestimmung der Vitalität bei wechselnden Kulturbedingungen und Schnitzzahl	- 34 -
4.1.2	Abhängigkeit der Vitalität von steigenden LPS-Konzentrationen	- 35 -
4.1.3	Versuchsumstellung und Einführung eines weiteren Vitalitätstests	- 35 -
4.1.4	Vitalitätsbestimmung über einen Zeitraum von 0 bis 72 Stunden	- 38 -

4.1.5	Bestimmung des Gewichts und Proteingehalts der PCLS	- 38 -
4.2	Bakterielles LPS als Auslöser einer lokalen Immunreaktion in den PCLS	- 40 -
4.2.1	Bestimmung der durch LPS verursachten Zytokinausschüttung	- 40 -
4.3	Intratracheale Instillation von Nanopartikeln	- 42 -
4.3.1	Charakterisierung der Nanopartikel	- 42 -
4.3.2	Vitalitätsmessung	- 43 -
4.3.3	Bestimmung der Zytokinausschüttung	- 44 -
4.3.4	Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der Zytokinausschüttung	- 46 -
5	DISKUSSION	- 48 -
5.1	Beurteilung der Methode zur Herstellung und Vitalerhaltung der PCLS	- 48 -
5.1.1	Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen	- 48 -
5.1.2	Einführung eines weiteren Vitalitätstestes	- 52 -
5.1.3	Bestimmung der Vitalität über einen Zeitraum von mehreren Tagen	- 53 -
5.1.4	Bewertung der Ergebnisse aus der Protein- und Gewichtsbestimmung	- 56 -
5.1.5	LPS als Auslöser einer lokalen Immunreaktion in den PCLS	- 56 -
5.1.5.1	TNF- α	- 57 -
5.1.5.2	IL-8	- 58 -
5.2	PCLS und deren Reaktion auf Nanopartikel	- 59 -
5.2.1	Beurteilung der Methode der intratrachealen Instillation der Nanopartikel	- 60 -
5.2.2	Bestimmung der Vitalität anhand der LDH-Freisetzung und WST1-Reduktion	- 60 -
5.2.3	Ag-Nanopartikel und deren Einfluss auf die Zytokinausschüttung	- 63 -
5.2.3.1	TNF- α	- 63 -
5.2.3.2	IL-8	- 64 -
5.3	Schlussfolgerung	- 65 -
6	ZUSAMMENFASSUNG	- 66 -
7	SUMMARY	- 67 -
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 68 -
9	LITERATURVERZEICHNIS	- 70 -
	Danksagung	- 76 -

Abkürzungen

ASS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
Calcein-AM	bis-Acetoxy-methylester von Calcein
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
DMEM/F-12 Ham	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham
EBBS	Earle's Balanced Salt Solution
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
EthD-1	Ethidiumhomodimer-1
GI	Gastro-Intestinaltrakt
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
IL-8	Interleukin-8
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MW	(arithmetischer) Mittelwert
Nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCLS	Precision-Cut Lung Slices
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Rpm	Rounds per million
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UDD	Wert unterhalb des Detektionslimits
UFP	Ultrafeine Partikel

1 Einleitung

„There's a plenty of room at the bottom.“ So beginnt der Physiker und Nobelpreisträger Richard Feynman 1959 seine Rede, in der er das große Potenzial, das in der Nanotechnologie steckt, beschreibt. Seit dieser Rede, die als Begründung der Nanoforschung gilt, hat sich viel getan. Die Nanotechnologie hat sich zu einer der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts entwickelt.

Ihre Möglichkeiten liegen in erster Linie in den Eigenschaften von Nanopartikeln begründet. Nanopartikel sind Teilchen, deren Durchmesser kleiner als 100 nm ist. Beim Übergang in den nanoskaligen Bereich ändern sich die physikalischen Eigenschaften eines Stoffes. Damit können Nanopartikel gegenüber Mikropartikeln des gleichen Materials beispielsweise einen anderen Schmelzpunkt, Löslichkeit oder Leitfähigkeit besitzen. Diese Eigenschaften kommen dadurch zu Stande, dass Nanopartikel im Vergleich zu den entsprechenden Mikropartikeln bei gleicher Masse eine größere Oberfläche besitzen, was zu veränderten katalytischen Eigenschaften und Quantenphänomenen führt.

Dadurch haben immer mehr Produkte aus der Nanotechnologie in das alltägliche Leben Einzug gehalten: in Kosmetika, in Sonnencremes, in Wundauflagen, in Wandfarben; sogar Fenster werden mit Nanopartikeln beschichtet.

In Deutschland als einem der Spitzenstandorte wird die Nanotechnologie staatlich unterstützt. So stellte das Bundesministerium für Bildung und Forschung Anfang 2011 den „Aktionsplan Nanotechnologie 2015“ vor (http://www.bmbf.de/pub/aktionsplan_nanotechnologie.pdf). Darin werden die Ziele der Bundesregierung klar formuliert: mit Nanotechnologie zu Wachstum und Innovation in Deutschland beizutragen, Nanotechnologie sicher und nachhaltig zu gestalten, ihre Potenziale für Bildung und Forschung zu nutzen und zur Lösung globaler Herausforderungen heranzuziehen.

Das Ziel, die Nanotechnologie sicher und nachhaltig zu gestalten, liegt darin begründet, dass sich aus ihren Möglichkeiten auch Gefahren ergeben können, deren Ausmaß bisher noch nicht genau abgeschätzt werden kann. Wie verhalten sich Nanopartikel im menschlichen Körper? Wie in der Umwelt? Wie können sie, einmal in die Umwelt gelangt, wieder beseitigt werden? Aus diesem Grund ist es das Ziel, in der Forschung der Nanotoxikologie eine Grundlage zu schaffen, von der aus sich gesicherte Aussagen über das Gefährdungspotenzial von Nanopartikeln treffen lassen.

Im Hinblick auf die toxikologische Testung von Nanopartikeln kann die Etablierung eines neuen Testsystems eine große Rolle spielen. Erkenntnisse über die Toxizität von Nanopartikeln anhand von *in vitro*- und *in vivo*-Studien liegen bereits vor. Um einerseits ein komplexeres Testsystem als Zellkulturen heranzuziehen und andererseits die Testung *in vivo* am lebenden Tier zu umgehen, bietet sich die Anwendung von Lungenschnitten (Precision-cut Lung Slices) als zusätzliche Möglichkeit an.

Ihr Nutzen in der toxikologischen Testung von Nanopartikeln soll in der vorliegenden Arbeit näher erläutert werden.

2 Literaturübersicht zum Thema

2.1 *Precision-cut Lung Slices und deren Einordnung in weitere in vitro-/in vivo-Methoden im Hinblick auf toxikologische Testung*

In der toxikologischen Testung ist es möglich, sich unterschiedlicher Systeme zu bedienen. Das Spektrum umfasst dabei sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Methoden, die sich hinsichtlich ihrer Komplexität sowie in ihrer Spezifität unterscheiden (Abbildung 1).



Abbildung 1: Übersicht toxikologischer *in vivo*- und *in vitro*-Testsysteme in Hinblick auf deren Komplexität und Spezifität

Im Hinblick auf Komplexität stehen *in vivo*-Methoden an erster Stelle. Es ist gesetzlich vorgeschrieben, dass vor der Zulassung von Medikamenten für den Menschen toxikologische Untersuchungen an Versuchstieren durchgeführt werden. Geprüft wird dabei die akute Toxizität eines Medikaments, die chronische Toxizität, die kanzerogene und die teratogene Wirkung. Dafür werden vor allem Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen aus Inzuchtstämmen verwendet. In einigen Fällen werden auch andere Säugetiere herangezogen [1]. Untersucht werden insbesondere die Organtoxizität von Fremdstoffen anhand von klinischen Parametern, Enzymaktivitäten sowie dem Gehalt an Gewebehormonen und Wachstumsfaktoren im Blut oder den entsprechenden Zielgeweben [2].

Um physiologische Vorgänge zu verstehen und daraus toxikologische Eigenschaften von Substanzen abzuleiten, können isolierte Organe betrachtet werden. Diese weisen eine höhere Spezifität als der Gesamtorganismus auf. Die dem Tier nach Tötung chirurgisch entnommenen Organe können durch Perfusion eine bestimmte Zeit vital gehalten werden. Ein isoliertes Herz von Vertebraten schlägt zum Beispiel weiter, wenn man es in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert, obwohl keine neuronalen Signale am Sinusknoten, dem Schrittmacher des Herzens, mehr eintreffen. Anhand des Volumens des Herzausstoßes, der Fließgeschwindigkeit der Kochsalzlösung und der mechanischen Bewegung des Herzens lassen sich Auswirkungen nach Reizung mit Pharmaka oder Hormonen untersuchen [3].

Gewebe und Gewebeschnitte lassen sich zwischen isolierten Organen und der Zellkultur einordnen. Hierbei wird nicht nur eine einzelne Zelle betrachtet, sondern ein gesamter Zellverband, der sehr nahe die physiologischen Eigenschaften eines komplexen Organs widerspiegeln kann. Anhand von Lungenschnitten (engl. Precision-cut Lung Slices, PCLS) werden die Möglichkeiten von Gewebeschnitten im Kapitel 2.2 näher erklärt.

In der Annahme, dass sich alle toxikologischen Wirkungen letztlich auf zellulärer Ebene abspielen, werden toxikologische Tests auch an Zelllinien durchgeführt. So werden etwa zum Test auf Zytotoxizität Zellen mit einem Tetrazoliumsalz inkubiert. Die mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen wandeln dieses Salz in Formazan um. Je mehr lebende Zellen also vorhanden sind, desto mehr Formazan wird gebildet, welches photometrisch bestimmt werden kann. Auswirkungen einer Prüfsubstanz, welche *in vitro* mit den Zellen inkubiert wurden, können so im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt werden [1].

Toxikologische Untersuchungen mit der höchsten Spezifität können an Rezeptoren und Enzymen durchgeführt werden. Binden an Rezeptoren ihre entsprechenden Agonisten, kann es zur Induktion einer Signalkaskade kommen. Binden Testsubstanzen an die Rezeptoren oder an die spezifischen Agonisten, können Veränderungen in der Signalkaskade beobachtet werden. Zudem ist es möglich, Enzyme mit Testsubstanzen zu inkubieren und auf Funktionsänderung zu untersuchen. Hierzu zählt beispielsweise die Hemmung der Acetylcholinesterase durch organische Phosphorsäureester [2].

2.2 *Geschichte und Möglichkeiten der Precision-cut Lung Slices*

Die Geschichte und die Möglichkeiten von Gewebeschnitten vor allem im Bereich der Pneumologie sollen anhand von Precision-cut Lung Slices (PCLS) beschrieben werden.

Die grundlegende Entwicklung von Gewebeschnitten fand zunächst mit anderen Organen als der Lunge statt: 1980 etablierten Krumdieck et al. [4] ein handbetriebenes Mikrotom. Ihre Vorgabe war ein Instrument herzustellen, mit dem Gewebeschnitte in kurzer Zeit, mit reproduzierbaren Ergebnissen, möglichst geringem Gewebetrauma und in einer kontrollierten Umgebung hergestellt werden konnten. Das aus Acryl gefertigte Mikrotom konnte in ein mit Medium gefülltes Bad gestellt werden, um so die Schnitte schon während des Schneidevorgangs mit Nährstoffen zu versorgen. Ein aus der Leber gestanztes Gewebestück konnte über eine Ladevorrichtung in das Mikrotom gebracht werden, wobei ein darunter befindliches Messer durch Vor- und Zurückbewegen der Messerhalterung dünne Schnitte anfertigte. Durch Verstellen der Position des Messers zur Ladevorrichtung wurden Gewebeschnitte mit einer Stärke von 160-640 μm hergestellt. Die Ausbeute lag bei 10-12 Schnitten pro Minute und anhand von histologischen Untersuchungen zeigte sich eine gut erhaltene Gewebearchitektur. Schnitte aus Gehirn, Niere, Milz und Herz konnten mit dieser Methode ebenfalls hergestellt werden.

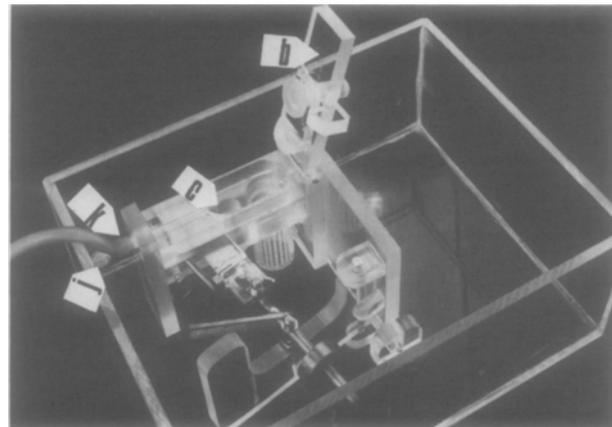


Abbildung 2: Handbetriebenes Mikrotom aus dem Jahr 1980 nach Krumdieck et al. [4]

Gewebeschnitte aus Lungen herzustellen erwies sich als erheblich schwieriger, da sich das Lungengewebe aufgrund seiner puffigen Konsistenz durch eine weitaus weichere Beschaffenheit auszeichnet. Die Wissenschaftler Placke und Fisher umgingen das Problem, indem sie ein Gemisch aus Agarose und Kulturmedium in Rattenlungen füllten [5]. Nachdem die Agaroselösung ausgekühlt war, schnitten sie mit einem Skalpell die Lungen in 1-2 mm dicke Schnitte. Ihre Ausbeute an Schnitten pro Rattenlunge lag bei 20-25 Stück.

In ihrer Publikation von 1994 vereinten Fisher et al. [6] die beiden oben aufgeführten Methoden. Sie benutzen zum einen den *Krumdieck Tissue Slicer* und zum anderen füllten sie die Lunge mit Agarose. Dazu wurden Humanlungen mit 2-4 Liter eines Gemisches aus Agarose und Kulturmedium gefüllt. Nachdem die Lungen 30-60 Minuten zur Erstarrung der Agarose auf Eis gelagert wurden, wurden Gewebezylinder ausgestanzt, aus denen 500 µm dicke PCLS mit Hilfe des *Krumdieck Tissue Slicer* hergestellt werden konnten. Auf diese Weise erhielt man mehrere tausend Schnitte aus einer menschlichen Lunge. Durch Vorinkubation der Schnitte bei 37 °C löst sich die Agarose wieder auf und kann durch Mediumwechsel entfernt werden. Um die Eignung der PCLS für toxikologische Fragestellungen zu testen, wurden die Lungenschnitte mit den lungentoxischen Substanzen Acrolein und Nitrofurantoin kultiviert. Die Vitalität wurde anhand der Proteinsynthese und des Gehalts an Sulfhydrylgruppen, verglichen mit unbehandelten Kontrollschnitten, bestimmt. Die lungentoxischen Substanzen bewirkten eine eindeutige Verringerung der Vitalität im Vergleich zu den Kontrollschnitten. Die Autoren folgerten daraus, dass PCLS ein funktionierendes *in vitro*-System für toxikologische Lungentests darstellen.

Martin et al. [7] gehen in ihrer Publikation 1996 auf den Nutzen von PCLS in pharmakologischen und funktionellen Tests ein. Sie behandelten ihre Schnitte mit Methacholin und untersuchten den bronchokonstriktorisches Effekt mittels Videomikroskopie. Sie stellten aus mit Agarose gefüllten Rattenlungen ca. 250 µm dicke Schnitte her, die in einer unter einem Mikroskop befindlichen Inkubationskammer kultiviert wurden. Zur Betrachtung wurden Schnitte herangezogen, die nur einen Luftweg enthielten, in denen die Luftwege frei von Agarose und Debris waren und bei denen zu erwarten war, dass der Zilienschlag des Flimmerepithels intakt war. Der Durchmesser der Luftwege von Schnitten, die nur in Medium inkubiert wurden, wurde als 100% festgesetzt. Nachdem die Inkubationskammer mit Methacholin geflutet worden war, wurden jede Minute innerhalb eines Zeitraumes von 10 Minuten Aufnahmen der Schnitte mittels einer Videokamera gemacht. Der Durchmesser der Luftwege wurde mittels eines Bild-Analyse-Programms analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine zu erwartende Konstriktion der Luftwege, die sich mit zunehmendem Methacholingehalt verstärkte. Aus den Ergebnissen schlossen die Autoren, dass die PCLS ein gutes System darstellen, Bronchokonstriktion auslösende Substanzen schnell zu screenen, gerade im Hinblick darauf, dass aus einer Rattenlunge eine Vielzahl von Schnitten hergestellt und verschiedene Substanzen gleichzeitig getestet werden können.

Die Möglichkeit, in PCLS Bronchokonstriktion videomikroskopisch nachzuvollziehen, wurde in weiteren Studien vor allem im Bezug auf die Entstehung und die Pathomechanismen von Asthma genutzt. So betrachteten Wohlsen et al. [8] den bronchokonstriktorischen Effekt von Ovalbumin in PCLS aus Rattenlungen. Dazu wurde Serum aus mit Ovalbumin sensibilisierten Tieren zur passiven Sensibilisierung 16 Stunden lang auf PCLS gegeben, die aus unbehandelten Ratten stammten. Es zeigte sich, dass sowohl das Ausmaß und die Geschwindigkeit des konstriktorischen Effekts in den kleineren Luftwegen zunahm und damit auch die kleinen Luftwege am asthmatischen Geschehen beteiligt sind. Den gleichen Effekt fanden Wohlsen et al. [9] auch bei PCLS aus menschlichen Lungen. Hier wurden die PCLS über Nacht mit Serum von gegen Graspollen allergischen Individuen inkubiert. Die Zugabe von Graspollenextrakt führte zu einer so genannten "Frühen allergischen Antwort". Diese zeigte sich in einer Zunahme der Bronchokonstriktion je kleiner die Luftwege wurden.

In einer weiteren Studie zeigten Henjakovic et al. [10], dass auch PCLS von Mäusen die Möglichkeit bieten, allergische Reaktionen anhand von Bronchokonstriktion darzustellen. Dazu wurden Mäuse mit den Chemikalien Benzol-1,2,4-tricarbonsäure-1,2-anhydrid und 2,4-Dinitrochlorbenzol dermal sensibilisiert. Hierauf wurden zum einen die Mäuse mit den beiden Chemikalien als Aerosol exponiert und mithilfe der invasiven Lungenfunktionsmessung der Lungenwiderstand gemessen. Zum anderen wurden PCLS aus sensibilisierten Mäusen mit den beiden Chemikalien inkubiert. Bei der Lungenfunktionsmessung wurde die Bronchokonstriktion als prozentuale Zunahme des Lungenwiderstandes und bei den PCLS als prozentuale Zunahme der maximalen Luftwegskontraktion angegeben. Wegen der vergleichbaren Ergebnisse schlossen die Autoren darauf, dass PCLS als *in vitro*-Methode geeignet sind, den sensibilisierenden Effekt von organischen Chemikalien auf die Luftwege darzustellen.

Wohlsen et al. [11] zeigten eine weitere Möglichkeit, PCLS in der Erforschung von Lungenkrankheiten zu nutzen. Bei Erkrankungen wie Asthma, COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankungen) oder der cystischen Fibrose kommt es zu einer Abnahme der mukoziliären Clearance aufgrund einer Beeinträchtigung des Flimmerepithels durch Sezernierung großer Mengen an viskösem Mukus. Der Schlag des Flimmerepithels wird vornehmlich über cAMP als sekundärem Botenstoff reguliert. Die Forscher betrachteten unterschiedliche Substanzen, die cAMP erhöhen, indem sie entweder dessen Bildung verstärkten (β_2 -Adrenorezeptor Agonist Terbutalin oder der Adenylcyclase-Aktivator Forskolin) oder seinen Abbau durch Phosphodiesterase-

hemmer wie Rolipram und Roflumilast verlangsamen. Ihre Ergebnisse zeigten sowohl eine zeit- als auch konzentrationsabhängige Erhöhung des ziliären Flimmerschlags, was auf eine gute Einsetzbarkeit der Medikamente für die Behandlung der erwähnten Erkrankungen hindeutet.

Auch im Bereich der Lungenkrebsforschung konnten PLCS erfolgreich verwendet werden. Anhand von Precision-cut Tissue Slices aus Lunge, Leber und Nieren von Hamstern untersuchten Richter et al. [12] den Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) sowie dessen Metaboliten 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). NNK entsteht während der Fermentierung von Tabakblättern durch Nitrosierung des Nikotins. Es gilt als eines der wichtigsten Kanzerogene im Tabak oder Tabakrauch und erzeugte in allen bisher untersuchten Tierspezies Lungenkrebs, wobei der genaue Wirkmechanismus der Kanzerogenese letztendlich noch nicht genau geklärt ist. NNK kann im Körper auf verschiedene Arten metabolisiert werden: Die Carbonylreduktion führt zu NNAL. Durch α -Hydroxylierung von NNK und NNAL entstehen Zwischenprodukte, welche die DNA durch Methylierung und Pyridyloxobutylierung schädigen. Des Weiteren können NNK und NNAL über Pyridyl N-Oxidierung und Glukuronidierung entgiftet werden. In der Studie von Richter et al. [12] sollten gewebespezifische Unterschiede im NNK-Metabolismus anhand der Gewebeschnitte gezeigt werden. Die Leberschnitte (8 ± 1 mg) wurden mittels eines Vibrotoms und die Lungen- und Nierenschnitte ($3 \pm 0,5$ mg bzw. $5 \pm 0,6$ mg) mit einem Skalpell hergestellt. Die Schnitte wurden mit 0,6 mL Krebs-Henseleit-Puffer eine halbe Stunde vorinkubiert und anschließend die beiden Testsubstanzen [$5\text{-}^3\text{H}$]NNK und [$5\text{-}^3\text{H}$]NNAL dem Medium zugegeben. Es wurden 13 Konzentrationen (0,03-250 μM) der Substanzen getestet. Die Kultivierung der Schnitte erfolgte über sechs Stunden im Brutschrank. Danach wurde der Gewebekulturüberstand abgenommen und zentrifugiert. Art und Menge der entstandenen Metaboliten wurden durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit on-line Radioaktivitätsdetektion ermittelt. Die Metabolitenzuordnung erfolgte durch parallele Injektion von Referenzsubstanzen, deren Retentionszeit durch UV-Detektion bei 234 und 254 nm bestimmt wurden. Die Autoren fanden heraus, dass in der Lunge, die ein Zielorgan für die NNK-vermittelte Kanzerogenese im Tierversuch ist, der NNK-Metabolismus mit 23% relativ niedrig war. 13-31% wurden davon durch α -Hydroxylierung zu den untersuchten Zwischenprodukten metabolisiert. Die größte Metabolisierungsrate von NNK wurde mit 80% in der Leber

gefunden, die eigentlich kein Zielorgan für den NNK-Metabolismus darstellt. Die Carbonylreduktion zu NNAL war am größten in der Niere (94-100%), gefolgt von der Leber (59-79%) und der Lunge (47-81%). Damit konnte gezeigt werden, dass die Precision-cut Tissue Slices ein nützliches *in vitro*-Testsystem darstellen, um gewebespezifische Unterschiede im Metabolismus der tabakspezifischen Nitrosamine aufzuzeigen.

In einer weiteren Studie von Richter et al. [13] wurden mit dem gleichen Versuchsaufbau speziesspezifische Unterschiede im Metabolismus von NNK in Lungenschnitten dargestellt. In Ergänzung zu den bereits untersuchten Hamstern wurden jetzt auch Schnitte von Lungen aus Mäusen und Ratten sowie von tumorfreiem menschlichem Gewebe, welches im Rahmen von Lungenoperationen erhalten wurde, mit NNK inkubiert. Bei den Lungenschnitten aus Mäusen zeigte sich eine erhöhte Carbonylreduktion zu NNAL mit steigenden Substratkonzentrationen, wobei die Endprodukte der α -Hydroxylierung und der N-Oxidation konzentrationsabhängig abnahmen. Bei den Ratten zeigte sich keine Konzentrationsabhängigkeit der drei Metabolisierungswege. Bei den Hamstern hingegen wurde NNK im Vergleich zu den anderen Nagern deutlich mehr zu NNAL transformiert. Beim menschlichen Lungengewebe war die Reduktion von NNK zu NNAL jedoch am stärksten ausgeprägt, die Aktivierung durch α -Hydroxylierung war sehr viel geringer als bei den Nagetieren. Dies zeigt nach Ansicht der Autoren, dass Ergebnisse zur Kanzerogenese von NNK bei Nagetieren nur bedingt auf den Menschen zu übertragen sind.

Zusammenfassend können folgende wichtige Parameter der PCLS beschrieben werden:

- Die Schnitte behalten die Organstruktur im Wesentlichen bei
- Es sind alle Zelltypen eines Organs vorhanden
- Die interzelluläre Kommunikation bleibt erhalten
- Die Zellen werden nur minimal geschädigt
- Aus einem Organ sind viele Schnitte erhältlich, so dass verschiedene Substanzen in einem Organ getestet und zugleich unbehandelte Kontrollschnitte angefertigt werden können
- Der direkte Vergleich zwischen verschiedenen Spezies wird möglich

- Die PCLS stellen ein *in vitro*-System dar, das die *in vivo*-Situation widerspiegeln kann
- Die Möglichkeit, eine Vielzahl von Schnitten aus einer tierischen Lunge herzustellen, führt zu einer Einsparung von Versuchstieren

Demgegenüber müssen auch die Nachteile der PCLS gestellt werden:

- Das Gerät zur Herstellung der Schnitte, der *Krumdieck-Tissue Slicer*, ist relativ teuer in der Anschaffung
- Der Stofftransport erfolgt nur durch Diffusion
- Zellen im Inneren der Schnitte sind weniger exponiert als solche am Rand
- Es sind je nach Versuchsaufbau auch nicht relevante Zelltypen enthalten
- Die Umsatzkinetik ist im Vergleich zu Zellkulturen niedriger

Auch wenn die Methode der PCLS einige Nachteile besitzt, sollte in der vorliegenden Arbeit ihr Nutzen zur toxikologischen Testung von Nanopartikeln untersucht werden.

2.3 Precision-cut Lung Slices im Hinblick auf die Reduktion von Tierversuchen

Im Jahr 2009 wurden nach aktueller Veröffentlichung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2,8 Millionen Wirbeltiere für Versuche und andere wissenschaftliche Projekte eingesetzt (<http://www.BMELV.de>). Bei über 87% handelte es sich um Nagetiere, vornehmlich Mäuse und Ratten. 2,2% der Tiere waren Kaninchen, 5,2% Fische, 3,7% Vögel. Hunde wurden in 0,1% und Affen in 0,08% der Tierversuche verwendet. In der Gesamtzahl sind sämtliche Wirbeltiere, die zum Einsatz kamen, berücksichtigt. So zum Beispiel auch solche, bei denen lediglich Blut abgenommen wurde.

1959 beschreiben Russel und Burch [14] zum ersten Mal das Prinzip der „3 R“. Die „3 R“ beziehen sich auf die Begriffe „Replacement“, „Reduction“ und „Refinement“. Seither gilt ihr Buch "*The Principles of Humane Experimental Technique*" als „Bibel“ der Alternativmethoden zum Tierversuch.

Es sind demnach Alternativmethoden gemeint, die entweder einen vollständigen Verzicht auf Nutzung von Tieren (Replacement) oder, falls dies nicht möglich ist,

zumindest eine Reduzierung der Anzahl der verwendeten Tiere (Reduction) bzw. eine Minderung der Belastung der Tiere (Refinement) beinhalten.

In Deutschland wird die Umsetzung der „3 R“ sogar gesetzlich kontrolliert: 1989 wurde im Bundesinstitut für Risikobewertung eine Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) gegründet. Ziel dieser wissenschaftlichen Institution ist es, insbesondere gesetzlich vorgeschriebene Tierversuche durch alternative Untersuchungsmethoden zu ersetzen, die Zahl der Versuchstiere auf ein unerlässliches Maß zu reduzieren und Leiden und Schmerzen der Versuchstiere im Experiment zu vermindern. ZEBET soll die Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch dokumentieren, bewerten, ihre Anerkennung national und international empfehlen und auch durchsetzen (<http://www.bfr.bund.de/cd/1433>). Weitere Institutionen, die Ersatzmethoden beurteilen und bewerten, sind das „European Centre for the Validation of Alternative Methods“ (ECVAM; <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>) und der „Fund of the Replacement of Animals in Medical Experiments“ (FRAME; <http://frame.org.uk/index.php>).

Es gehört auch zur Aufgabe von ZEBET, Informationen über Alternativmethoden bereitzustellen. Im Rahmen dessen wurde eine Datenbank, AnimAlt-ZEBET, etabliert [15], die vor allem darauf ausgerichtet ist, die im Tierschutzgesetz geforderte Prüfung auf Unerlässlichkeit von Tierversuchen mit Informationen über mögliche Alternativmethoden zu unterstützen. In der Datenbank werden ausschließlich Methoden aufgeführt, die mindestens einer Anforderung der „3 R“ genügen.

Gibt man in die Datenbank das Schlagwort „Precision-cut Lung Slices“ ein, erhält man einen Review (<http://www.dimdi.de/static/de/db/dbinfo/zt00.htm>) mit dem Überbegriff „Reduction“. Unter dem Titel „Lung slices as an *in vitro* model for inhalation toxicity testing“ werden die Vorteile der PCLS, wie die bestehende Dreidimensionalität der Zellen, die erhaltenen differenzierten Zellfunktionen, die Organintegrität und die Möglichkeit der Methode, Schnitte verschiedener Spezies zu vergleichen, aufgeführt. Unter dem Gesichtspunkt, dass aus einer Rattenlunge hunderte Schnitte hergestellt werden und dadurch mehrere Substanzen an einem Tier getestet werden können, sowie in Anbetracht der Tatsache, dass an einem Tier auch immer zugleich Kontrollversuche stattfinden können, stellen die PCLS eine gute Methode dar, Tierversuche zu verringern.

2.4 Nanopartikel

Der Begriff „Nanopartikel“ leitet sich vom griechischen Wort „nano“ ab, was soviel bedeutet wie „Zwerg“ oder „zwerghaft“. „Nanopartikel“ werden definiert als Teilchen, die kleiner als 100 nm sind. Zum Vergleich: Ein 10 nm großes Goldpartikel ist zehn Millionen mal kleiner als ein Fußball. Ein Fußball ist wiederum zehn Millionen mal kleiner als die Erde (Abbildung 3).



Abbildung 3: Größenverhältnis eines 10 nm Goldpartikels: 10 Millionen mal kleiner als ein Fußball, der ebenfalls 10 Millionen mal kleiner als die Erde ist (aus Beckers et al. [16])

Die Aerosolforschung beschäftigt sich mit der Einordnung und der Klassifizierung von Partikeln allgemein und damit auch der Nanopartikel: Alle Partikel, die in der Atmosphäre vorhanden sind, werden als Schwebstaub bezeichnet. Dieser Schwebstaub lässt sich in größere und kleinere Teilchen unterteilen: Partikel, die größer als 10 μm sind, werden als Grobstaub bezeichnet, solche, die kleiner als 10 μm sind, als Feinstaub. Feinstaub an sich lässt sich wiederum in drei Kategorien unterteilen: Partikel mit einem maximalen Durchmesser von 10 μm (*Particulate Matter*, PM_{10}) stellen inhalierbaren Feinstaub dar, Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 2,5 μm ($PM_{2,5}$) sind lungengängig und ultrafeine Partikel (UFP) oder auch Nanopartikel, die kleiner als 0,1 μm sind ($PM_{0,1}$), können bis in die Alveolen vordringen. Während sich ultrafeine Partikel und Nanopartikel durch die gleiche Größe auszeichnen, weisen Nanopartikel einen gezielten Aufbau auf, wohingegen ultrafeine Feinstaubpartikel durch komplizierte Strukturen und Zusammensetzungen gekennzeichnet sind [16].

Der Begriff "Nano" wird in letzter Zeit in den Medien und in der öffentlichen Diskussion immer häufiger verwendet. Nanopartikel sind jedoch keine Erfindung der neueren Zeit, sie kommen schon seit jeher in unserer Umwelt vor. Bei Waldbränden oder Vulkanausbrüchen zum Beispiel werden Partikel freigesetzt, die den nanoskaligen Bereich erreichen. Bakterien im Meer nehmen Eisen aus dem Meerwasser auf und bilden daraus Ketten nanometer-feiner Magnetitkristalle. Anhand dieser

Magnetketten, die wie Kompassnadeln wirken, können sie sich parallel zum Erdmagnetfeld ausrichten und so die Wasserschichten mit den besten Lebensbedingungen erreichen. Damaszener-Klingen, die im Mittelalter und bis heute besonders wegen ihrer Bruchfestigkeit geschätzt werden, enthalten Kohlenstoff-Nanoröhren, die teilweise mit Zementit gefüllt sind. Diese Nanodrahtverstärkung ist es, die den Klingen ihre besondere Bruchfestigkeit verleiht [17].

Aber auch in neuerer Zeit werden zunehmend Nanopartikel in die Atmosphäre freigesetzt, zum großen Teil unbeabsichtigt. Hierzu gehören Abriebe aus Autoreifen, Autoabgase [18], Schweißarbeiten [19] aber auch Kochen [20].

Neben den unbeabsichtigt produzierten Nanopartikeln gibt es auch solche, die industriell mit streng definierten physikalisch-chemischen Eigenschaften synthetisiert werden. Diese Partikel können auf zwei verschiedene Arten hergestellt werden: Im „top-down“-Verfahren wird ein großes Stück Materie immer weiter zerlegt, bis die Bruchstücke den Nanometer-Bereich erreichen. Im „bottom-up“-Verfahren hingegen wird aus Atomen oder Molekülen das nanoskalige Partikel aufgebaut. Die künstlich hergestellten Nanopartikel unterscheiden sich in ihren Eigenschaften von mikroskaligen Materialien gleicher Herkunft. So können sich bei Übergang in die Nanometerdimension (abhängig vom Material, aus dem die Partikel bestehen) Löslichkeit, Leitfähigkeit, Transparenz oder der Schmelzpunkt ändern. Dieses Phänomen ist durch zwei Eigenschaften der Nanopartikel zu erklären: Zum Einen gelten oberhalb von 100 nm die klassischen Gesetze der Physik, die unterhalb von 100 nm durch die Gesetze der Quantenphysik ersetzt werden und so zu anderen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften führen. Zum Anderen befinden sich in Nanopartikeln verhältnismäßig mehr Atome pro Masse an der Oberfläche, was zu einer Vergrößerung der Oberfläche und damit zu einer erhöhten katalytischen Aktivität der Nanopartikel im Vergleich zum mikroskaligen Material führt [17]. Wo und wie solche industriell erzeugten Nanopartikel eingesetzt werden, wird in Absatz 2.5 genauer erläutert.

2.5 Nanotechnologie

Über die im Begriff „Nanotechnologie“ enthaltene Größenangabe allein kann die Nanotechnologie keineswegs definiert werden, zumal sie auch keine Technologie im engeren Sinne bzw. eine Gruppe von Technologien umfasst. Es handelt sich vielmehr um einen forschungspolitisch und forschungsorganisatorisch geprägten

Begriff, dessen Definition unter Wissenschaftlern immer noch umstritten ist [21]. Daraus ergeben sich eine Reihe verschiedener Definitionen für die Nanotechnologie: Schmid et al. [22] schreiben in einer Studie für die Europäische Akademie Bad Neuenahr-Ahrweiler: „Nanotechnologie basiert auf den fortschreitenden Anwendungen der Nanowissenschaften. Die Nanowissenschaften befassen sich mit funktionalen Systemen, die auf der Nutzung von Bausteinen mit spezifischen größenabhängigen Eigenschaften der individuellen Bausteine oder eines Systems aus diesen basieren.“ Die U.S. National Nanotechnology Initiative (NNI) beschreibt die Nanotechnologie als Anwendung, Manipulation und Forschung über Teilchen, die in einer Größenordnung von 1-100 nm liegen (<http://www.nano.gov/html/facts/whatsNano.html>). Grunwald und Fleischer werden im Buch „Nano – Chancen und Risiken aktueller Technologien“ genauer und beschreiben die Nanotechnologie als einen Sammelbegriff für Techniken für und mit nanoskaligen Systemen (Systeme in einer Größenordnung zwischen 1 und 100 nm),

- die zielgerichtet und individuell analysiert und manipuliert werden können, z.B. bei der Gestaltung von Oberflächeneigenschaften.
- bei denen größenspezifische neue Effekte und Eigenschaften beobachtet werden oder erzeugt werden können, wie z.B. quantenmechanische Effekte.
- welche wenigsten der Intention nach technisch nutzbar gemacht werden (können oder sollen) [21].

Die Möglichkeiten industriell hergestellter Nanopartikel eröffnen in der letzten Zeit immer weitere Anwendungsgebiete und haben Einzug in unser alltägliches Leben gefunden. In einer Broschüre des Bundesministeriums für Bildung und Forschung über Nanopartikel und Nanotechnologie werden dazu einige Beispiele aufgeführt [17]. So werden z.B. chirurgische Instrumente und Katheter mit Silber-Nanopartikeln beschichtet, die antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Auf diese Weise kann eine mögliche Sepsis durch kontaminiertes Material vermieden werden, zumal mehr Menschen durch verunreinigte Katheter sterben als im Straßenverkehr. Zudem werden die antibakteriellen Eigenschaften auch in Sportkleidung genutzt, um durch die Schweißbildung entstehende Gerüche zu neutralisieren. Durch Nachahmung des so genannten „Lotuseffekts“ werden mit Nanopartikeln beschichtete Fenster so schmutzabweisend, dass der nächste Regen den Schmutzfilm abspült. Des Weiteren werden Titandioxid-Partikel in Sonnencremes verwendet, die dazu fähig sind, UV-

Licht zu absorbieren und damit Sonnenbrände zu verhindern. Abbildung 4 zeigt einen kleinen Überblick, wo Nanopartikel im alltäglichen Leben vorkommen.

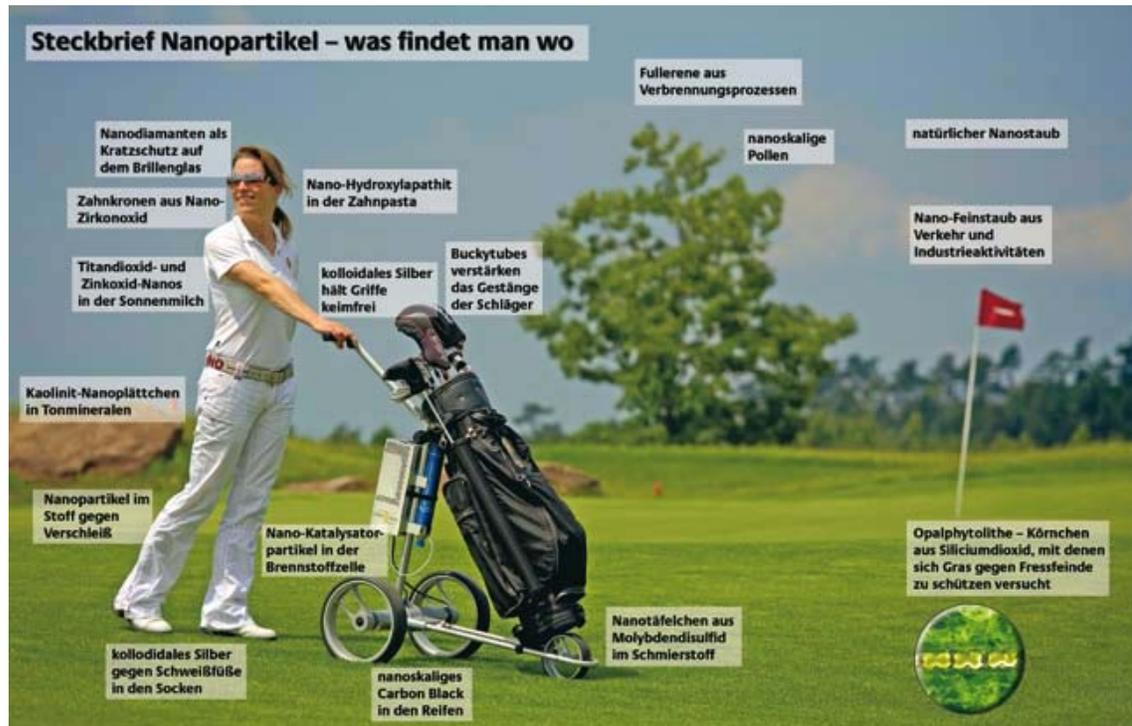


Abbildung 4: Übersicht über das Vorkommen von Nanopartikeln im Alltag (aus Schulenburg [17])

In der Medizin ermöglichen Nanopartikel neue Anwendungs- und Behandlungsmöglichkeiten. So können z.B. magnetische, biokompatible Nanopartikel (vornehmlich Eisen-3-Oxide) in tumoröses Gewebe injiziert werden, die dann mithilfe eines elektrischen Feldes im Gewebe Hitze erzeugen. Auf diese Weise werden Tumorzellen entweder direkt zerstört oder empfänglicher für eine begleitende Radio- oder Chemotherapie gemacht [23,24]. Außerdem ist es möglich, Medikamente an Nanopartikel zu koppeln, die damit in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. Kreuter et al. [25] zeigten den Transport von Poly(butylcyanoacryl)-Nanopartikeln, welche mit Polysorbat 80 ummantelt waren, in das Gehirn von Mäusen. Sie stellten fest, dass die Partikel an Apolipoproteine aus dem Blut binden, damit wie Lipoproteinpartikel erscheinen und somit ins Gehirn gelangen. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt, möglich wäre eine Rezeptor-vermittelte Endocytose der Partikel-Medikamenten-Konjugate durch kapilläre Endothelzellen des Gehirns. Die gebundenen Medikamente könnten damit anschließend durch Diffusion in das Gehirn gelangen, während sie den Wirkstoff freisetzen bzw. von Endothelzellen transzytiert werden.

2.6 Toxikologie von Nanopartikeln

„Wir haben gelernt mit Metallen umzugehen und haben Werkzeuge hergestellt, die uns das Leben leichter machten, aber auch Waffen. Wir haben das Auto erfunden, und der Autoverkehr tötet jedes Jahr weltweit eine halbe Million Menschen und verletzt 23 Millionen weitere. Wir haben neue Substanzen wie Pestizide hergestellt, die, soweit sie beständig sind, die Umwelt und unsere Lebensqualität beeinträchtigen. Daraus ist zu schließen: Neue, nanoskalige Materialien werden zumindest einige unerwünschte Nebenwirkungen haben.“ So sagt es Harald Krug, Professor an der EMPA St. Gallen in der Schweiz, wenn er in seinen Vorträgen über die Toxikologie von Nanopartikeln spricht [17].

Durch ihre größere Oberfläche pro Masse erhöht sich die biologische Aktivität der Nanopartikel. Diese kann zum einen positiv und gewünscht sein (Trägereigenschaften für Medikamente, Durchdringen zellulärer Barrieren für den Wirkstofftransport), zum anderen aber auch negativ und unerwünscht (Induktion von oxidativem Stress, zelluläre Dysfunktion, Toxizität) sein. Genau die Vorteile von Nanopartikel können sich somit zugleich nachteilig auswirken. Aus diesem Grund ist es nötig, die Toxikologie von Nanopartikeln genauestens zu erforschen: So soll einerseits eine sichere Anwendung gewährleistet werden können. Andererseits sollen eventuelle Gefahren, die sich bei der Herstellung, dem Transport, aber auch der Entsorgung von Nanopartikeln ergeben, erkannt und behoben werden können.

Um die gesundheitlichen Gefahren abschätzen zu können, wurden die Auswirkungen verschiedenster Nanopartikel über relevante Expositionswege untersucht. Dazu gehören der Respirationstrakt, der Gastro-Intestinaltrakt (GI) sowie die Haut.

Der menschliche Respirationstrakt hat mit einer inneren Oberfläche von ca. 140 m² die Ausmaße eines Tennisplatzes [17]. Folglich ist es nicht verwunderlich, dass dieser die größte Einfallsschneise von Partikeln für den Organismus darstellt. Je kleiner die Partikel sind, desto tiefer können sie in die Lunge vordringen. Partikel mit einer Größe von unter 1 µm können bis in die Alveolarregion vordringen. Größere Partikel bis 10 µm werden in der Bronchialregion aufgehalten und noch größere Partikel (5 bis 30 µm) werden schon in der Nasenregion durch kleine Härchen zurückgehalten (Abbildung 5).

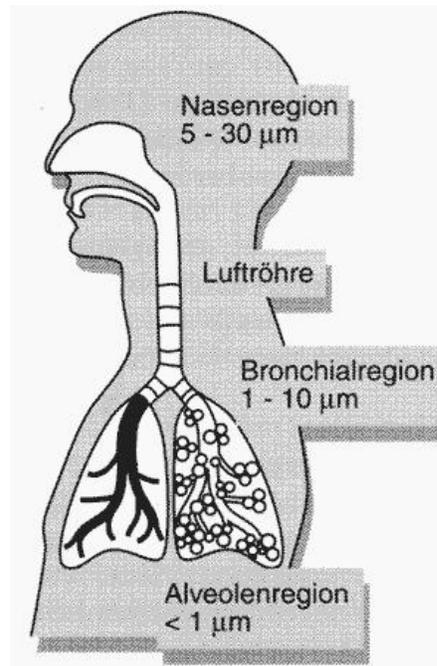


Abbildung 5: Der Weg von Partikeln nach inhalativer Aufnahme (aus Schwedt [26])

In mehreren Studien konnte die Hypothese belegt werden, dass Nanopartikel in der Lage sind, über die Lunge in den Blutkreislauf und damit in verschiedene Sekundärorgane zu gelangen. So zeigten Kreyling et al. [27] und Semmler et al. [28], dass nanoskalige Partikel fähig sind, den pulmonalen Clearancemechanismus der Alveolarmakrophagen zu umgehen und in Organe wie Leber, Milz, Herz und Gehirn vorzudringen. Die Autoren vermuten, dass die Nanopartikel - an Proteine gebunden - die Luft-Blut-Schranke überwinden und über die Blutzirkulation in die sekundären Organe gelangen. Auch Oberdörster [29] konnte den Übergang der Partikel ins Gewebe darstellen: 15 Minuten nachdem Ratten einem Rauch mit Partikeln von Polytetrafluorethylen ausgesetzt worden waren, konnten diese Partikel im Interstitium der Lunge gefunden werden. Dieser Übergang vom Alveolarraum in das Interstitium könnte direkte Partikel-induzierte Effekte an diesem Ort auslösen. Wie die Partikel dann in die Blutzirkulation kommen, konnten Heckel et al. [30] zeigen: Mit Albumin ummantelte Gold-Nanopartikel werden über eine Rezeptor-vermittelte Transzytose von Caveolen aufgenommen. Solche Caveolen sind Einstülpungen in der Wand von Alveolarzellen und Lungenkapillaren, die die Partikel aufnehmen, umschließen und über das Kapillarendothel in die Blutzirkulation freisetzen. Dieses Erreichen der Blutbahn könnte in direktem Zusammenhang mit der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen stehen. Kommt es über die Partikel zu einer alveolären Inflammation

und der damit einhergehenden Akute-Phase-Reaktion, kann das zu Veränderungen in der Blutkoagulation führen [31]. Eine weitere Eintrittspforte für inhalierte Nanopartikel konnten Oberdörster et al. [32] darstellen. Nach Inhalation ultrafeiner ^{13}C -markierter Partikel zeigte sich bei Ratten am ersten Tag ein signifikanter Anstieg des ^{13}C -Gehalts im olfaktorischen Bulbus, der bis Tag 7 weiter zunahm. Die Nähe des Riechepithels und des olfaktorischen Bulbus zueinander scheint dabei eine wichtige Rolle für den neuronalen Transport von Partikeln zu spielen.

Der Gastro-Intestinaltrakt (GI) kann auf zwei Wegen mit Nanopartikeln in Berührung kommen: Zum einen können die Partikel direkt über die Mundhöhle aufgenommen und abgeschluckt werden. Zum anderen können Partikel, die inhalativ aufgenommen wurden, über den Clearance-Mechanismus des Flimmerepithels der Lunge retrograd in die Mundhöhle transportiert und danach abgeschluckt werden. Während die inhalative Behandlung von Ratten mit ultrafeinen $^{192}\text{Iridium}$ -Partikeln in zwei Studien keine signifikante Aufnahme in den Gastro-Intestinaltrakt zeigte [27,28], konnten Jani et al. [33] nach oraler Behandlung mit Polystyrolpartikeln eine größenabhängige Aufnahme der Partikel (6,6% eingegebener 50 nm Partikel, 5,8% von 100 nm großen Partikeln und 0,8% von 1 μm großen Partikeln) sehen. Dies geschah vornehmlich über die Peyer'schen Platten, von wo aus sie in das mesenteriale Lymphsystem und von dort weiter in das Organsystem gelangten. Eine von Größe und Oberflächenladung abhängige Aufnahme von radioaktiv markierten Gold-Nanopartikeln über den GI und die nachfolgende Akkumulation in Sekundärorganen konnten auch Schleh et al. [34] nachweisen. Sie instillierten Ratten oral negativ geladene Goldpartikel in einer Größe von 1,4, 18 und 200 nm und positiv geladene Goldpartikel in einer Größe von 2,8 nm. Nach 24 Stunden wurde die Menge an Partikeln in Organen, Geweben und Exkrementen quantitativ mittels Gamma-Spektroskopie bestimmt. Sie sahen die höchste Akkumulation in Sekundärorganen bei den negativ geladenen Partikeln und unter diesen bei den kleinsten, 1,4 nm großen Partikeln. Zudem konnten sie feststellen, dass die 18 nm großen Partikel im Vergleich zu anderen Sekundärorganen vermehrt im Gehirn und im Herzen zu finden waren.

Auch die Haut stellt in Zeiten exzessiver Sonnenbestrahlung eine Kontaktfläche für Nanopartikel dar, insbesondere für das in vielen Sonnencremes enthaltene nanoskalige TiO_2 , welches als UV-Absorber dient. Nach einem Sonnenbrand ist die Haut geschädigt und die schützende Barriere nur sehr dünn. Kim et al. [35] konnten zeigen, dass Quantum dots (meist aus Halbleitern bestehende nanoskalige Materi-

alien, deren Bewegung in alle drei Richtungen so eingeschränkt ist, dass ihre Energie nicht mehr kontinuierliche, sondern nur noch diskrete Werte annehmen kann) nach dermalen Injektion bei Mäusen und Schweinen in die regionalen Lymphknoten transportiert werden. Einmal in der Haut angelangt, können damit Nanopartikel über den Organismus verteilt werden.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Für die Weiterentwicklung der positiven Eigenschaften der Nanopartikel, aber auch zur Abschätzung des Gefährdungspotenzials ist es wichtig, dass man sich im Rahmen einer multidisziplinären Forschung vor allem in den Bereichen der Toxikologie, der Medizin, der molekularen Biologie, der Bioinformatik und der Materialwissenschaften auch in Zukunft umfassend mit diesem Thema beschäftigt.

Silber-Nanopartikel tauchen immer häufiger im alltäglichen Leben auf. Durch ihre antimikrobiellen Eigenschaften [36] werden sie vor allem in der Medizin bei Wundauflagen und zur Beschichtung von Kathetern und Instrumenten verwendet. Es gibt aber bereits *in vitro*-Studien, die Silber-Nanopartikeln ein toxisches Potenzial zuweisen, das sowohl größen- als auch konzentrationsabhängig ist [37-39].

In der vorliegenden Arbeit soll die Toxikologie von Silber-Nanopartikeln näher untersucht werden. Dabei soll ein Schwerpunkt sein, ob sich Lungenschnitte von Ratten (Precision-cut Lung Slices, PCLS) als ein mögliches Testsystem eignen. Im ersten Schritt soll dabei die Herstellung der PCLS als ein funktionierendes Testsystem untersucht werden. Hierbei sollen die Vitalität der PCLS und deren Reaktion auf Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) im Vordergrund stehen. Im zweiten Schritt sollen dann die gewonnenen Ergebnisse als Basis für die nachfolgende Testung von Silber-Nanopartikeln verwendet werden. Dabei werden im Wesentlichen zwei Fragestellungen betrachtet: (1) Verändern Nanopartikel die Vitalität der PCLS? Und (2): Beeinflussen die Nanopartikel eine bereits bestehende, durch LPS ausgelöste Entzündung? Die Toxikologie der Silber-Nanopartikel soll dabei bewusst anhand einer niedrigen Konzentration untersucht werden, da sich geringe Konzentrationen im Bezug auf die Übertragbarkeit in das tägliche Leben durch eine höhere Relevanz auszeichnen als sehr hohe Konzentrationen.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere

Wistar-Kyoto Ratten, weiblich, 180–200 g	Janvier (St. Berthevin Cedex, FR)
Wistar-Kyoto Ratten, weiblich, 180–200 g	Zuchttiere aus dem Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Untersuchungen an den Ratten in der vorliegenden Dissertation wurden nach Genehmigung des Tierversuchsvorhabens durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt (Kennzeichen: 55.2-1-54-2531-26-10). Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Instituts der LMU sowie des Helmholtz-Zentrums München unter standardisierten Bedingungen (Temperatur: 20-22 °C, Beleuchtung: 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus, Luftfeuchtigkeit: 55%) gehalten. In den Versuchen 4.1.1 und 4.1.2 wurden Ratten aus dem Physiologischen Institut der LMU verwendet, ab dem Versuch 4.1.3 Ratten, die direkt von einem professionellen Züchter (Janvier, Frankreich) bezogen wurden. Vor der ersten Behandlung erfolgte eine mindestens einwöchige Akklimatisierungsphase.

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Analysewaage	Mettler Toledo (Giessen, D)
Dampfsterilisator	H+P Labortechnik (Oberschleissheim, D)
Eismaschine	Scotsman Ice Systems (Herborn, D)
Elektrische Pipettierhilfe	Integra Biosciences (Fernwald, D)
Gefriertruhe -80 °C	Skadi Europe (Wrede, NL)
Gefriertruhe -20 °C	Liebherr (Ochsenhausen, D)
Haltevorrichtung zur Intubation der Ratten	Werkstatt Helmholtz-Zentrum München (Neuherberg, D)
Heraeus Brutschrank	Thermo Electron Corporation (Langenselbold, D)
Heraeus Sterilbank	Thermo Electron Corporation
Heizplatte	Heidolph (Schwabach, D)
<i>Krumdieck Tissue Slicer</i>	Alabama Research and Development (Munford, USA)
Kühlschrank	Liebherr
Magnetrührer	Heidolph

Magnetstäbchen	Roth (Karlsruhe, D)
Mehrkanal-Pipette, 12-Kanal-Betrieb, 300 µL	Eppendorf (Hamburg, D)
Microplate Reader Sunrise™	Tecan Group Ltd. (Männedorf, CH)
Multilabel Counter Victor ³	Perkin-Elmer (Rodgau, D)
Multipipette	Eppendorf
pH-Meter inoLab®	WTW GmbH (Weilheim, D)
Pipetten (10, 200, 1000 µL)	Eppendorf
Plattformschüttler-Polymax 1040	Heidolph
Präparierbesteck (Scheren und Pinzetten)	Hammacher Instrumente (Solingen, D)
Reinstwasseraufbereitungs-Anlage	Millipore GmbH (Schwalbach, D)
<i>Tissue Coring Press 550755-62</i>	TSE Systems GmbH (Bad Homburg, D)
Ultrazentrifuge Optima Max	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)
Vortex-Rüttler	Scientific Industries Inc. (NY, USA)
Zentrifuge Hettich Rotina	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, D)

3.2.2 Software

GraphPad Prism 4, Version 4.01	GraphPad Software (San Diego, USA)
Magellan™-Data Analysis Software Version 6.6	Tecan Group Ltd. (Männedorf, CH)

3.2.3 Verbrauchsmaterial

Amicon Ultra Centrifugal Filter (Porengröße 30 kDa)	Sigma (München, D)
Amplification Tape	VWR (Ismaning, D)
Bottle Top Filter, Porengröße 0,2 µm	VWR
Combitips 2,5 und 5 mL	Eppendorf
Handschuhe	Braun (Melsungen, D)
“Maxisorb”-Mikrotiterplatten (Flachboden, 96 Wells, 400 µL)	Fisher Scientific GmbH (Ulm, D)
Mikrotiterplatten (Flachboden, 96 Wells, 400 µL)	Fisher Scientific
Pipettenspitzen 10, 200 und 1000 µL	VWR
Spritzen 1 und 20 mL	Henke-Sass Wolf GmbH (Tuttlingen, D)

Reaktionsgefäße 1,5 mL	Eppendorf
Venenverweilkanüle 1,7x50 mm, 16G	Braun (Melsungen, D)
Zellkulturplatten (24 Wells, 1 mL Arbeitsvolumen)	Fisher Scientific

3.2.4 Medium, Agarose

- **William's Medium E**, das bereits NaHCO_3 enthielt, wurde gebrauchsfertig von Sigma (München, D) bezogen und zusätzlich mit 200 mM L-Glutamin versetzt. Es wurde in den Versuchen 4.1.1 und 4.1.2 verwendet.
- **Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham ohne Phenolrot** wurde als Pulver von Sigma bezogen und enthielt bereits 0,365 g/L L-Glutamin und 15 mM HEPES (Puffersubstanz). Das Pulver wurde vor Gebrauch frisch in 500 mL *Aqua dest.* gelöst und zu einer zweifach konzentrierten Lösung (2x DMEM/F-12 Ham) hergestellt. Nachdem sich das Mediumpulver unter Rühren gelöst hatte, wurden 16 mL einer 7,5%-igen Natriumbicarbonatlösung (Invitrogen) hinzugegeben und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Zuletzt wurde das Medium steril filtriert (0,2 μm Filter). Durch Hinzugeben der gleichen Menge *Aqua dest.* (500 mL) entstand einfach konzentriertes Medium (1x DMEM/F-12 Ham), das zur Kultivierung der Lungenschnitte benutzt wurde. Diesem wurden zusätzlich 100 units/mL Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin hinzugefügt. Es wurde in den Versuchen 4.1.3 bis 4.3.3 verwendet.
- **Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)** wurde gebrauchsfertig von Sigma bezogen und auf ca. 0 °C gekühlt verwendet.
- **PBS Dulbecco** wurde in Pulverform von Biochrom AG (Berlin, D) bezogen und in 1 Liter *Aqua dest.* gelöst. Die Lösung enthielt 8000 mg/L NaCl, 200 mg/L KCl, 1150 mg/L Na_2HPO_4 , 200 mg/L KH_2PO_4 , 100 mg/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 100 mg/L CaCl_2 . Der pH-Wert lag bei 7,4.
- **PBS-Tween 20** wurde als visköse Lösung von Sigma bezogen. Zur Herstellung des Waschpuffers für die ELISAs wurden 0,5 mL PBS Tween 20 in 1 Liter *Aqua dest.* gelöst. Der pH-Wert lag bei 7,4.
- **Natriumbicarbonatlösung (7,5%)** wurde gebrauchsfertig von Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen.

- **Low melting Agarose** zum Ausgießen der Lunge wurde von Sigma bezogen. Für die Versuche 4.1.1 und 4.1.2 wurde eine 1,5%-ige Agaroselösung mit Aqua dest. hergestellt. Ab dem Versuch 4.1.3 wurde eine 3%-ige Agaroselösung mit gleichem Volumen 2xDMEM/F-12 Ham vermischt und in die Lunge instilliert. Beide Agaroselösungen wurden in einem Heizschrank auf 37 °C temperiert.

3.2.5 Reagenzien

Aqua dest.	Reinstwasseraufbereitungsanlage Millipore (Schwalbach, D)
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
CO ₂	Linde Gas (Unterschleißheim, D)
70% Ethanol	Roth
2 N H ₂ SO ₄	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (0,9%)	Merck KG (Darmstadt, D)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin in 100 mL 0,9%-iger NaCl-Lösung)	Sigma
Triton X-100	Roth
Narkose: Mischung aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl	Herstellung unter tierärztlicher Aufsicht im Tierstall des Helmholtz-Zentrum München
Antagonisierung: Mischung aus Atipamezol, Flumazenil, Naloxon	Herstellung unter tierärztlicher Aufsicht im Tierstall des Helmholtz-Zentrum München
<u>Immunmodulatorische Substanz</u>	
LPS (Lipopolysaccharid, E. coli, Serotyp 0111:B4)	Sigma
<u>Kits</u>	
BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce®)	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Cytotoxicity Detection Kit ^{Plus} (LDH)	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
DuoSet® Rat TNF-α	R&D Systems
DuoSet® Rat CXCL1/CINC-1	R&D Systems

3.2.6 Farbstoff

WST1-Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics
---------------------------------	-------------------

3.2.7 Nanopartikel

Für die in der vorliegenden Dissertation aufgezeigten Versuche wurden Silber-Nanopartikel verwendet, die von einem Kooperationspartner synthetisiert wurden. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Matthias Epple (Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen) stellte die Silber-Nanopartikel nach einer Methode her, bei der wie bei Kittler et al. [40] beschrieben, AgNO_3 mittels Glukose in Anwesenheit von Polyvinylpyrrolidon (PVP) reduziert wird.

Zunächst wurden 3 g Glukose und 1 g PVP in 40 g Wasser gelöst und auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurden umgehend 0,5 g AgNO_3 , das in 1 mL Wasser gelöst war, hinzugefügt. Die Dispersion wurde eine Stunde lang konstant auf 90 °C gewärmt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Hierauf wurde die Dispersion ultrazentrifugiert (30 000 rpm, 30 Minuten), der Überstand verworfen und die Partikel erneut in Wasser dispergiert. Durch eine weitere Ultrazentrifugation wurden NO_3^- , Glukose und deren Oxidationsprodukte, PVP und Ag-Ionen entfernt. Die Silber-Nanopartikel wurden zuletzt in entgastem Wasser redispersiert. Es waren schließlich 50 µg Ag-Nanopartikel in 80 µL wässriger Lösung enthalten. Die Ausbeute an erhaltenen Ag-Nanopartikeln lag bei ca. 5%.

Die genaue Charakterisierung der Ag-Nanopartikel erfolgte ebenfalls durch die Kooperationsgruppe. Die Konzentration der Partikel wurde mittels Atom-Absorptionsspektroskopie (ASS) bestimmt. Die Ermittlung des Durchmessers der Partikel erfolgte im Elektronenmikroskop. Der hydrodynamische Durchmesser, als Maß für den Partikeldurchmesser in Lösung, sowie das Zeta-Potenzial, welches ein Maß für die elektrische Ladung der Partikel in wässriger Lösung ist, wurden mithilfe der Dynamischen Lichtstreuung in einem Malvern Zetasizer Nano ZS gemessen. Eine nochmalige Überprüfung der genannten Parameter nach dem Transport erfolgte mittels eines Malvern Zetasizer im Rahmen dieser Arbeit.

Um das Lösungsmittel der Ag-Partikel für Kontrollversuche nutzen zu können, wurden die Ag-Partikel wie folgt abzentrifugiert: Im ersten Schritt wurde mit einer Ultrazentrifuge (186 000 G, 30 Minuten) das Lösungsmittel von den Partikeln getrennt, wobei die Partikel als Pellet im Reaktionsgefäß übrig blieben. Um eventuell zurückgebliebene Ag-Nanopartikel im Lösungsmittel zu entfernen, wurde dieses in einen Amicon-Filter (30 kDa) gegeben und 15 Minuten lang bei 1500 g abzentrifugiert. Die Partikel verblieben dabei im Filter.

3.3 Methoden

3.3.1 Präparation der Lungenschnitte aus Ratten

Zur Gewinnung der Lungenschnitte (Precision-cut Lung Slices, PCLS) wurden die Ratten zunächst mit einer Überdosis CO₂ eingeschläfert. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage verbracht, das Fell von der Halsunterseite bis auf Höhe des Nabels rasiert und ein Hautschnitt auf entsprechender Länge angesetzt. Nach Durchtrennen der Bauchmuskulatur und des Peritoneums wurde die Vena cava zum Entbluten durchschnitten. Hierauf wurde der Brustkorb eröffnet, indem V-förmig auf die Apertura thoracis zulaufend die Rippen durchtrennt wurden. Nach Präparation der Halsmuskulatur wurde die Trachea dargestellt und auf der Ventralseite zwischen zwei Knorpelspangen mit einer spitzen Schere vorsichtig durchstoßen. Durch diese kleine Öffnung wurden 15 mL einer Agarose-Lösung über eine Kanüle eingeführt. In den Versuchen 4.1.1 und 4.1.2 wurde eine 1,5%-ige, auf 37 °C temperierte low-melting Agarose-Lösung benutzt. In den Versuchen 4.1.3 bis 4.3.3 wurde 3%-ige low-melting Agarose und zweifach konzentriertes DMEM/F-12 Ham, im Verhältnis 1:1 gemischt, verwendet. Bevor die Kanüle aus der Öffnung gezogen wurde, wurde distal der Öffnung die Trachea mit einer chirurgischen Klemme abgedrückt. Hierauf wurde die Lunge vorsichtig herauspräpariert und zur Erstarrung der Agarose 15 Minuten in eine eisgekühlte NaCl-Lösung (Versuche 4.1.1 und 4.1.2) bzw. in Earle's Balanced Salt Solution (EBBS, Versuche 4.1.3 bis 4.3.3) gelegt. Mithilfe der *Tissue Coring Press* wurden Gewebezylinder mit 8 mm Durchmesser aus den einzelnen Lungenlappen gestanzt.

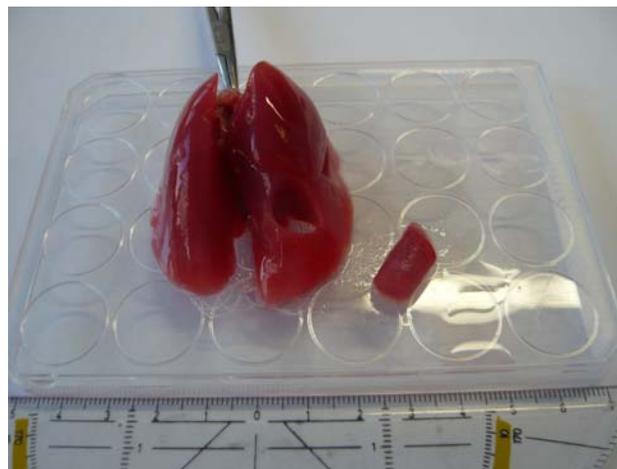


Abbildung 6: Lunge nach Polymerisation der Agaroselösung und Ausstanzen eines Gewebezylinders

Diese Zylinder wurden mit dem *Krumdieck Tissue Slicer* (Intervall-Oszillation, 40-50 Hz) in ca. 200-250 µm dicke Scheiben geschnitten und in Zellkulturschalen (24 Wells) gegeben, die vorher mit auf 37 °C temperiertem Medium gefüllt worden

waren. In den Versuchen 4.1.1 und 4.1.2 wurde William's Medium E und in 4.1.3 bis 4.3.3 DMEM/F-12 Ham verwendet. Zur Kultivierung wurden die Zellkulturschalen dann in einen Brutschrank mit 37 °C in einer Atmosphäre mit 7,5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit gestellt. Um gelöste Agarose, Zelltrümmer und Mediatoren aus zugrunde gegangenen Zellen am Rande der Schnittflächen zu entfernen, wurde das Medium über einen Zeitraum von einer Stunde dreimal im Abstand von 20 Minuten gewechselt, wobei zwischen den einzelnen Waschschrritten die Lungenschnitte im Brutschrank inkubiert wurden. Im Anschluss daran erfolgte der Versuchsansatz.

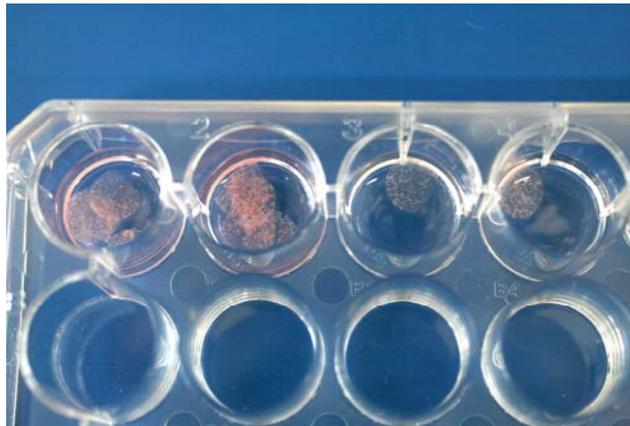


Abbildung 7: PCLS im Kulturmedium

3.3.2 Inkubation der Lungenschnitte mit Lipopolysaccharid (LPS)

Nachdem die PCLS nach der in 3.3.1 beschriebenen Methode hergestellt wurden, erfolgte je nach Versuchsaufbau die Exposition mit Lipopolysaccharid (LPS).

Hierzu wurde in die 24 Wells der Zellkulturplatte je 500 µL Medium sowie je 4 PCLS gegeben. Das Medium wurde innerhalb einer Stunde dreimal gewechselt, wobei die Zellkulturplatte zwischen den einzelnen Waschschrritten im Brutschrank inkubiert wurde. Anschließend wurde LPS in steigenden Konzentrationen von 10, 50, 100, 500 pg/mL, 1, 100, 200, 300, 500 ng/mL und 1, 2, 5, 10 und 20 µg/mL auf die PCLS gegeben.

Die Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt, wobei in jeweils zwei Wells kein LPS gegeben wurde und die Schnitte zweier weiterer Wells eine Stunde vor Inkubationsende mit 10%-igen Triton X-100 (auf 1% über den Schnitten mit DMEM/F-12 Ham verdünnt) lysiert wurden. Die Vitalität der PCLS nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (4 und 24 Stunden) wurde mittels der Lactatdehydrogenase-Aktivität sowie des WST1-Assay bestimmt. Die LPS-induzierte Zytokinausschüttung in den

Gewebekulturüberstand von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-8 (IL-8) wurde über den „Enzym-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) bestimmt.

3.3.3 Proteinbiochemische und gravimetrische Methoden

3.3.3.1 Messung der Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität

Um die Vitalität der PCLS zu ermitteln, wurde die Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Gewebekulturüberstand bestimmt.

Das im Zytoplasma aller Zellen vorkommende, stabile Enzym wird bei Störung der Zellmembranintegrität freigesetzt und gelangt in den Zellkulturüberstand. Der benutzte „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“ beruht auf dem Prinzip eines gekoppelten enzymatischen Tests. Wie in Abbildung 8 gezeigt, katalysiert das freigesetzte LDH die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, wobei das Coenzym NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Anschließend werden durch das Enzym Diaphorase die zwei Wasserstoff-Atome des NADH/H^+ auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid) übertragen, das sich zum Formazansalz rot färbt. Je mehr Zellen also geschädigt werden, desto mehr LDH wird freigesetzt und desto mehr Formazansalz gebildet (Abbildung 8).

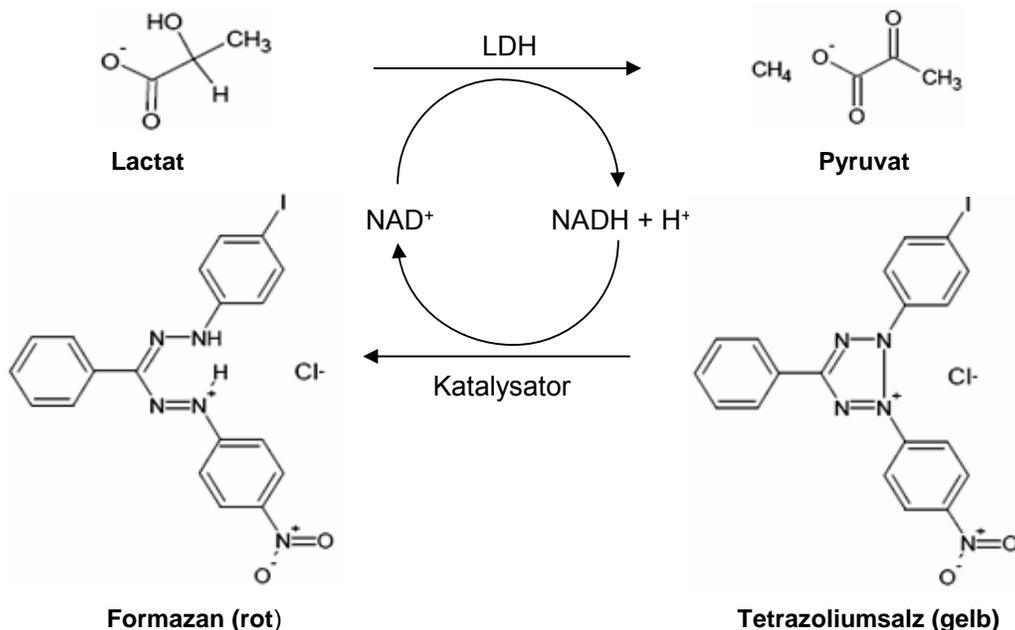


Abbildung 8: Prinzip des „Cytotoxicity Detection Kits“: Das freigesetzte LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, wobei das Coenzym NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Anschließend werden durch das Enzym Diaphorase die zwei Wasserstoff-Atome des NADH/H^+ auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid) übertragen, das sich zum Formazansalz rot färbt.

Je nach Versuchsaufbau wurde ohne LPS, nach LPS-Zugabe und zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (0, 4, 24, 48 und 72 Stunden) die LDH-Freisetzung in den Gewebekulturüberstand gemessen. Von den Lungengewebeüberständen wurden jeweils 50 μL im Doppelansatz in eine Mikrotiterplatte (96 Wells) überführt. Um die maximale LDH-Freisetzung zu bestimmen, wurden Überstände von Triton-lysierten PCLS verwendet. Zu den Proben wurde dann ein Gemisch aus Katalysator (Gemisch aus Diaphorase und NAD^+) und Farbstoff (Iodtetrazoliumchlorid und Natriumlactat) im Verhältnis 1:45 gegeben, 5 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und anschließend die Reaktion mit 25 μL Stopp Solution (1 N HCl) beendet. Die Absorption wurde bei 490 nm mithilfe eines Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Vitalität wurde prozentual zu den lysierten Kontrollen (100% LDH-Freisetzung) bestimmt.

3.3.3.2 WST1-Assay

Als Maß für die Vitalität wird in diesem Test die mitochondriale Aktivität der Zellen gemessen.

Durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen wird das chromogene Tetrazoliumsalz WST1 (Natrium 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat) reduktiv aufgespalten, wodurch ein wasserlösliches, rotes Formazansalz entsteht (Abbildung 9). Je mehr Zellen vorhanden und intakt sind, desto mehr Formazansalz wird gebildet.

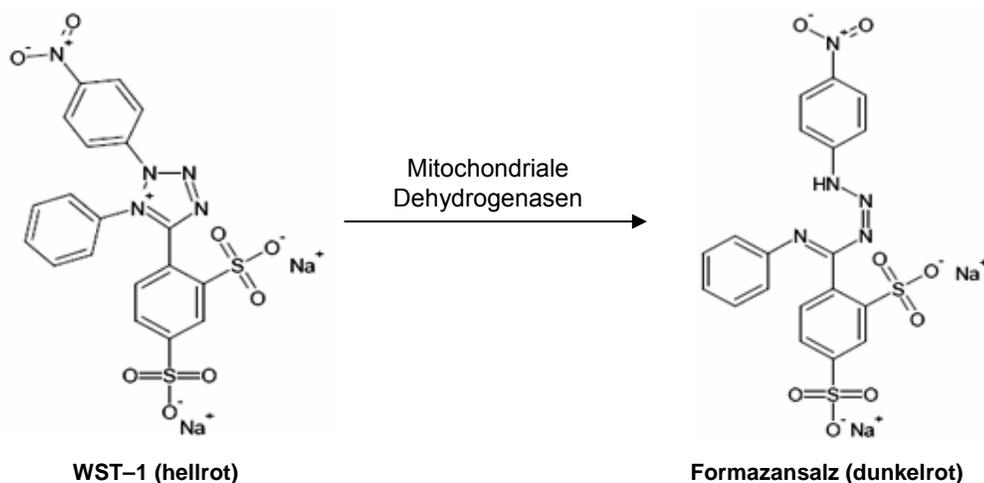


Abbildung 9: Prinzip des WST1-Assay: Durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen wird das chromogene Tetrazoliumsalz WST1 (Natrium 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat) reduktiv aufgespalten, wodurch ein wasserlösliches, rotes Formazansalz entsteht.

Im Anschluss an die LDH-Messung der mit LPS inkubierten PCLS erfolgte der WST1-Test mit denselben Proben. Dabei wurde der restliche Gewebekulturüberstand von den Schnitten abgenommen und für eine spätere Messung der Zytokinausschüttung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Anschließend wurde zu den PCLS $500\text{ }\mu\text{L}$ WST1-Lösung (Verdünnung 1:10 in DMEM/F-12 Ham) gegeben und im Brutschrank für 60 Minuten inkubiert. Danach wurden $100\text{ }\mu\text{L}$ Überstand in eine Mikrotiterplatte (96 Wells) überführt und die Absorption bei 450 nm mit einem Photometer gemessen und als optische Dichte (OD) angegeben. Die Vitalität wurde prozentual zur Positivkontrolle (PCLS ohne LPS-Zugabe) bestimmt.

3.3.3.3 Quantitative Proteinbestimmung durch BCA-Assay

Die Gesamtproteinkonzentration der PCLS wurde mithilfe des BCA Protein Assay Kits bestimmt. Das Prinzip beruht auf einer Biuret-Reaktion, bei der es zu einer Komplexbildung von Cu^{2+} -Kationen mit den Amid-Stickstoffen von Peptidbindungen in alkalischem Medium kommt. Hierbei werden Cu^{2+} -Kationen zu einwertigem Cu^+ reduziert. Es bildet sich ein stabiler, violett-farbiger Chelatkomplex aus einem Kupferion mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid, BCA), der bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann (Abbildung 10).

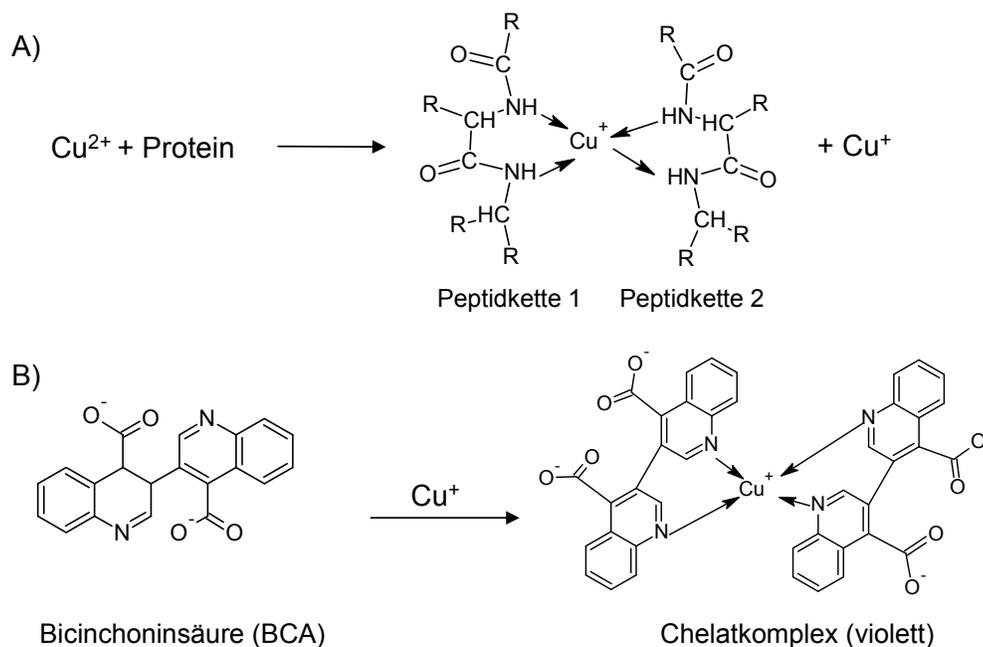


Abbildung 10: Prinzip des BCA Protein Assay Kit: A) Im alkalischen Medium kommt es zur Komplexbildung zwischen den Amid-Stickstoffen der Peptidbindungen und Cu^{2+} -Kationen, wobei Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird (Biuret-Reaktion). B) Im zweiten Schritt bildet sich aus dem einwertigen Kupfer und zwei Molekülen der Bicinchoninsäure ein violetter Chelatkomplex.

Für die Proteinbestimmung wurden jeweils 4 PCLS in 500 μ L DMEM/F-12 Ham mit steigenden LPS-Konzentrationen inkubiert. Der Versuch wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Proteinkonzentration von Proben und Standardverdünungen im Doppelansatz bestimmt. Als Standard wurde Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet, von welchem eine Verdünnungsreihe von 2000-25 μ L/mL PBS hergestellt wurde. Anschließend wurden je 25 μ L Probe oder Standardverdünnung mit 200 μ L BCA-Reagenzlösung (Gemisch aus Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid und 4% Kupfersulfat im Verhältnis 50:1) in eine Mikrotiterplatte (96 Wells) pipettiert und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Mit einem Mikrotiterplatten-Photometer wurde die Absorption bei 562 nm gemessen und die individuellen Konzentrationen mithilfe der Magellan™-Data Analysis Software über eine Vier-Parameter-Auswertung anhand der gemessenen Optischen Dichte (OD) der Standardkurve ermittelt.

3.3.3.4 ELISA

Der „Enzym-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dem Proteine, wie zum Beispiel Zytokine, in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden können. Hierfür wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits (ELISA-DuoSets rat TNF- α und rat IL-8) verwendet. Nach dem Prinzip eines „Sandwich-ELISA“ wird zunächst das Antigen durch einen an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte haftenden, antigenspezifischen Antikörper (Capture-Antikörper) gebunden und kann dann durch einen zweiten antigenspezifischen, biotinylierten Antikörper (Detection-Antikörper) nachgewiesen werden. An den biotinylierten Antikörper wird die Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (Streptavidin-horseradish-peroxidase, Streptavidin-HRP) gebunden, die das hinzugefügte Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) mit H₂O₂ umsetzt und dadurch einen Farbstoffwechsel bewirkt. Die Zugabe von H₂SO₄ beendet die enzymatische Substratumsetzung und es vollzieht sich ein Farbumschlag von blau zu gelb. Über eine Standardkurve, die über bekannte Konzentrationen eines rekombinanten Proteins ermittelt wurde, können die Konzentrationen der gesuchten Antigene berechnet werden.

Die Zytokinausschüttung wurde aus Gewebekulturüberständen bestimmt, die nach der LDH-Bestimmung aus den einzelnen Versuchsansätzen bei -80 °C eingefroren worden waren. Für die Ermittlung von TNF- α und IL-8 in den Gewebekulturüberständen wurden „Maxisorb“-Mikrotiterplatten (96 Wells) verwendet, die während der Inku-

bation lichtgeschützt in einer Styroporbox gelagert wurden. Im ersten Schritt wurde der Capture-Antikörper in PBS 1:180 verdünnt, von dieser Lösung 100 μL in die einzelnen Wells der Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 300 μL PBS, das 1% Bovines Serum Albumin enthielt, gegeben, um unspezifische Bindungen zu blocken und 1 Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Verdünnung der Proben sowie der Standardkonzentrationen: Die Proben, in denen IL-8 nachgewiesen werden sollte, wurden 1:100 mit PBS (enthielt 1% BSA) verdünnt. Die rekombinanten Proteine wurden in Konzentrationen von 31 pg/mL bis 2000 pg/mL PBS (mit 1% BSA) verdünnt. Die Proben, mit denen TNF- α ermittelt werden sollte, blieben unverdünnt. Von den Proben- bzw. Standardverdünnungen wurden jeweils im Doppelansatz 100 μL in die Plattenvertiefungen pipettiert und 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte wiederum dreimal gewaschen. Hierauf wurden 100 μL Detection-Antikörper (1:180 in PBS, das 1% BSA enthielt, verdünnt) in die Wells gegeben und ebenfalls für 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang. Im darauf folgenden Schritt wurde Streptavidin-HRP 1:200 in PBS (mit 1% BSA) verdünnt, 100 μL der Lösung auf die Platte pipettiert und 20 Minuten bei RT lichtgeschützt inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde in die Wells je 100 μL Tetramethylbenzidin (TMB) gegeben und 20 Minuten bei RT inkubiert. Ohne die Platte erneut zu waschen, wurde die Substratumsetzung durch Zugabe von H_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Konzentrationen von TNF- α und IL-8 wurden mithilfe der Magellan™-Data Analysis Software bestimmt.

3.3.3.5 Bestimmung des Gewichts der PCLS

Die Gewebeschnitte wurden mithilfe des *Krumdieck Tissue Slicers*, wie in 3.3.1 beschrieben, in einer Schnittdicke von 200-250 μm angefertigt. Um eventuelle Varianzen der Schnittdicke, bedingt durch strukturelle Unterschiede im Lungengewebe aber auch durch technisches Handling, auszuschließen, wurde das Durchschnittsgewicht von je 4 Lungenschnitten bestimmt.

In eine Zellkulturplatte mit 24 Wells wurden pro Vertiefung 500 μL Medium (DMEM/F-12 Ham) gegeben, die Platte auf eine Analysewaage gestellt und das Gewicht tariert. Aus einem Gefäß, in dem sich die frisch hergestellten Schnitte sowie eisgekühlte

Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) befanden, wurden die Schnitte einzeln vorsichtig mit einer flachen Pinzette entnommen und die anhaftende Flüssigkeit an einem Zellulosefasertuch abgestreift. Es wurden jeweils 4 Schnitte in ein Well gegeben. Nachdem das erste Well mit 4 Schnitten befüllt war, wurde das Gewicht abgelesen und danach wieder tariert. Somit konnte das Durchschnittsgewicht von je 4 Schnitten bestimmt werden.

3.3.4 Methode zur Instillation der Nanopartikel

Um die Nanopartikel in die Rattenlunge instillieren zu können, wurden die Tiere sediert. Die Ratten wurden gewogen und ein Gemisch aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl entsprechend des Gewichts (0,07 mL/100 g Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Dazu wurde die Ratte mit einer Hand streng am Nackenfell fixiert, auf den Rücken gedreht und mit der anderen Hand das Anästhetikum in das Peritoneum injiziert. Anschließend wurde die Ratte in einen leeren Käfig gesetzt, bis die Sedation einsetzte. Nach Kontrolle des Zwischenzehenreflexes wurde das Tier mit den Inzisivi an ein Gummiband gehängt, das sich an einem im 60° Winkel stehenden Brett befand (Abbildung 11).

Abbildung 11: Intubation der Ratte und Instillation der Nanopartikel: Die Ratte hängt mit den Inzisivi an einem Gummiband, das sich an einem im 60° Winkel stehenden Brett befindet. Unter Sichtkontrolle wird die flexible Braunüle in die Trachea vorgeschoben und mit einem Einatemzug die Partikel instilliert.



Die Ratte lag nun mit dem Kopf nach dorsal überstreckt rücklings auf dem Brett. Unter Sichtkontrolle wurde anschließend vorsichtig eine flexible Braunüle (16 G) in das obere Drittel der Trachea geschoben. Die Kontrolle des richtigen Sitzes der Braunüle erfolgte über einen Spiegel, der beim Ausatmen angehaucht wurde. Anschließend wurden in eine 1 mL Insulinspritze 400 µL Luft und 80 µL wässrige Partikellösung (die 50 µg Ag-Nanopartikel enthielt) aufgezogen und mit einem Einatemzug instilliert. Die 400 µL Luft sollten eventuell an der Spritze anhaftende Partikel über die Braunüle mit in die Lunge spülen. Die Ratte wurde darauf vom Brett genom-

men und aufrecht gehalten, um ein Zurücklaufen der Suspension zu vermeiden. Abschließend wurde ein Gemisch aus den Antagonisten Atipamezol, Flumazenil und Naloxon dem Gewicht entsprechend (0,25 mL/100 g Körpergewicht) subcutan injiziert und das Tier nach Kontrolle der Vitalfunktionen für 24 Stunden zurück in den Käfig gesetzt.

Das Lösungsmittel (H₂O) der Ag-Partikel wurde wie in 3.2.7 beschrieben von Partikeln gereinigt und zur Kontrolle auf die gleiche Art und Weise instilliert (80 µL Lösungsmittel + 400 µL Luft).

3.4 *Statistische Auswertung*

Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgt mit GraphPad Prism 4 Version 4.01. Zum direkten Vergleich zweier Datengruppen wurde der t-Test, bei zu kleiner Anzahl oder fehlender Normalverteilung nach D'Agostino & Pearson der Mann-Whitney-Test, jeweils zweiseitig ungepaart angewendet. Sollten alle Datengruppen untereinander verglichen werden, wurde die ANOVA (One-way analysis of variance) mit anschließendem Tukey-Test (Tukey's Multiple Comparison Test) verwendet, bei Vergleich von Datengruppen mit einer Kontrollgruppe der Dunnett-Test (Dunnett's Multiple Comparison Test). Für die Überprüfung einer Zeit- oder Konzentrationsabhängigkeit kam die zweiseitige Pearson-Korrelationsanalyse zum Einsatz. Unterschiede ab $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des Systems zur Herstellung von PCLS

4.1.1 Bestimmung der Vitalität bei wechselnden Kulturbedingungen und Schnittanzahl

Um für spätere Versuche optimale Bedingungen zur Vitalerhaltung der PCLS zu erreichen, wurden zunächst die optimalen Versuchsbedingungen getestet. Dazu wurde eine unterschiedliche Anzahl an Schnitten in zwei verschiedenen Mengen an Medium inkubiert. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte über Messung der LDH-Freisetzung in den Gewebekulturüberständen. Die Freisetzung von LDH ist direkt proportional zur Beeinträchtigung der Membranintegrität und somit zur Vitalität der Zellen.

Die Präparation der PCLS von Zuchtratten aus der Physiologie erfolgte nach der in 3.3.1 beschriebenen Methode. Der *Krumdieck Tissue Slicer* wurde mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gefüllt und die Schnitte mit William's Medium E inkubiert, das bei Richter et al. [41] erfolgreich zur Kultivierung von Gewebeschnitten benutzt worden war. In zwei 24 Well Platten wurden 0,5 mL bzw. 1 mL Medium pro Well pipettiert. Anschließend wurden die Wells im Dreifachansatz mit jeweils 1, 2, 3 und 4 Schnitten befüllt. Die PCLS wurden dann für 4 bzw. 24 Stunden kultiviert.

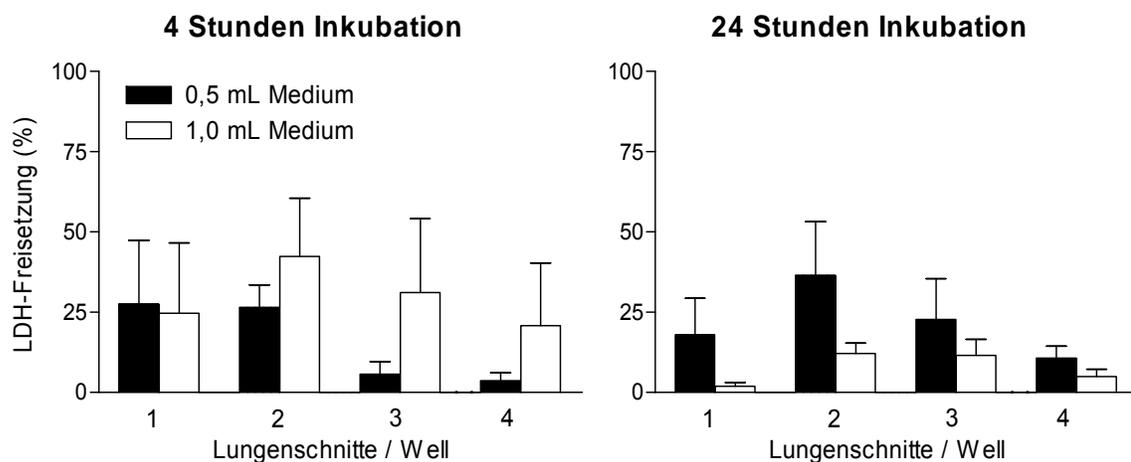


Abbildung 12: LDH-Freisetzung durch PCLS nach 4 und 24 Stunden Inkubation in William's Medium. Es wurden jeweils 1, 2, 3 und 4 Schnitte in 0,5 mL bzw. 1 mL Medium inkubiert. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf den Gesamt-LDH-Gehalt von Triton-lysierten PCLS. MW \pm SEM, n=3-4

Der Abbildung 12 ist zu entnehmen, dass die Vitalität der Lungenschnitte in diesen ersten Versuchen großen Streuungen unterlag. Die LDH-Freisetzung schwankte von 0% bis 90%. Zwei Werte, die nach 4-stündiger Kultivierung über 100% lagen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Insgesamt zeigte sich keine Abhängigkeit der Vitalität von der Inkubationszeit, der Anzahl der Lungenschnitte pro Well und dem Inkubationsvolumen.

In der Bestrebung, eine möglichst hohe Vitalität in möglichst geringen Mengen an Kulturmedium und eine gut messbare Zytokinausschüttung im Gewebekulturüberstand zu erreichen, wurden in den folgenden Versuchen immer 4 Lungenschnitte in 0,5 mL Medium inkubiert, da mit 4 Schnitten keine eindeutig höhere Toxizität zu erkennen war.

4.1.2 Abhängigkeit der Vitalität von steigenden LPS-Konzentrationen

LPS ist ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien und gilt als Endotoxin. In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob LPS einen Einfluss auf die Vitalität der Lungenschnitte hat, wenn diese mit steigenden Konzentrationen behandelt werden.

Es wurden hierzu jeweils 4 PCLS in 0,5 mL William's Medium E für 4 bzw. 24 Stunden mit steigenden LPS-Konzentrationen inkubiert. Die Vitalität wurde mittels der LDH-Freisetzung in den Gewebekulturüberständen bestimmt.

Nach beiden Inkubationszeiten zeigte sich, vergleichbar mit den Vitalitätstests aus 4.1.1, eine hohe Streuung der Werte. Auf eine Darstellung dieser Ergebnisse wird deshalb verzichtet.

Die beiden ersten Versuchreihen waren ein deutlicher Hinweis auf suboptimale Versuchsbedingungen. Deshalb wurde in einem nächsten Schritt der Versuchsaufbau mit dem Ziel umgestaltet, eine geringere Streuung der Werte und eine bessere Vitalität zu erreichen.

4.1.3 Versuchsumstellung und Einführung eines weiteren Vitalitätstests

Nach Literaturrecherche wurden optimierte Versuchsbedingungen zur Verbesserung der Vitalität sowie der Reproduzierbarkeit herangezogen [42,43]:

- Der *Krumdieck Tissue Slicer* wurde mit Earle's Balanced Salt Solution anstatt mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gefüllt, um die PCLS während des Schneidevorgangs mit mehreren Salzen versorgen zu können.
- Anstatt William's Medium E wurde ein Gemisch aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und F-12 Ham zur Inkubation der Schnitte benutzt.
- Es wurden Ratten verwendet, die von einem kommerziellen Züchter (Elevages Janvier) bezogen wurden.
- Die Lungen wurden mit 1,5%-iger Agarose in DMEM/F-12 Ham gefüllt.

Im Versuch wurden jeweils 4 Lungenschnitte in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham für 4 bzw. 24 Stunden inkubiert. Die Vitalität wurde in einem ersten Ansatz anhand der LDH-Freisetzung in den Gewebekulturüberständen bestimmt (Abbildung 13).

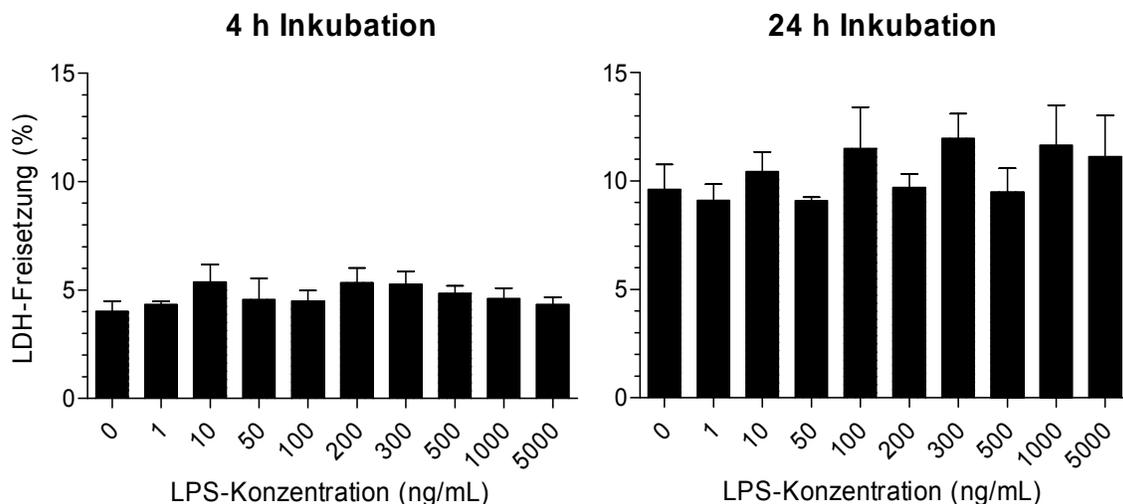


Abbildung 13: LDH-Freisetzung in Abhängigkeit von LPS durch jeweils 4 PCLS/Well nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf den Gesamt-LDH-Gehalt von Triton-lysierten PCLS. MW \pm SEM, n=4

Nach 4 Stunden Inkubation lag die LDH-Freisetzung der unbehandelten PCLS nur mehr bei $4,0 \pm 0,5\%$. Im Verlauf der steigenden LPS-Konzentrationen bis maximal 5000 ng/mL blieben diese Werte weitgehend konstant.

Wie bei der 4-stündigen Inkubation hatte der Zusatz von LPS (1-5000 ng/mL) auch nach 24 h keine Auswirkung auf die Vitalität der Schnitte, erhöhte aber die LDH-Freisetzung um mehr als das Doppelte, z.B. bei den unbehandelten Kontrollschnitten auf $9,6 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$). Der direkte Vergleich der jeweiligen LPS-Konzentrationen

mit dem Tukey-Test ergab wie bei der Kontrolle signifikante Erhöhungen nach 24 h bei 300 ng/mL LPS ($p < 0,05$) und bei 100, 1000 und 5000 ng/mL LPS ($p < 0,01$). Fasst man alle Werte nach 4 h ($n=36$; $4,7 \pm 0,2\%$) und 24 h ($n=36$; $10,4 \pm 0,4$) zusammen, dann ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) zwischen den beiden Inkubationszeiten.

Um die Validität der Vitalitätstestung zu erhöhen, wurde ein zweiter Vitalitätstest, der WST1-Assay, eingeführt. Über den WST1-Assay kann die mitochondriale Aktivität lebender Zellen bestimmt werden.

Im Versuch wurden jeweils die entsprechenden PCLS aus der LDH-Messung verwendet: Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse mit Lungenschnitten, die 4 bzw. 24 Stunden inkubiert wurden.

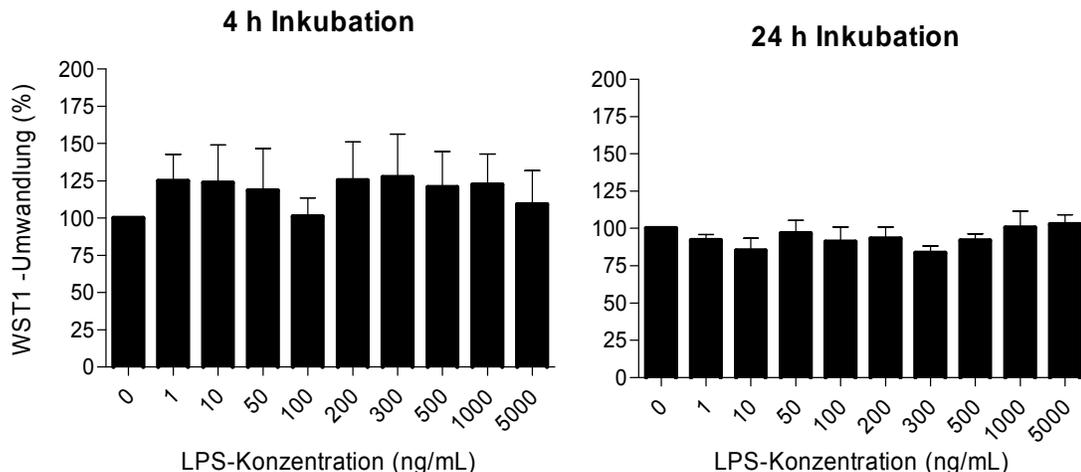


Abbildung 14: WST1-Umwandlung in Abhängigkeit von LPS durch jeweils 4 PCLS/Well nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham. Die Ergebnisse beziehen sich prozentual auf die WST1-Umwandlung in unbehandelten Kontrollschnitten (100%). MW \pm SEM, $n=4$

Die WST1-Umwandlung von unbehandelten Lungenschnitten war nach 24 h Inkubation ($0,93 \pm 0,04$ OD) nicht erniedrigt, sondern 1,7-fach höher als nach 4-stündiger Inkubation ($0,56 \pm 0,05$ OD versus; $p < 0,001$). Die Mittelwerte wurden auf jeweils 100% festgesetzt und der Einfluss eines Zusatzes von LPS (1-5000 ng/mL) relativ zur Kontrolle dargestellt. Es zeigte sich, dass wie auch bei der LDH-Freisetzung LPS keine Auswirkung auf die WST-Umwandlung haben.

4.1.4 Vitalitätsbestimmung über einen Zeitraum von 0 bis 72 Stunden

Um einen Überblick darüber zu bekommen, wie lange die Lungenschnitte kultiviert werden können, wurde die LDH-Freisetzung in den Gewebekulturüberstand nach 0, 4, 24, 48 und 72 Stunden bestimmt.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse aus der Vitalitätsbestimmung über einen Zeitraum von 0 bis 72 Stunden. Zum Zeitpunkt 0 lag die LDH-Freisetzung bei $1,7 \pm 0,5\%$. Nach 4-stündiger Inkubation zeigte sich eine Freisetzung von $3,8 \pm 0,9\%$, die nach 24 Stunden auf $5,5 \pm 1,7\%$ stieg. Mit $13,0 \pm 6,0\%$ bei 48 Stunden zeigte sich nahezu eine Verdopplung der LDH-Freisetzung, die dann bei der 72-stündigen Inkubation nur noch geringfügig weiter auf $14,9 \pm 6,6\%$ anstieg. Die Pearson-Korrelation ergab eine signifikante Abhängigkeit von der Zeit ($p < 0,01$), die Werte nach 48 und 72 Stunden Inkubation unterschieden sich signifikant von der Kontrolle ($p < 0,05$).

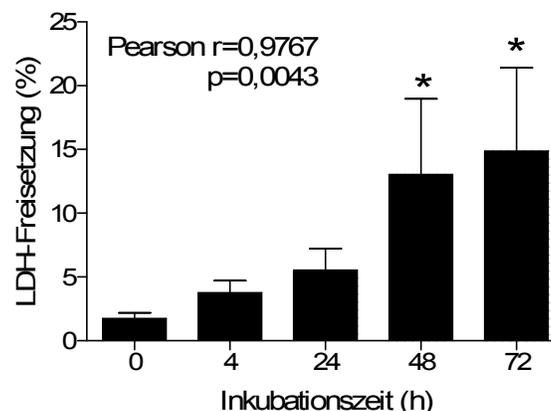


Abbildung 15: LDH-Freisetzung durch jeweils 4 PCLS/Well nach Inkubation in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham für 0, 4, 24, 48 und 72 Stunden. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf den Gesamt-LDH-Gehalt von Triton-lysierten PCLS. MW \pm SEM, n=4; *:signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$)

4.1.5 Bestimmung des Gewichts und Proteingehalts der PCLS

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die präparierten PCLS minimal in Größe und Gewicht unterscheiden, sollte in den folgenden Untersuchungen eine mögliche Korrelation zwischen Vitalität und dem Gewicht sowie der Gesamtproteinmenge der PCLS betrachtet werden.

Hierzu wurde zunächst nach der in 3.3.3.5 erwähnten Methode das Gewicht der PCLS bestimmt. Um vergleichbare Versuchsbedingungen wie in den vorangegangenen Versuchen zu schaffen, wurden die Lungenschnitte wieder mit aufsteigenden LPS-Konzentrationen behandelt. Es wurden pro LPS-Konzentration 4 PCLS in

500 μ L Medium (DMEM/F-12 Ham) inkubiert. Nach einer 4-stündigen Inkubation im Brutschrank wurde die LDH-Freisetzung in den Gewebekulturüberstand bestimmt (Abbildung 16) und anschließend der Proteingehalt (siehe 3.3.3.3) ermittelt.

Das Gewicht der 4 PCLS zeigte sich als konstant. Die unbehandelten Kontrollen wogen $0,045 \pm 0,003$ g. Die restlichen Werte blieben in einem einheitlichen Bereich von 0,045 g bis 0,056 g.

Der Proteingehalt der unbehandelten Kontrolle lag nach 4-stündiger Inkubation bei 0,9 mg/mL und veränderte sich mit Werten von 0,8 - 1,2 mg/mL mit steigenden LPS-Konzentrationen nicht.

Die LDH-Freisetzung unterlag einer größeren Streuung. Sie betrug nach 4 h Inkubation bei den unbehandelten Kontrollen 2,4%. Die geringste LDH-Freisetzung lag mit 0,9% bei 500 ng/mL LPS und die höchste mit 2,7% bei 0,05 ng/mL LPS. Es bestand keine Korrelation zwischen der LDH-Freisetzung und dem jeweiligen Gewicht oder Proteingehalt.

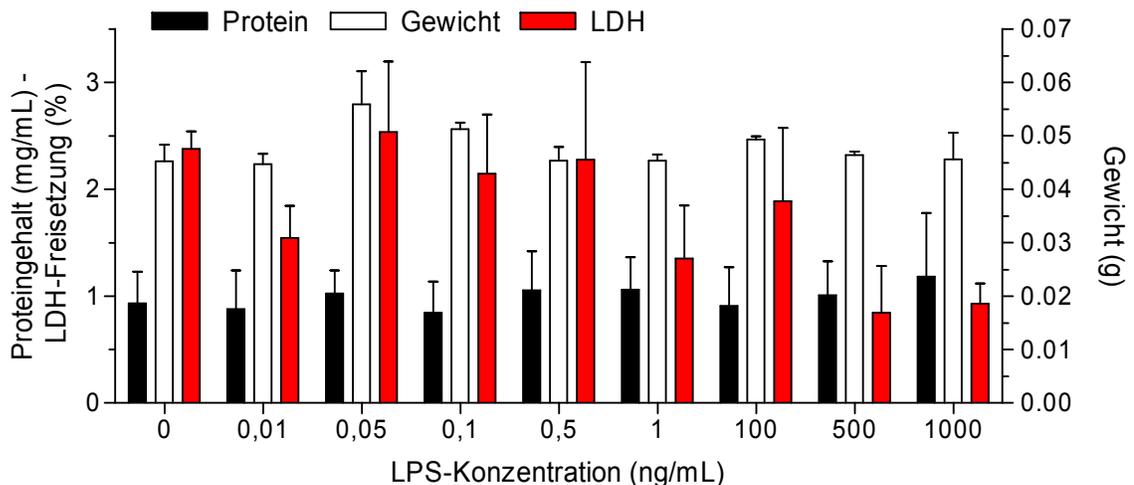


Abbildung 16: Durchschnittliche Gewichte (g) und Proteingehalte (mg/mL) von jeweils 4 PCLS/Well, sowie LDH-Freisetzung nach 4 h Inkubation in Stunden in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham mit steigenden LPS-Konzentrationen. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf den Gesamt-LDH-Gehalt von Triton-lysierten PCLS. MW \pm SEM, n=4

4.2 Bakteriellens LPS als Auslöser einer lokalen Immunreaktion in den PCLS

4.2.1 Bestimmung der durch LPS verursachten Zytokinausschüttung

LPS als bakterielles Endotoxin kann eine lokale Immunreaktion in der Lunge auslösen. Es kommt zur Aktivierung von Monozyten und Alveolarmakrophagen, die daraufhin pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- α und IL 8 ausschütten.

Die Möglichkeit, PCLS in immuntoxikologischen Studien nutzen zu können, sollte anhand dieser Eigenschaft von LPS untersucht werden (Abbildung 17).

Wurden die Schnitte 4 Stunden kultiviert, zeigte sich bei den Kontrollschnitten eine TNF- α -Ausschüttung von 159 ± 66 pg/mL. Diese erhöhte sich nur unwesentlich bis 200 ng/mL LPS, um dann bei 300 ng/mL LPS sprunghaft auf 605 ± 44 pg/mL anzusteigen. Von 500 bis 5000 ng/mL LPS stellte sich ein weiterer kontinuierlicher Anstieg von 684 ± 93 pg/mL auf 982 ± 80 pg/mL dar. Über den gesamten Konzentrationsverlauf ergab sich eine signifikante Korrelation (Pearson $r=0,7550$; $p<0,05$).

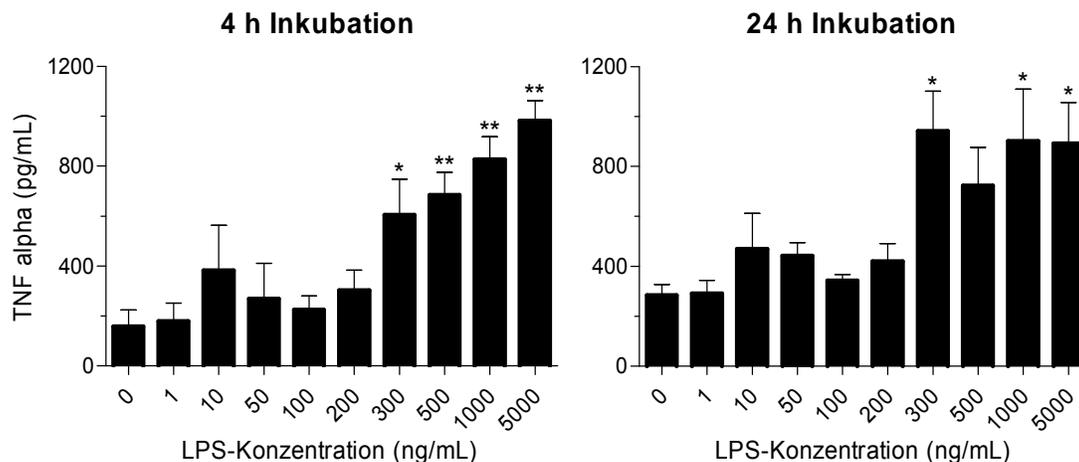


Abbildung 17: Ausschüttung von TNF- α durch jeweils 4 PCLS/Well in Abhängigkeit von LPS nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation. MW \pm SEM, $n=3-7$; *, **: signifikant verschieden von der Kontrolle, $p<0,05$ (*) und $p<0,01$ (**)

Nach 24 Stunden Inkubation war die TNF- α -Ausschüttung der Kontrollschnitte gegenüber der 4-stündigen Inkubation auf 284 ± 44 pg/mL erhöht (nicht signifikant). Wie schon bei den 4 h-Werten ergab sich auch nach 24 h kein wesentlicher Anstieg bis 200 ng/mL LPS, sondern wieder ein sprunghafter Anstieg bei 300 ng/mL LPS auf 942 ± 160 pg/mL. Der weitere Anstieg der TNF- α -Ausschüttung mit höheren LPS-

Konzentrationen blieb aber nach 24 h Inkubation aus. Es ergab sich keine signifikante Korrelation (Pearson $r=0,5608$).

Der Wert der IL-8-Ausschüttung bei einer 4-stündigen Inkubation lag bei den unbehandelten Kontrollschnitten und bei 1 ng LPS unterhalb des Detektionslimits des ELISA (Abbildung 18). Ab 100 ng/mL LPS mit 26 ± 11 pg/mL konnten Werte gemessen werden. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der IL-8-Ausschüttung (Pearson $r=0,8146$; $p<0,01$) mit Werten von 79 ± 27 , 126 ± 46 und 175 ± 51 pg/mL bei 1000, 5000 und 20 000 ng/mL LPS.

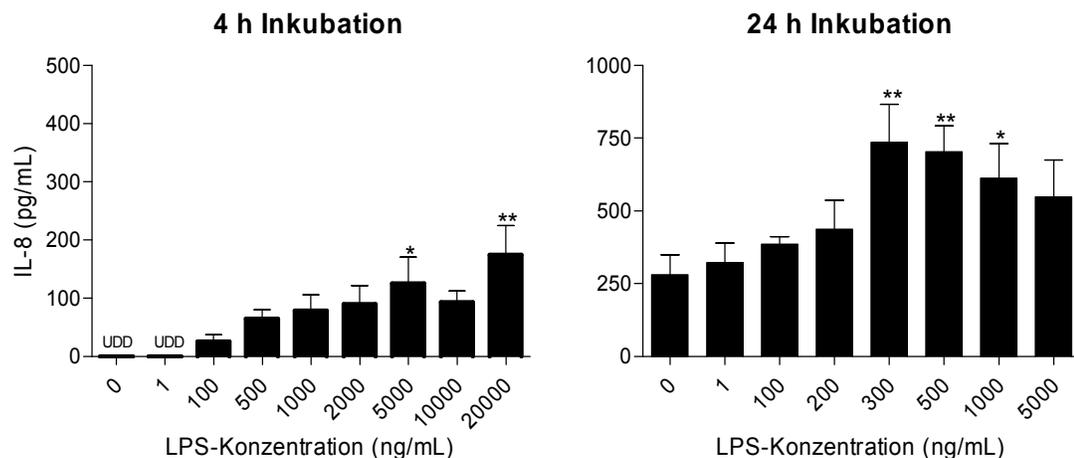


Abbildung 18: Ausschüttung von IL-8 durch jeweils 4 PCLS/Well in Abhängigkeit von LPS nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation. MW \pm SEM, n=6; *, **: signifikant verschieden von der Kontrolle, $p<0,05$ (*) und $p<0,01$ (**); UDD: Wert unterhalb des Detektionslimits.

Wurden die Schnitte über 24 Stunden inkubiert, lag die IL-8-Ausschüttung schon bei der Kontrolle bei 287 ± 68 pg/mL und stieg zunächst kontinuierlich bis auf 437 ± 99 pg/mL bei 200 ng/mL LPS an, ohne Signifikanz gegenüber der Kontrolle zu erreichen. Bei 300 ng/mL LPS zeigte sich ein sprunghafter Anstieg des IL-8 auf 736 ± 131 pg/mL ($p<0,01$), jedoch mit weiter steigenden Konzentrationen wieder ein kontinuierlicher Abfall, bis sich bei 5000 ng/mL keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle mehr darstellte. Es ergab sich keine signifikante Korrelation (Pearson $r=0,2337$).

Der direkte Vergleich der entsprechenden LPS-Konzentrationen ergab für die IL-8-Ausschüttung jeweils signifikant erhöhte Werte nach 24 h gegenüber 4 h Inkubation.

4.3 Intratracheale Instillation von Nanopartikeln

4.3.1 Charakterisierung der Nanopartikel

Die Ermittlung des Durchmessers der Partikel erfolgte im Elektronenmikroskop und lag bei 60 bis 70 nm (Abbildung 19).

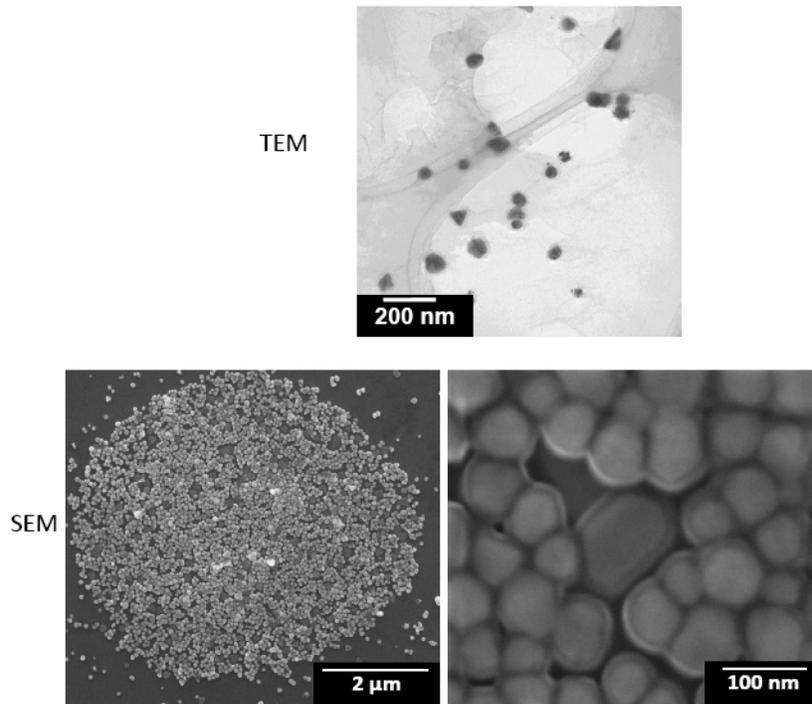


Abbildung 19: Elektronenmikroskopisches Bild der Silberpartikel

Der hydrodynamische Durchmesser betrug 69 nm (Abbildung 20). Das Zeta-Potenzial, welches ein Maß für die elektrische Ladung der Partikel in wässriger Lösung ist, lag im Mittelwert bei -25,4 mV.

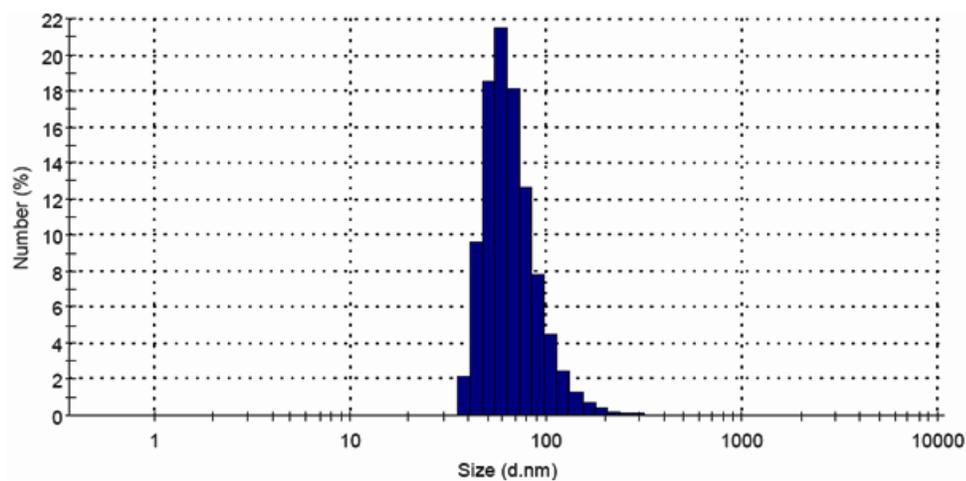


Abbildung 20: Hydrodynamischer Durchmesser bestimmt im Malvern Zeta Sizer

4.3.2 Vitalitätsmessung

In den vorangegangenen Versuchen wurde mit den PCLS ein System etabliert, mit dem Toxizität und Entzündungsgeschehen erfolgreich dargestellt werden können. Auf der Basis der bereits gewonnenen Erkenntnisse sollte nun der Einfluss von Silber-Nanopartikeln auf die Vitalität und die LPS-abhängige Zytokinausschüttung der Gewebeschnitte untersucht werden.

Ratten wurden 50 µg Ag-Nanopartikel instilliert. Nach 24 Stunden wurden die Tiere euthanasiert und die PCLS hergestellt. Als Kontrolle dienten Ratten, die mit dem Lösungsmittel instilliert wurden. Nach 4 Stunden Inkubation der PCLS mit steigenden Konzentrationen von LPS wurde die Vitalität über die LDH-Freisetzung und die WST1-Umwandlung bestimmt (Abbildungen 21 und 22).

Die LDH-Freisetzung der PCLS betrug bei Kontrollratten $7,2 \pm 1,5\%$ und veränderte sich nicht durch Zusatz steigender LPS-Konzentrationen. Nach Instillation der Nanopartikel zeigten die Kontrollschnitte, die nicht mit LPS behandelt wurden, eine geringere LDH-Freisetzung von $4,1 \pm 0,5\%$, die ebenfalls durch LPS-Zugabe nicht verändert wurde. Die Unterschiede zwischen den PCLS von Ratten, die nur Lösungsmittel erhielten, und Ratten, die mit Ag-Nanopartikeln instilliert worden waren, zeigte keine statistische Signifikanz.

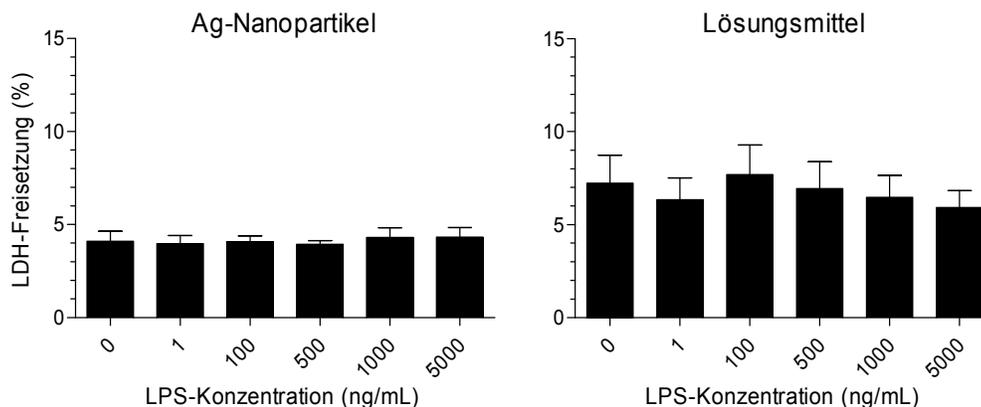


Abbildung 21: Vitalität anhand der LDH-Freisetzung in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS/Well von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen 50 µg Ag-Nanopartikel oder 80 µL Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf den Gesamt-LDH-Gehalt von Schnitten, die mit Triton X-100 lysiert wurden. MW \pm SEM, n=4

Auch bei der in Abbildung 22 gezeigten WST1-Umwandlung blieben die Werte auf einem einheitlichen Niveau. Es ergab sich keine Verschlechterung der Vitalität durch die LPS-Belastung nach der Instillation der Ag-Nanopartikel oder des Lösungsmittels.

Die Werte streuten relativ zur Kontrolle (kein LPS = 100%) von $101 \pm 6\%$ bis $121 \pm 9\%$ (Ag-Nanopartikel) und von $95 \pm 14\%$ bis $110 \pm 16\%$ (Lösungsmittel). Bei den Kontrollwerten ergab sich eine n.s. erhöhte WST1-Umwandlung in den PCLS von Ratten, die mit dem Lösungsmittel behandelt wurden ($1,15 \pm 0,26$ OD), gegenüber Ratten, die mit Ag-Nanopartikel instilliert worden waren ($0,61 \pm 0,05$ OD).

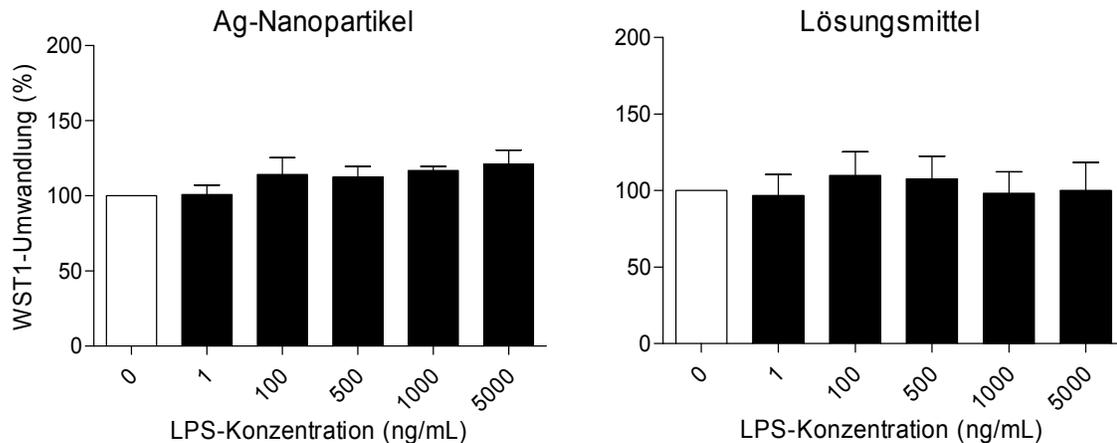


Abbildung 22: Vitalität anhand der WST1-Umwandlung in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS/Well von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen $50 \mu\text{g}$ Ag-Nanopartikel oder $80 \mu\text{L}$ Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. Die Ergebnisse beziehen sich prozentual auf die WST1-Umwandlung von unbehandelten Kontrollschnitten (100%). MW \pm SEM, n=4

4.3.3 Bestimmung der Zytokinausschüttung

In den nachfolgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob Nanopartikel einen Einfluss auf die LPS-induzierte Zytokinausschüttung besitzen.

Den Ratten wurden nach der in 3.3.4 beschriebenen Methode $50 \mu\text{g}$ Ag-Nanopartikel und zur Kontrolle mit $80 \mu\text{L}$ des Lösungsmittels intratracheal instilliert. Nach 24 Stunden wurden die Tiere euthanasiert und die PCLS wie in 3.3.1 beschrieben hergestellt. Die Schnitte wurden anschließend 4 Stunden mit steigenden LPS-Konzentrationen inkubiert und die Ausschüttung von TNF- α und IL-8 bestimmt.

Die TNF- α -Ausschüttung (Abbildung 23) lag in PCLS von Ratten nach Nanopartikelinstillation bei den Kontrollschnitten, die nicht mit LPS behandelt worden waren, bei 287 ± 132 pg/mL. Es konnte ein Anstieg der Ausschüttung mit steigenden LPS-Konzentrationen festgestellt werden, der ab 500 ng/mL LPS mit 1194 ± 131 pg/mL Signifikanz gegenüber der Kontrolle erreichte und bei Belastung mit 1000 ng/mL LPS mit 1382 ± 182 pg/mL maximal war. Die Pearson-Korrelation ergab keine signifikante Abhängigkeit von der LPS-Konzentration.

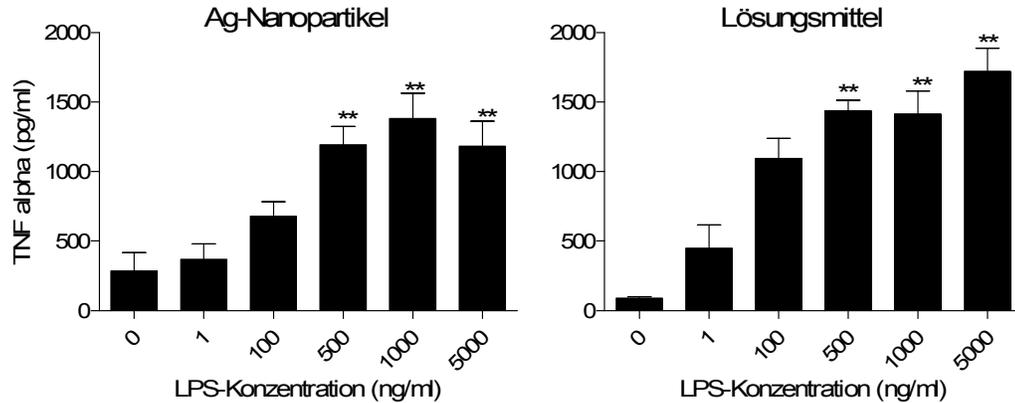


Abbildung 23: Ausschüttung von TNF- α in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS pro Well von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen 50 μ g Ag-Nanopartikel oder 80 μ L Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. MW \pm SEM, n=4; **: signifikant verschieden von der Kontrolle, $p < 0,01$

In PCLS von Ratten nach Instillation des Lösungsmittels lag die TNF- α -Ausschüttung bei den Kontrollschnitten bei 91 ± 10 pg/mL, erreichte wieder bei 500 ng/mL LPS mit 1439 ± 76 pg/mL Signifikanzniveau. Die Pearson-Korrelation ergab keine signifikante Abhängigkeit von der LPS-Konzentration.

Die IL-8-Ausschüttung ergab die gleichen Ergebnisse (Abbildung 24). Auch hier wurden signifikante Erhöhungen ab einer LPS-Konzentration von 500 ng/mL in Schnitten von Ratten sowohl nach Instillation der Ag-Nanopartikel als auch des Lösungsmittels festgestellt. In der Pearson-Korrelation ergab sich jeweils keine signifikante Abhängigkeit von der LPS-Konzentration.

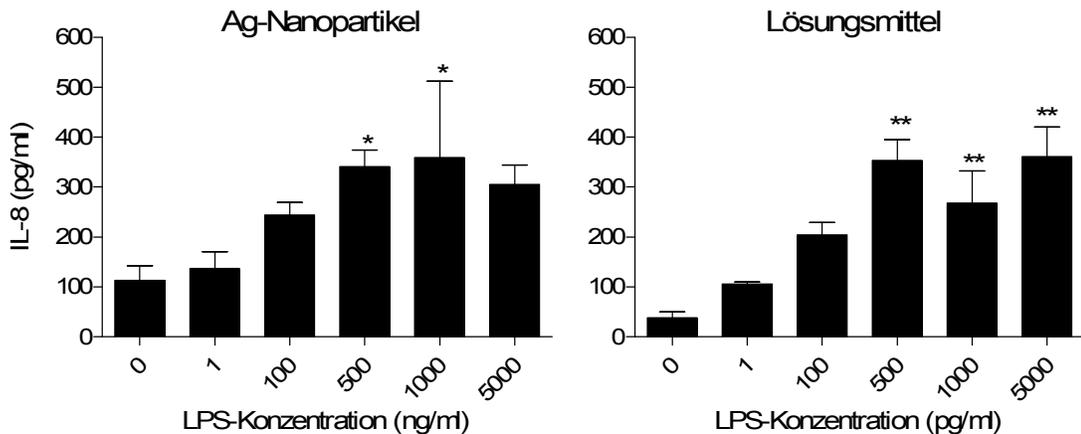


Abbildung 24: Ausschüttung von IL-8 in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS pro Well von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen 50 μ g Ag-Nanopartikel oder 80 μ L Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. MW \pm SEM, n=4; *, **: signifikant verschieden von der Kontrolle, $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**)

4.3.4 Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der Zytokinausschüttung

Die Grundidee dieser Arbeit war es, ein System mit Lungengewebeschnitten zu etablieren, mit welchen es möglich ist, die toxikologische Wirkung von Substanzen, insbesondere von Nanopartikeln, darzustellen. Hierbei sollte besonders betrachtet werden, wie sich Nanopartikel auf eine durch LPS ausgelöste Entzündung auswirken.

Die Abbildung 25 fasst die Ergebnisse zur Zytokinausschüttung in PCLS nach 4 h Inkubation mit LPS-Konzentrationen von 1-5000 ng/mL zusammen.

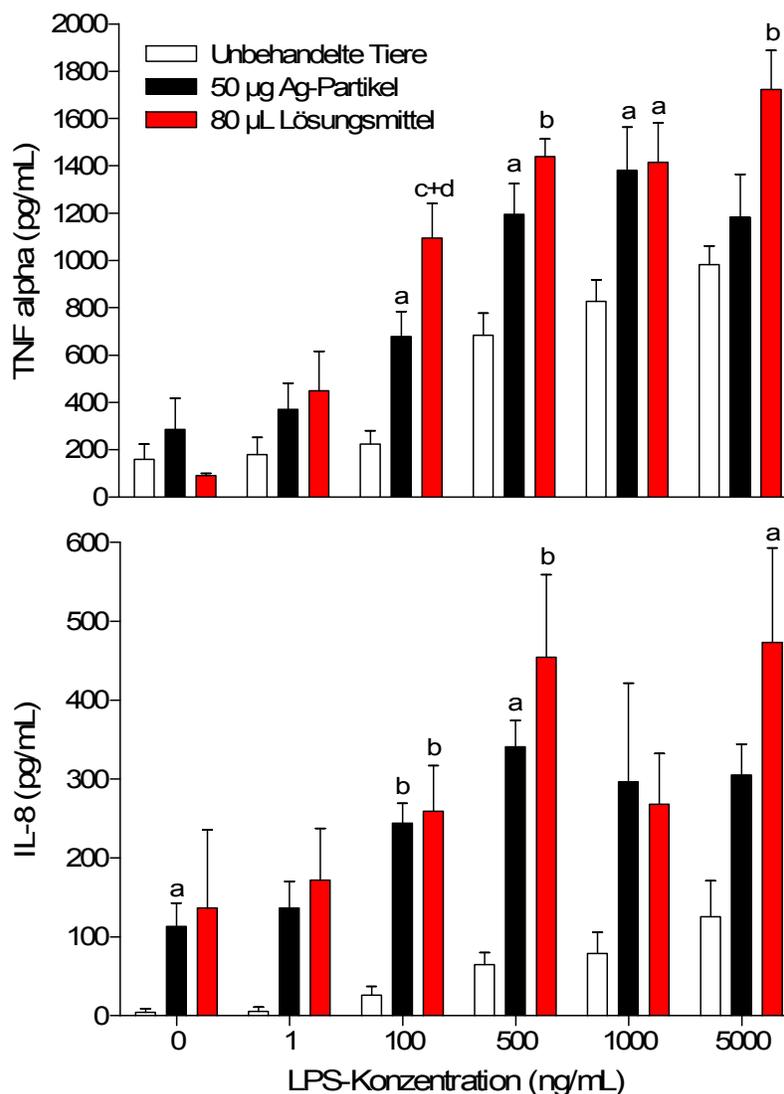


Abbildung 25: Ausschüttung von TNF- α (oben) und IL-8 (unten) in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS pro Well von unbehandelten Ratten und von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen 50 μ g Ag-Nanopartikel oder 80 μ L Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. MW \pm SEM, n=4; a,b,c: signifikant verschieden von den unbehandelten Ratten p<0,05 (a), p<0,01 (b) und p<0,001 (c); d: signifikant verschieden von den Ratten nach Nanopartikelinstillation p<0,05

Schnitte, die nicht mit LPS inkubiert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der TNF- α -Ausschüttung (Abbildung 25, oben). Unter Belastung der PCLS mit steigenden LPS-Konzentrationen erhöhte sich die Konzentration von TNF- α im Kulturüberstand bei den Schnitten von unbehandelten Ratten deutlich weniger als in den PCLS von Ratten, die mit Ag-Nanopartikeln oder auch nur mit dem Lösungsmittel behandelt worden waren. Die Unterschiede zu den PCLS von unbehandelten Ratten erreichten Signifikanzniveau bei einer LPS-Konzentration von 100 ng/mL. Hier war die relative Erhöhung am stärksten ausgeprägt, 3-fach bei Nanopartikelgabe und 5-fach nach Gabe des Lösungsmittels. Bei Belastung der PCLS mit 5000 ng/mL LPS war die TNF- α -Ausschüttung nur noch bei den Schnitten von Lösungsmittel-behandelten Ratten (1723 ± 166 pg/mL) signifikant um das 1,8-fache gegenüber PCLS von unbehandelten Ratten (982 ± 80 pg/mL, $p < 0,01$) erhöht.

Ohne LPS-Belastung lag die IL-8-Ausschüttung (Abbildung 25, unten) bei 3 von 4 PCLS der unbehandelten Tieren unterhalb der Detektionslimits des ELISA. Dagegen konnten in den PCLS von Nanopartikel- und Lösungsmittel-behandelten Ratten gleichermaßen deutlich erhöhte IL-8-Werte im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Wegen der hohen Streuungen erreichte nur der Unterschied zwischen den PCLS von Nanopartikel-behandelten und unbehandelten Ratten Signifikanz. Nach Belastung der PCLS mit 1 ng/mL LPS zeigte sich bei der IL-8-Ausschüttung ein vergleichbares Bild, es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei 100 ng/mL LPS war die IL-8-Ausschüttung in PCLS von unbehandelten Tiere (26 ± 11 pg/mL) knapp zehnfach geringer als in PCLS von Ratten, die mit Ag-Nanopartikeln (244 ± 25 pg/mL, $p < 0,01$) oder mit dem Lösungsmittel (259 ± 58 pg/mL, $p < 0,01$) behandelt worden waren. Trotz weiter bestehender großer Unterschiede erreichte wegen der hohen Streuungen in der IL-8-Ausschüttung nur noch bei Belastung der PCLS mit 5000 ng/mL der Unterschied zwischen Schnitten von unbehandelten Tieren (126 ± 46 pg/mL) und den PCLS von Lösungsmittel-behandelten Ratten (473 ± 120 pg/mL, $p < 0,05$) Signifikanz.

5 Diskussion

5.1 *Beurteilung der Methode zur Herstellung und Vitalerhaltung der PCLS*

5.1.1 Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen

Im ersten Schritt sollte geklärt werden, welche Versuchsbedingungen nötig sind, um die PCLS optimal zu kultivieren. Abbildung 12 zeigt, dass die Vitalität in den ersten Versuchen großen Schwankungen unterlag. Es konnte keine Abhängigkeit der Vitalität von der Inkubationszeit, der Anzahl der Lungenschnitte pro Well sowie dem Inkubationsvolumen dargestellt werden. Weiterhin war eine große Variabilität in den Versuchsgruppen gegeben.

Wurden die Schnitte nach dem gleichen Versuchsaufbau zusätzlich mit LPS behandelt, zeigte sich ein ähnliches Muster.

Im nächsten Schritt wurde deshalb der Versuchsaufbau an verschiedenen Stellen umgestaltet. Als Gründe für die hohe Streuung der Werte und die Verbesserung nach Versuchsumstellung können folgende Gesichtspunkte herangezogen werden:

- Der *Krumdieck Tissue Slicer* wurde in den Versuchen 4.1.1 und 4.1.2 mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllt. Die Schnitte verbleiben in dieser Lösung und fließen während des ungefähr viertelstündigen Schneidvorgangs in den Auffangbehälter. Erst nachdem die komplette Lunge geschnitten und genügend Schnitte vorhanden sind, werden die PCLS zur weiteren Verwendung in das Inkubationsmedium überführt. Während dieser Viertelstunde wurden die Schnitte in den ersten Versuchen nur mit Natriumchlorid versorgt. Es ist anzunehmen, dass eine längere Verweildauer in der Salzlösung zu einem größeren Stress der Schnitte führt. Die Earle's Balanced Salt Solution ist dagegen eine Lösung, die mit vielen Zusatzstoffen angereichert ist. Auf 100 mL Aqua dest. kommen 0,68 g NaCl, 0,04 g KCl, 0,02 g CaCl₂, 0,02 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,0125 g NaH₂PO₄ · H₂O, 0,22 g NaHCO₃, 0,1 g Glukose und 0,002 g Phenolrot [44]. Ab den Versuchen 4.1.3 konnten die Schnitte nunmehr während des Schneidvorgangs mit diesen vielfältigen Zusatzstoffen versorgt werden. Der Austausch der Salzlösung ab den Versuchen 4.1.3 könnte deshalb zu der höheren Vitalität und der höheren Reproduktionsrate beigetragen haben. Dies steht in Übereinstimmung mit verschiedenen Studien, in welchen sich Earle's

Balanced Salt Solution als gut verwendbare Lösung zeigte, um zum einen den Slicer damit zu füllen [45-47] und zum anderen die Schnitte direkt darin zu kultivieren [11].

- In den Versuchen 4.1.1 und 4.1.2 wurde zur Kultivierung der PCLS William's Medium verwendet. Bettina Lassnack konnte in ihrer Dissertation zeigen, dass sich dieses Medium zu Kultivierung von Gewebeschnitten eignet [48,49]. Dabei inkubierte sie für sechs Stunden jeweils einen Schnitt pro Well in William's Medium, wobei unter Zugabe von N'-Nitrosornicotin die LDH-Freisetzung zu den Zeitpunkten 0,5, 1,2, 2,5, 3,5 und 6 Stunden gemessen wurde. Bei der Lunge zeigte sich nach 0,5 Stunden eine LDH-Freisetzung von 10%, nach 3,5 Stunden von 24% und nach 6 Stunden von 43%. Diese Ergebnisse sind aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Bedingungen jedoch nicht eindeutig auf die Experimente, die dieser Dissertation zugrunde liegen, übertragbar. Nach Literaturrecherche wurde ab den Versuchen 4.1.3 DMEM/F-12 Ham zur Kultivierung der Schnitte verwendet. Henjakovic et al. [42] konnten in einer neueren Studie mit 33% eine deutlich geringere LDH-Freisetzung innerhalb von 48 Stunden erreichen, indem sie die PCLS in dem Gemisch aus DMEM/F-12 Ham kultivierten. Dieses Gemisch zeigte sich auch in weiteren Studien als gut geeignet für die Inkubation von Lungenschnitten [10,45,46].
- In den ersten beiden Versuchen (4.1.1 und 4.1.2) wurden Zuchtratten aus dem Physiologischen Institut der Medizinischen Fakultät der LMU München verwendet. Die Ratten waren alle im Alter von etwa acht Wochen. Das Gewicht dieser gleichaltrigen Tiere schwankte mit 180-330 g jedoch sehr stark. Um die Versuchsbedingungen zu standardisieren und damit reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden für die Versuche ab 4.1.3 Ratten von einem professionellen Züchter (Elevages Janvier) bezogen. Diese achtwöchigen weiblichen Tiere zeigten mit 180-200 g nur mehr geringe Gewichtsschwankungen.
- Aufgrund ihrer Konsistenz müssen die Rattenlungen mit Agarose gefüllt werden, um diese in gleichmäßig dünne Scheiben schneiden zu können. Die Instillation von Agarose/Medium-Gemischen fand in zahlreichen Studien als praktikable Methode zur Herstellung von Lungengewebeschnitten Verwendung [7,50,51]. In den Versuchen 4.1.1 und 4.1.2 wurde eine 1,5%-ige Agaroselösung benutzt, die mit Aqua dest. hergestellt worden war. Nach Literaturrecherche wurde ab 4.1.3

eine Agaroselösung verwendet, bei der eine 3%-ige Agaroselösung mit gleichen Teilen an doppelt konzentriertem Kulturmedium (DMEM/F-12 Ham) gemischt worden war. Wenn man davon ausgeht, dass die Agaroselösung innerhalb weniger Minuten erstarrt, sollte bei Verwendung von Aqua dest. ein zellschädigender Effekt aus osmotischen Gründen eigentlich auszuschließen sein. Dennoch könnte die Mischung der Agarose mit Medium und damit die bessere Versorgung mit Nährstoffen innerhalb der Strukturen eines Schnittes ebenfalls zur verbesserten Vitalität ab dem Versuch 4.1.3 beigetragen haben. So sprechen Placke et al. [5] davon, dass die Infusion des Agarose/Medium-Gemisches den Nährstoff- und Gasaustausch verbessert, weil es zum einen die verfügbare Oberfläche durch das Aufblähen der Lunge vergrößert. Zum anderen stellt es eine Matrix dar, durch welche die Nährstoffe dann hindurchdiffundieren können. Sie weisen dieser unterstützenden Struktur damit eine große Rolle für das erfolgreiche Kultivieren von Lungenschnitten zu. Im Kontrast dazu steht die Meinung von Wohlsen et al. [11], welche die Instillation von Agarose/Mediumlösung als Nachteil ansehen, wenn der Effekt von bronchokonstriktischen Substanzen anhand des ziliären Flimmerschlags dargestellt werden soll. Um zu vermeiden, dass die Agaroselösung Einfluss auf den Flimmerschlag nimmt, wuschen sie die Schnitte mehrmals. Über den Waschvorgang wird aber nicht nur die Agarose ausgewaschen, sondern es geht auch die physiologische Sekretschicht, die die Luft leitenden Wege auskleidet, verloren. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem dreimaligen Wechseln des Inkubationsmediums vor Beginn der eigentlichen Inkubation der Lungenschnitte ein gangbarer Kompromiss zwischen den beiden Vorgehensweisen gefunden.

Nach Umstellung aller genannten Versuchsbedingungen zeigte sich eine deutlich verbesserte Vitalität der PCLS, die sich mit geringer Streuung in konstant bleibenden niedrigen Werten in der LHD-Freisetzung manifestierte (Abbildung 13). Die LDH-Freisetzung der unbehandelten Kontrollschnitte lag nach 4 Stunden Inkubation unter 5% und wurde durch Zusatz steigender LPS-Konzentrationen kaum beeinflusst. Selbst nach einer 24-stündigen Inkubation lag die LDH-Freisetzung im Mittel noch unter 10%, wobei auch hier der Zusatz von LPS (1-5000 ng) keinen Einfluss auf die Vitalität hatte.

Die Ergebnisse der LDH-Freisetzung nach 4- bzw. 24-stündiger Inkubation stehen mit den von Wohlsen et al. [9] veröffentlichten Werten im Einklang. Sie kultivierten je

drei humane PCLS in 1 mL Medium und sahen, dass die LDH-Freisetzung in den ersten 24 Stunden unter 10% blieb. Auch die Inkubation von PCLS aus Meer-schweinchenlungen (3 PCLS in 1 mL Medium), wie sie von Ressemeyer et al. [52] durchgeführt wurde, ergab mit weniger als 10% LDH-Freisetzung nach 24 Stunden Inkubation vergleichbare Werte. Die Ergebnisse der LDH-Freisetzung nach der 4-stündigen Inkubation stehen weiterhin im Einklang mit den von Henjakovic et al. [42] veröffentlichten Werten. Diese Arbeitsgruppe des Fraunhofer Instituts in Hannover erzielte nach einer 4-stündigen Inkubation von 4 PCLS von Mäusen in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham eine LDH-Freisetzung von 6%.

Die Zugabe von LPS in steigenden Konzentrationen (1-5000 ng) zeigte in der vorlie-genden Arbeit keinen Effekt auf die Vitalität (Abbildung 13). Zu den gleichen Ergeb-nissen kamen auch Switalla et al. [46]. Sie inkubierten PCLS aus Humanlungen mit 5 bzw. 100 ng LPS in DMEM/F-12 Ham. Die Vitalität wurde anhand der Färbungen mit dem bis-Acetoxy-methylester von Calcein (Calcein-AM) und mit dem Ethidiumhomo-dimer-1 (EthD-1) bestimmt. Die fluoreszierenden Farbstoffe können lebende und tote Zellen nachweisen, die dann mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie betrachtet werden können. Calcein-AM ist eine zellmembranpermeable, nicht fluoreszierende Substanz, die im Zellinneren durch Esterasen zum grün-fluoreszierenden Calcein umgesetzt wird, wodurch das Zytoplasma lebender Zellen gefärbt wird. EthD-1 kann sich an DNA anlagern und über seine Fluoreszenz die Zellkerne toter Zellen markieren. Switalla et al. [46] sahen anhand der Fluoreszenzfärbung, dass die genannten LPS-Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollschnitten keinen Einfluss auf die Vitalität nach 24-stündiger Inkubation besitzen.

Im Kontrast zu den Ergebnissen mit Lungenschnitten stehen Zellkultur-Studien, bei denen zytotoxische Effekte von LPS festgestellt wurden. Yamamoto et al. [53] kultivierten Peritonealmakrophagen von Mäusen (1×10^5 Zellen/Well) mit 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS für 48 Stunden in einem Zellkulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum. Sie zeigten, dass die Vitalität, die anhand der mitochondrialen Aktivität über die Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT (MTT-Test) bestimmt wurde, nach 48 Stunden signifikant ab-nahm. Auch Arditi et al. [54] sahen einen zytotoxischen Effekt von LPS. Sie kultivier-ten Endothelzellen aus Rindergehirnen (3×10^5 Zellen/Well) in Zellkulturmedium mit und ohne Serumzusatz. Anhand des LDH-Austritts wurde die Vitalität nach 24 Stun-den Inkubation bestimmt. Sie konnten mit LPS-Konzentrationen von 1-1000 ng/mL im serumhaltigen Zellkulturüberstand eine Steigerung der LDH-Freisetzung und

damit Abnahme der Vitalität feststellen. Im Zellkulturüberstand, dem kein Serum zugesetzt war, fanden sie erst ab 1000 ng/mL LPS eine erhöhte Zytotoxizität. Ihre Ergebnisse führten sie darauf zurück, dass im Medium mit Serumzusatz ein LPS-bindendes Protein (LBP) vorhanden ist. LBP bindet LPS und der Komplex aus beiden führt über Zellrezeptoren schon bei geringeren LPS-Konzentrationen zu toxischen Effekten als bei LPS-Inkubation ohne Serum.

Der in der vorliegenden Arbeit ausgebliebene Effekt steigender LPS-Konzentrationen auf die Vitalität der PCLS könnte also dadurch begründet sein, dass dem Kulturmedium kein Serum zugesetzt und damit kein LPS-bindendes Protein vorhanden war. Somit konnte der LPS-LBP-Komplex zu keiner Zytotoxizität führen.

Der in den Ergebnissen dieser Dissertation bei den PCLS im Vergleich zu anderen *in vitro*-Studien fehlende Effekt steigender LPS-Konzentrationen auf die Zytotoxizität muss noch unter einem anderen Gesichtspunkt beleuchtet werden. So kann es beim Vergleich von PCLS und Zellkulturen zu unterschiedlichen Ergebnissen im Bezug auf die Toxizität von getesteten Substanzen kommen. Nassimi et al. [51] fanden heraus, dass bei der Bestimmung der Toxizität von so genannten "solid lipid nanoparticles" (SLN) die gleiche Konzentration an Partikeln bei der Kultivierung mit humanen Alveolarepithelzellen zu einer reduzierten Vitalität führt, bei der Kultivierung mit PCLS aber nicht. Sie begründeten ihre Ergebnisse damit, dass in den PCLS alle Zellen enthalten sind, die auch *in vivo* in der Lunge gefunden werden. Die Präsenz dieser Zellen und deren Potenzial, untereinander Einfluss nehmen zu können, könnte dafür verantwortlich sein, dass es im Bezug auf die SLN zu einer unterschiedlichen Sensitivität der PCLS im Vergleich zu definierten Zelllinien kommt. Das Vorhandensein aller physiologisch vorkommender Zellen könnte demnach einen Grund darstellen, warum sich die Ergebnisse der Zytotoxizität im Bezug auf LPS bei den PCLS und in der Zellkultur unterscheiden.

5.1.2 Einführung eines weiteren Vitalitätstestes

Die Notwendigkeit, mehr als einen Vitalitätstest zur Überprüfung von Zytotoxizität heranzuziehen, wurde von Wörle-Knirsch et al. [55] in ihrem Paper mit der markanten Überschrift "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays" deutlich herausgestellt. Carbon nanotubes, eine spezielle Form von Nanopartikeln, hielten demnach Wissenschaftler immer wieder zum Narren, wenn deren Einfluss auf die Zytotoxizität geprüft wurde. Die Forscher sahen, dass die Vitalität

von Zellen, die von humanen Lungenepithelien stammen, 24 Stunden nach Inkubation mit carbon nanotubes auf die Hälfte abgenommen hatte, wenn die Vitalität anhand des MTT-Tests bestimmt wurde. Wurde aber die Vitalität mit dem WST1-Test oder der LDH-Freisetzung bestimmt, zeigte sich keine Toxizität und alle Zellen überlebten. Die falsch negativen Ergebnisse aus dem MTT-Test rührten daher, dass die nanotubes mit dem unlöslichen MTT-Salz reagierten, nicht aber mit den anderen Testsubstanzen. Dies veranlasste die Autoren zu fordern, Ergebnisse aus Vitalitätsstudien immer mit mindestens zwei verschiedenen Tests zu belegen, damit valide Aussagen gemacht werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb neben der LDH-Freisetzung, die eventuelle Zellmembranschäden widerspiegelt, der WST1-Test verwendet, der die mitochondriale Aktivität von Zellen bestimmt. Die Tests setzen also an zwei verschiedenen Punkten an, um die Vitalität der PCLS zu beurteilen. Liefern beide Tests vergleichbare Ergebnisse, dann sollte man davon ausgehen können, dass die Resultate valide sind.

Auch bei der Vitalitätsbestimmung über den WST1-Test konnten keine signifikanten Veränderungen der Vitalität der PCLS nach Inkubation mit steigenden LPS-Konzentrationen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollschnitten gesehen werden (Abbildung 14). Die PCLS sind sowohl nach 4- als auch 24-stündiger Inkubation vital. Die Ergebnisse nach beiden Vitalitätstests sind damit valide.

Die mit LPS behandelten Schnitte bei der 4-Stunden-Kultivierung zeigen geringfügig höhere WST1-Werte als die unbehandelten Kontrollschnitte. Diese höhere metabolische Aktivität und damit scheinbar höhere Vitalität könnte darauf zurückzuführen sein, dass LPS einen Reiz auf die PCLS ausübt. Auf diesen Reiz hin wird in den Schnitten der Zellmetabolismus erhöht, was sich in hohen WST1-Werten widerspiegelt. Die mit LPS behandelten Schnitte sind also nicht vitaler als die unbehandelten, sie reagieren lediglich auf die Zugabe von LPS. Die trotz steigender LPS-Konzentrationen gleichbleibend hohe Vitalität steht im Einklang mit den Ergebnissen von Switalla et al. [46], wonach LPS keinen Einfluss auf die Vitalität von PCLS hat.

5.1.3 Bestimmung der Vitalität über einen Zeitraum von mehreren Tagen

Die Möglichkeit PCLS und Gewebeschnitte allgemein in toxikologischen Studien nutzen zu können, wurde schon 1994 von Fisher et al. [6] und 1995 von Gandolfi et al. [56] hinreichend belegt.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Möglichkeit über die Dauer von mehreren Tagen hinaus untersucht werden, um eine Aussage über die zu erwartende Vitalität von unbehandelten Kontrollschnitten treffen zu können.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Nach der Vorinkubation der Schnitte zu Beginn der Versuche betrug die LDH-Freisetzung durchschnittlich 1,7%, erhöhte sich nach 4-stündiger Inkubation auf 3,8% und steigerte sich weitgehend linear bis auf 15% nach 72 Stunden. Dieser moderate Anstieg zeigt, dass eine Kultivierung der PCLS über einen Zeitraum von mindestens 72 Stunden unter Erhalt einer hohen Vitalität möglich ist.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit drei unabhängigen Studien, die bestätigen, dass über einen Zeitraum von drei Tagen PCLS vital bleiben, auch wenn unterschiedliche Spezies, Mengen an Medium und eine unterschiedliche Anzahl an Schnitten verwendet wurden. So konnten Martin et al. [7] zeigen, dass bei einer 72-stündigen Inkubation von zwei PCLS aus Rattenlungen in 1 mL Medium die LDH-Freisetzung unter 20% bleibt. Sie konnten diese Ergebnisse anhand weiterer Vitalitätstests, wie der MTT-Reduktion und dem Thymidineinbau, bestätigen. Sie schlossen daraus, dass die PCLS nach 72 Stunden Kultivierung noch vital sind. Auch Wohlsen et al. [9] fanden nach Inkubation von jeweils drei PCLS aus menschlichen Lungen in 1 mL Medium vergleichbare Ergebnisse. Nach 24 und 72 Stunden blieb die LDH-Freisetzung unter 10% bzw. 15%. Sie konnten ihre Ergebnisse durch videomikroskopische Untersuchungen des ziliären Flimmerschlags untermauern. Auch dieser zeigte keine Veränderungen in der Frequenz über einen Zeitraum von 72 Stunden. Somit kamen auch diese Autoren zu dem Schluss, dass PCLS, in diesem Fall aus Humanlungen, über drei Tage vital bleiben. In der dritten Studie kultivierten Rössmeyer et al. [52] jeweils drei Schnitte aus Meerschweinchenlungen in 1 mL Medium. Die LHD-Freisetzung blieb bis 48 Stunden unter 10% und erreichte nach 72 Stunden Kultivierung gerade 17%. Rössmeyer et al. bestätigten ihre Ergebnisse anhand der Färbungen mit Calcein-AM und EthD-1, die bereits in 5.1.1 beschrieben wurde. Auch mit diesen Vitalitätsnachweisen zeigte sich, dass die PCLS über einen Zeitraum von drei Tagen vital bleiben.

Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse von Henjakovic et al. [42], die 4 PCLS aus Mäuselungen in 0,5 mL Medium inkubierten. Nach 24 Stunden betrug die LDH-Freisetzung bereits 21%, stieg nach 48 Stunden auf 33% an, erhöhte sich aber nach

72 Stunden (29%) nicht mehr. Sie schlossen aus diesen Ergebnissen, dass die Lungenschnitte von Mäusen nur über einen Zeitraum von 24 Stunden vital bleiben. Den statistisch nicht sicherbaren Abfall von 33% nach 48 Stunden auf 29% nach 72 Stunden (anstelle eines zu erwartenden weiteren Anstiegs der LDH-Freisetzung) erklärten die Autoren mit einer beginnenden Instabilität des Enzyms LDH. Selbst die Aussage, dass die PCLS mit 21% LDH-Freisetzung vital sind, mit 29% nach 72 Stunden jedoch nicht mehr, sollte differenziert betrachtet werden, da diese Unterschiede bei n=4 Versuchen pro Zeitpunkt nicht signifikant sind.

Die geschilderten unterschiedlichen Ergebnisse zur Vitalität von PCLS unter nahezu identischen Versuchsbedingungen sollten auch hinsichtlich eines weiteren Aspekts diskutiert werden. Wie bereits erwähnt, wurden vergleichbare Ergebnisse zur LDH-Freisetzung mit unterschiedlichen Spezies berichtet [7,9,52], welche die hier vorgelegten Ergebnisse bestätigen. Die geringere Vitalität der PCLS von Mäusen in der Arbeit Henjakovic et al. [42] könnte auch daran liegen, dass diese Mäuse von Charles River bezogen wurden, während in dieser Arbeit Ratten verwendet wurden, die von Elevages Janvier stammten. Im Vergleich von Tieren unterschiedlicher Züchter, konnte nach eigenen Erfahrungen festgestellt werden, dass sowohl Ratten als auch Mäuse von Janvier im Vergleich zu Tieren von Charles River eine doppelt so hohe Dosis an Narkosemitteln (als nach Herstellerangaben beschrieben) benötigen, um eine zufriedenstellende Narkosetiefe zu erreichen (Daten unveröffentlicht). Daraus könnte man ableiten, dass die höhere Widerstandskraft der Tiere von Janvier auf optimalere Aufzucht- und Haltungsbedingungen zurückzuführen ist. Es könnte sich aber auch in den langen Jahren der Zucht eine Spontanmutation im Zuchtstamm von Janvier hin zu einer höheren Widerstandskraft ergeben haben. Daten zu diesem Phänomen sind bisher nicht veröffentlicht, sollten aber Gegenstand künftiger Studien werden, um konkrete Aussagen treffen zu können. Wenn man dieses Phänomen betrachtet, könnte es eine Erklärung dafür sein, warum in der vorliegenden Arbeit die Schnitte über drei Tage vital blieben, dies unter identischen Versuchsbedingungen bei Henjakovic et al. [42] bei PCLS aus Mäusen von Charles River aber nicht der Fall war.

5.1.4 Bewertung der Ergebnisse aus der Protein- und Gewichtsbestimmung

Die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse zu Proteingehalt und Gewicht der PCLS zeigen eindeutig eine hohe Reproduzierbarkeit der hier verwendeten Methode. Es zeigte sich zudem eine einheitlich niedrige LDH-Freisetzung von 0,9 bis 2,7% nach 4 Stunden Inkubation mit steigenden Konzentrationen von LPS.

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde bereits in der Dissertation zur Untersuchung des Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins NNK in Gewebeschnitten von Mäusen, Ratten und Menschen von Johannes Engl beschrieben [57]. Er bestimmte den Proteingehalt eines Lungenschnittes mit der Methode nach Lowry et al. [58]. In dieser Arbeit wurden allerdings keine Präzisionsschnitte angefertigt, sondern aus den Lungen mit einem Skalpell ca. 1 mm dicke Streifen geschnitten. Unter Umgehung der knorpeligen Anteile wurden aus diesen Streifen quadratische Schnitte von ca. 2 x 2 mm Kantenlänge und 1 mm Dicke gewonnen. Das Gewicht pro Lungenschnitt betrug $3 \pm 0,5$ mg. Der Proteingehalt betrug mit ca. 10% des Feuchtgewichts $300 \mu\text{g}$. Für vier PCLS, für die der mittlere Proteingehalt in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde, würde das einen Proteingehalt von $900 \mu\text{g}$ bedeuten. Dieses Ergebnis liegt somit im Bereich der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werte. In der Arbeitsgruppe von Switalla wurde der Proteingehalt auf die gleiche Weise, wie in 3.3.3.3 beschrieben, bestimmt [42,46]. Die Werte wurden jedoch nicht veröffentlicht, sondern dienten nur der Normierung ihrer Daten, was sich im persönlichen Gespräch mit Dr. Switalla herausstellte.

5.1.5 LPS als Auslöser einer lokalen Immunreaktion in den PCLS

LPS ist ein Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien und gilt als Endotoxin. Es besteht aus einem A Lipid, einem Kern aus Oligosacchariden und einem O-Antigen Polysaccharid. Lipid A ist die reaktive Komponente, die bei Infektionen nachgewiesen werden kann [59]. Bei einer durch LPS-ausgelösten Entzündung werden von Makrophagen Zytokine (wie $\text{TNF-}\alpha$) und Chemokine (wie IL-8) ausgeschüttet. Dadurch kommt es zum Einstrom neutrophiler Zellen an den Ort der Entzündung [60]. Das Einatmen von Endotoxinen wie LPS steht im engen Zusammenhang mit arbeitsplatzbezogenen Lungenerkrankungen, die mit asthma-ähnlichen Symptomen einhergehen [61], aber auch mit der Entstehung von COPD [62].

In der vorliegenden Arbeit sollte die von LPS verursachte Entzündung anhand der dadurch ausgelösten Zytokinausschüttung in den PCLS gemessen werden. Diese

Ergebnisse sollen im Verlauf der Arbeit dann Rückschlüsse darauf zulassen, ob Nanopartikel einen Einfluss auf eine bereits bestehende Entzündung in der Lunge haben. Untersucht wurde dabei sowohl die TNF- α - als auch die IL-8-Freisetzung in den Gewebekulturüberstand. Solche Fragestellungen sind besonders wichtig, wenn nur geringe und relevante Nanopartikel-Konzentrationen untersucht werden. Die Nanopartikel-Konzentrationen unter realistischen *in vivo* Bedingungen, die sich beispielsweise am Arbeitsplatz nachweisen lassen, haben aller Voraussicht nach keinen direkten toxischen Effekt auf gesundes Gewebe. Vorgeschädigte Individuen könnten jedoch aufgrund einer bakteriellen Infektion sehr viel sensitiver auf inhalierte Nanopartikel reagieren.

5.1.5.1 TNF- α

Die in Abbildung 17 zusammengefassten Ergebnisse zu TNF- α zeigen, dass bereits unbehandelte Schnitte innerhalb von 4 und 24 Stunden Inkubation eine zeitabhängige, gut messbare Menge des Zytokins freisetzen. Die Belastung mit steigenden LPS-Konzentrationen hatte darauf bis 200 ng/mL keinen signifikanten Einfluss. Ab 300 ng/mL LPS konnte nach 4-stündiger Inkubation eine dosisabhängige Steigerung der TNF- α -Freisetzung festgestellt werden, während bei 24-stündiger Inkubation bei gleicher Konzentration bereits die maximale Ausschüttung von TNF- α durch die PCLS erreicht wurde.

Die Ergebnisse nach der 24-stündigen Inkubation sind vergleichbar mit Resultaten von Switalla et al. [46]. Sie inkubierten PCLS aus menschlichen Lungen mit 0, 2,5, 10, 100, 500 und 5000 ng/mL LPS. Ein signifikanter Anstieg in der TNF- α -Freisetzung war hier zwar schon bei 10 ng LPS erkennbar, doch zeigte sich wiederum keine Steigerung in der Zytokinausschüttung mehr ab 500 ng/mL LPS. Dagegen sah die gleiche Arbeitsgruppe in PCLS von Mäuselungen bereits eine signifikante Steigerung der Freisetzung von TNF- α in im Pikogrammbereich mit einer Dosisabhängigkeit von 31 bis 5000 pg/mL LPS [42].

In der TNF- α -Freisetzung durch PCLS zeigen sich also deutliche speziesspezifische Unterschiede in der Zytokinproduktion. Dies unterstreicht die Bedeutung der generellen Forderung, bei Toxizitätsprüfungen mehr als eine Spezies zu untersuchen. Die bei PCLS gegebene Möglichkeit, Ergebnisse mit Lungen von verschiedenen Versuchstieren direkt mit den Ergebnissen von menschlichen Lungen

zu vergleichen, stellt eine gute Möglichkeit dar, die Übertragbarkeit der Resultate von Tierversuchen auf den Menschen zu überprüfen [13].

5.1.5.2 IL-8

Die Freisetzung von IL-8 in den Gewebekulturüberstand wurde ebenfalls nach den Zeitpunkten von 4 und 24 Stunden bestimmt (Abbildung 18).

Nach 4-stündiger Inkubation konnte mit Hilfe des verwendeten ELISA-Testkits in un-behandelten und mit 1 ng/mL LPS belasteten PCLS keine IL-8-Freisetzung gemessen werden, da diese unterhalb des Detektionslimit lag. Die ab 100 bis 20 000 ng/mL erkennbare konzentrationsabhängige Steigerung der IL-8-Freisetzung erreichte in der Pearson-Analyse Signifikanz, die höchste Ausschüttung wurde eindeutig nach Belastung mit der höchsten LPS-Konzentration gesehen.

Nach 24-stündiger Inkubation war bereits bei unbehandelten Schnitten eine deutliche Ausschüttung von IL-8 messbar, die sogar über dem höchsten nach 4-stündiger Inkubation durch LPS stimulierbaren Ausmaß lag. Wie bei TNF- α war bis zu einer Belastung der PCLS mit 200 ng/mL LPS keine wesentliche Steigerung der IL-8-Ausschüttung gegenüber der Kontrollen gegeben. Ab 300 ng/mL LPS kam es wiederum zur maximalen Zytokinfreisetzung, die mit weiter steigenden LPS-Konzentrationen wieder abnahm und schließlich bei 5000 ng/mL gegenüber der Kontrolle keine Signifikanz mehr erreichte.

Die im Vergleich zu TNF- α geringe Aussagekraft der Ergebnisse von IL-8 nach 4-stündiger Inkubation könnte damit zu erklären sein, dass die Zellen erst mit einer zeitlichen Verzögerung beginnen IL-8 auszuschütten. Wie Driscoll et al. [60] in ihrem Übersichtsartikel darlegen, kommt es nach Stimulation durch LPS zunächst zur Aktivierung von Makrophagen. Diese schütten daraufhin TNF- α aus, welches seinerseits Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen zur Ausschüttung von IL-8 veranlasst. Es könnte daher sein, dass der Reiz, den LPS auf die PCLS ausübt, erst zu einem späteren Zeitpunkt als nach 4 Stunden zu einer gut messbaren IL-8-Freisetzung führt. So berichteten Booth et al. [63], dass sich in 500 μ m dicken, mit Adenovirus 7 stimulierten Schnitten aus Rinderlungen erst nach 12 Stunden eine signifikant höhere IL-8-Freisetzung im Vergleich zu unbehandelten Schnitten zeigt.

Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit. Auch hier konnte mit IL-8 erst nach 24-stündiger Inkubation ein vergleichbarer sprunghafter Anstieg der

Zytokinausschüttung gezeigt werden, wohingegen er mit TNF- α bereits nach 4-stündiger Inkubation verifiziert werden konnte.

5.2 ***PCLS und deren Reaktion auf Nanopartikel***

Die Notwendigkeit, die Toxikologie von Nanopartikeln zu untersuchen, wurde bereits aufgezeigt. Für die Beurteilung von Ergebnissen aus solchen toxikologischen Untersuchungen ist es von großer Bedeutung, die dabei verwendeten Konzentrationen an Nanopartikeln kritisch zu betrachten. Für die Vorhersage, ab welchen Konzentrationen eines bestimmten Nanopartikels im alltäglichen Leben toxische Effekte auftreten könnten, spielt das eine wichtige Rolle.

Ein Beispiel dafür zeigten Schleh et al. [64] in einer Studie, in der sie Ratten 6 Stunden lang 25 μg TiO₂-Nanopartikel/Na₂HPO₄ pro m³ (60% Na₂HPO₄, 40% TiO₂-Nanopartikel) inhalieren ließen. Dies führte zu einer effektiven Aufnahme von 60 μg TiO₂-Nanopartikeln in die Lunge, hatte aber keinen Effekt auf das pulmonale Surfactant. Dagegen setzten TiO₂-Nanopartikel in einer *in vitro* Präparation von Schweinelungen die Oberflächenspannung des pulmonalen Surfactants konzentrationsabhängig (50-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) herab. Hierauf berechneten sie hypothetisch die zu erwartende Partikelmenge, für den angenommenen Fall, dass sich ein Mensch 24 Stunden in einer Innenstadt an eine viel befahrene Straße stellen und Luft mit einer Partikelkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ einatmen würde. Nach ihrer Berechnung würden sich dabei ca. 360 μg Partikel in der gesamten Lunge und maximal 10 μg Partikel pro mL pulmonalem Surfactant in der Lunge befinden. In Anbetracht der Tatsache, dass dies eine rein hypothetische Berechnung ist, stellen die 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine sehr hohe Konzentration dar. Ein 24-stündiger Aufenthalt an einer viel befahrenen Straße dürfte kaum als realistisches Szenario erscheinen. Außerdem ist anzumerken, dass dabei alle Feinstaubpartikel mit einbezogen wurden, der Anteil an reinen Nanopartikeln jedoch viel geringer wäre. Im Vergleich wären also diese 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine viel geringere Konzentration als die 60 μg TiO₂-Nanopartikel, die im *in vivo*-Versuch keinen Effekt zeigten.

Diese Berechnung macht deutlich, dass toxische Effekte *in vitro* nicht die *in vivo*-Situation widerspiegeln. Es ist also von großer Bedeutung, dass toxikologische Untersuchungen mit möglichst geringen Konzentrationen durchgeführt werden, um deren Einfluss beurteilen zu können.

5.2.1 Beurteilung der Methode der intratrachealen Instillation der Nanopartikel

In der vorliegenden Arbeit wurde den Ratten 50 µg Silber-Nanopartikel intratracheal instilliert. Lipka et al. [65] zeigten, dass 24 Stunden nach intratrachealer Instillation von Gold-Nanopartikeln 30-50% der instillierten Partikel über die mucociliäre Clearance wieder aus der Lunge transportiert wurden, also physiologische Clearance-mechanismen gegeben sind. Überträgt man das auf die in dieser Arbeit instillierten 50 µg, so sind nach 24 Stunden noch 25-35 µg an Silberpartikeln in der Lunge vorhanden.

Die Herstellung der PCLS 24 Stunden nach der Instillation bietet somit den Vorteil, dass toxische Effekte in diesen PCLS die *in vivo*-Situation sehr gut widerspiegeln. Die Instillation bedeutet zwar zum einen Stress für die Tiere, zum anderen kann aber über die nachfolgende Herstellung von hunderten von PCLS aus einem Tier die Anzahl der Tiere, die für einen Versuch benötigt werden, reduziert werden.

5.2.2 Bestimmung der Vitalität anhand der LDH-Freisetzung und WST1-Reduktion

Die intratracheale Instillation von 50 µg Ag-Nanopartikeln zeigte keinen Effekt auf die Vitalität der PCLS. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit mit steigenden LPS-Konzentrationen (0-5000 ng) blieb die LDH-Freisetzung unter 5% (Abbildung 21) und auch der WST1-Test (Abbildung 22) zeigte gleichbleibend hohe Werte in der metabolischen Aktivität. Die Kontrolle, bei der Ratten 80 µL des Lösungsmittels der Ag-Partikel instilliert bekamen, zeigte vergleichbare Ergebnisse in der LDH-Freisetzung und WST1-Reduktion.

Der Kontrollversuch wurde durchgeführt, um abgrenzen zu können, ob eventuell auftretende toxische Effekte bezüglich der Vitalität durch die Nanopartikel hervorgerufen werden, oder ob solche auch schon bei der Instillation des Lösungsmittels auftreten.

Im Moment gibt es keine vergleichbare Studie, die sich mit der Reaktion von PCLS auf Silber-Nanopartikel beschäftigt hat. Es gibt jedoch zahlreiche andere Studien, die sich mit der Toxizität von Silber-Nanopartikeln *in vivo* und *in vitro* auseinandergesetzt haben. Diese sollen im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit vorhandene Ag-Nanopartikelmenge von 25-35 µg 24 Stunden nach Instillation verglichen werden.

Kim et al. [66] zeigten, dass die orale Gabe von Ag-Nanopartikeln (56 nm) konzentrationsabhängig zu toxischen Effekten führt. Über 90 Tage wurden Ratten wiederholt

drei verschiedene Dosen an Silberpartikeln (30, 125 und 500 mg/kg Körpergewicht) oral verabreicht. Sie fanden signifikante, dosisabhängige Änderungen der alkalischen Phosphatase und des Cholesterinspiegels im Blut. Des Weiteren trat Gallengangshyperplasie mit oder ohne Nekrose bei allen behandelten Tieren auf. Sie konnten zudem eine dosisabhängige Akkumulation von Silber in allen Geweben feststellen. Anhand der gefundenen Ergebnisse konnten sie 30 mg/kg Körpergewicht Ag-Nanopartikel als so genannten "no observable adverse effect level" (NOAEL) und 125 mg/kg Körpergewicht als "lowest observable adverse effect level" (LOAEL) festsetzen.

Zwei weitere Studien befassten sich mit der Inhalation von Silber-Nanopartikeln. Sung et al. [67] exponierten Ratten 4 Stunden lang einer geringen ($76 \mu\text{g}/\text{m}^3$), einer mittleren ($135 \mu\text{g}/\text{m}^3$) und einer hohen Dosis ($750 \mu\text{g}/\text{m}^3$) von Silber-Nanopartikeln (18-20 nm). Anschließend wurden die Tiere zwei Wochen lang beobachtet und zweimal pro Woche ein Lungenfunktionstest durchgeführt. Sie stellten keine signifikanten Veränderungen im Körpergewicht und dem Allgemeinbefinden fest. Zudem ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Lungenfunktionstest im Vergleich zu Kontrolltieren, die nur reiner Luft ausgesetzt waren. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die halb-maximale letale Konzentration (LC_{50}) nach einer Expositionszeit höher als $750 \mu\text{g}/\text{m}^3$ an Silber-Partikeln betragen muss. Die Berechnung der Partikelmenge, die nach 4-stündiger Inhalation von $750 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in den Lungen deponiert ist, kann folgendermaßen vorgenommen werden: Eine Ratte (70-115 Atemzüge/min, 0,6-2 mL Atemzugvolumen [68]) atmet im Mittel ca. 10 Liter Luft in der Stunde, das wären nach 4 Stunden also 40 Liter. Ein m^3 Luft entspricht der Menge von 1000 Litern. Wenn also $750 \mu\text{g}$ Partikel in 1000 Litern Luft als Aerosol vorliegen, atmet die Ratte in 4 Stunden mit den 40 Litern Luft $30 \mu\text{g}$ Partikel ein.

Einen ähnlichen Versuchsaufbau benutzten Ji et al. [69]. Auch sie exponierten Ratten mit steigenden Dosen an Silber-Nanopartikeln, mit dem Unterschied, dass hier die Tiere 28 Tage lang, jeweils 5 Tage die Woche und täglich 6 Stunden, den Partikeln ausgesetzt waren. Nach diesen 28 Tagen konnten sie auch mit der höchsten Konzentration von $61 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Ag-Partikeln keine signifikanten Veränderungen im Körpergewicht, in der Hämatologie und in der Blutchemie feststellen. Die effektiv vorhandene Menge nach 28-tägiger Inhalation von $61 \mu\text{g}/\text{m}^3$ lag hier bei $102 \mu\text{g}$ Ag-Partikeln.

Anhand der zwei *in vivo*-Studien, die keinen toxischen Effekt der Silber-Partikel zeigen konnten, erscheint es durchaus plausibel, dass die in der vorliegenden Arbeit 24 Stunden nach der Instillation noch vorhandenen 25-35 µg keinen zytotoxischen Effekt verursachten. Im Anbetracht dessen, dass es relevanter ist, toxische Effekte an geringen Mengen von Nanopartikeln zu testen, können die in der vorliegenden Arbeit verwendeten 50 µg Ag-Partikel für nachfolgende Dose-Response-Studien als guter Basiswert betrachtet werden.

Im Kontrast hierzu wird nachfolgend auf drei *in vitro*-Studien eingegangen, die durch Verwendung sehr hoher Konzentrationen von Silber-Nanopartikeln einen konzentrations- und größenabhängigen zytotoxischen Effekt aufzeigen konnten.

Carlson et al. [38] verwendeten in ihrer Arbeit Alveolarmakrophagen aus Ratten, die nach ihrer Ansicht eine *in vitro*-Methode darstellen, welche gut auf die *in vivo*-Exposition von Nanopartikeln übertragbar ist. Sie inkubierten diese Zellen 24 Stunden mit Ag-Partikeln, die sowohl in ihrer Größe (Ag-15 nm, Ag-30 nm, Ag-55 nm) als auch in ihrer Konzentration variierten. Die Vitalität der Zellen wurde mittels der LDH-Freisetzung und der Reduktion von MTT gemessen. Die LDH-Freisetzung stieg bei den kleineren Ag-15 nm- und Ag-30 nm-Partikeln signifikant ab einer Konzentration von 10 µg/mL, wohingegen Ag-55 nm die LHD-Freisetzung in einer Konzentration bis 75 µg/mL nicht signifikant steigerte. Auch beim MTT-Test zeigten sich größenabhängige Unterschiede: Die mitochondriale Funktion wurde bei Ag-15 nm ab 5 µg/mL, bei Ag-30 nm ab 10 µg/mL und bei Ag-55 nm ab 50µg/mL signifikant reduziert. Anhand dieser Ergebnisse ist gut zu erkennen, dass die Partikel mit abnehmender Größe zunehmend toxischer werden.

Auch in Keimbahn-Stammzellen aus Mäusen, die 48 Stunden Ag-15 nm-Partikeln ausgesetzt wurden, sahen Braydich-Stolle et al. [37] eine konzentrationsabhängige Zunahme der LDH-Freisetzung von 0-100 µg/mL und eine entsprechende Abnahme der mitochondrialen Aktivität.

Eine weitere Studie, die eine konzentrationsabhängige Steigerung der Toxizität anhand von Silber-Nanopartikeln *in vitro* zeigt, wurde von Greulich et al. [39] veröffentlicht. Sie kultivierten humane mesenchymale Stammzellen 7 Tage lang mit steigenden Konzentrationen an Ag-100 nm-Partikeln (0,5-50 µg/mL). Anhand der Färbung mit Calcein-AM zeigte sich, dass ab einer Konzentration von 3,5 µg/mL keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren.

Die Ergebnisse solcher *in vitro*-Studien, die mit sehr hohen Konzentrationen gearbeitet haben, spielen nur im Hinblick auf die gefundene Größenabhängigkeit der Zytotoxizität eine Rolle. Für die Übertragbarkeit auf die *in vivo*-Situation sind sie jedoch nicht relevant.

5.2.3 Ag-Nanopartikel und deren Einfluss auf die Zytokinausschüttung

Die Übertragbarkeit auf *in vivo* stand auch bei der Messung der Zytokinausschüttung in PCLS von Ratten im Vordergrund. Es sollte untersucht werden, ob Silber-Nanopartikel einen Einfluss auf eine bereits bestehende, durch LPS ausgelöste Entzündung haben. Dieser Einfluss sollte wieder an einer sehr geringen Konzentration untersucht werden, die selbst keinen zytotoxischen Effekt hatte. Diese Untersuchungen sollten Erkenntnisse für die Fragestellung liefern, ob bei der Verwendung von relevanten Konzentrationen an Nanopartikeln, die als zytotoxisch ungefährlich gelten und in der Nanotechnologie eingesetzt werden, es bei bereits erkrankten Individuen bzw. bereits bestehenden Entzündungsreaktionen zu toxischen Effekten kommen kann.

Aufgrund der Ergebnisse mit PCLS von unbehandelten Ratten wurde die Freisetzung der Zytokine nach 4 Stunden Inkubationszeit und mit LPS-Konzentrationen von 0, 100, 500, 1000 und 5000 ng/mL in den PCLS bestimmt.

5.2.3.1 TNF- α

In PCLS von Ratten, die 24 Stunden zuvor mit 50 μ g Ag-Nanopartikeln instilliert wurden, zeigte sich eine von der LPS-Konzentration (0-5000 ng) abhängige Steigerung der TNF- α -Ausschüttung (Abbildung 23). Bei 1000 ng LPS scheint hier ein Niveau erreicht zu sein, ab dem steigende LPS-Werte zu keiner weiteren Erhöhung der TNF- α -Ausschüttung führen.

Wurde den Ratten das Lösungsmittel zur Kontrolle instilliert, steigerte sich in den PCLS ebenfalls die TNF- α -Ausschüttung abhängig von der LPS-Konzentration, in der Tendenz sogar noch etwas stärker als nach Instillation der Ag-Nanopartikel.

In Abbildung 25 wurden nun die Ergebnisse mit denen verglichen, die zuvor mit PCLS von unbehandelten Ratten ermittelt wurden: Ab 100 ng LPS zeigten sich nach Partikelinstillation signifikant höhere Werte in der TNF- α -Ausschüttung als bei den PCLS aus Tieren, die keine Partikel erhielten. Die hierbei einzige Ausnahme war bei 5000 ng zu sehen, hier stellte sich zwischen beiden Gruppen keine Signifikanz dar.

Ab 100 ng LPS konnte ebenfalls eine signifikant höhere TNF- α -Ausschüttung nach Instillation des Lösungsmittels erkannt werden. Bei 100 ng LPS war dieser Wert auch signifikant höher als nach Partikelinstillation.

Den hier gezeigten Effekt, dass bereits der reine Instillationsprozess mit Lösungsmittel zu Entzündungssymptomen führt, wurde auch von Dörger et al. [70] gesehen, die Ratten 300 μ L eines Gemisches aus Asbestfasern und PBS oder zur Kontrolle nur PBS instillierten. In der 24 Stunden danach vorgenommenen bronchoalveolären Lavage zeigte sich, dass sowohl die Asbestfasern, als auch nur PBS zu einem Einstrom von neutrophilen Entzündungszellen in die Lunge geführt haben.

5.2.3.2 IL-8

Die Messung von IL-8 im Gewebekulturüberstand ergab zu TNF- α vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 24). Nach Instillation von 50 μ g Silber-Nanopartikeln kam es zu einer von der LPS-Konzentration abhängigen Steigerung der IL-8-Ausschüttung, die bei 500 ng/mL LPS Signifikanz gegenüber dem Kontrollwert erreichte und bis 5000 ng/mL LPS nicht mehr weiter anstieg.

Auch nach Instillation des Lösungsmittels stieg die IL-8-Ausschüttung wieder bis 500 ng/mL LPS konzentrationsabhängig an und blieb im Rahmen der Schwankungen, die in einem biologischen System wie den aus Ratten generierten PCLS, vorkommen können, auf diesem Niveau bis 5000 ng LPS. Im Gegensatz zu TNF- α war bei IL-8 aber besonders bei den niedrigen LPS-Konzentrationen eine Tendenz zu einer geringeren Ausschüttung bei den mit Lösungsmittel behandelten Ratten erkennbar. Ob solche Unterschiede real oder zufällig sind, könnte nur mit einer deutlich höheren Anzahl an Versuchen/Konzentration geklärt werden.

Im Vergleich zu den Ergebnissen mit PCLS von unbehandelten Ratten ergibt sich auch für die IL-8-Ausschüttung eine deutliche Erhöhung in PCLS von Tieren 24 Stunden nach Partikel- und Lösungsmittelinstillation (Abbildung 25). Die Unterschiede sind besonders in Abwesenheit von LPS und bei 1 ng/mL LPS deutlich, weil hier bei den meisten PCLS von unbehandelten Ratten noch kein IL-8 oberhalb der Nachweisgrenze im Kulturüberstand nachweisbar war. Für eine statistische Absicherung bedürfte es auch hier einer höheren Anzahl von Versuchen.

Die Gegenüberstellung zeigt auch hier deutlich, dass die Erhöhung der IL-8-Ausschüttung nicht durch die Ag-Partikel bedingt ist, sondern bereits nach Lösungs-

mittelinstitution auftritt. Wie bereits für TNF- α diskutiert, dürfte der Grund hierfür darin liegen, dass es generell nach Instillierung von Substanzen in die Lunge zu Entzündungsprozessen kommt.

5.3 Schlussfolgerung

Im Vergleich zu anderen Studien stellt die Instillation von 50 μg Silber-Nanopartikeln eine sehr geringe Konzentration dar. Dies ist aber für die Relevanz von toxikologischen Testungen im Bezug auf die Übertragbarkeit auf die *in vivo*-Situation besonders wichtig.

Die Instillation von 50 μg Silber-Nanopartikeln hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der PCLS. Des Weiteren konnte bei dieser Konzentration an Nanopartikeln kein Effekt auf eine bestehende, durch LPS ausgelöste Entzündungsreaktion gezeigt werden. Dies sollte Anlass geben, die Ergebnisse aus Zellkultur-Studien kritisch zu beurteilen.

Im Hinblick auf weitere toxikologische Testungen von Silber-Nanopartikeln könnten die Ergebnisse als solide Basis für die Festlegung eines "no observable adverse effect level" (NOAEL) nach pulmonaler Exposition dienen, ähnlich wie die Ergebnisse bei Kim et al. nach oraler Gabe [66].

Die PCLS erwiesen sich als *ex vivo*-System, das relativ robust auf *in vivo* verabreichte Ag-Nanopartikel reagiert. PCLS stellen somit einen Mittelweg dar, zwischen der Relevanz von *in vivo*-Studien einerseits und der Schonung von Tierleben andererseits.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein System zu etablieren, mit dem die toxikologische Testung von Nanopartikeln in dem Zielorgan Lunge möglich ist.

In einem ersten Schritt wurde die Herstellung von Lungenschnitten (Precision-Cut Lung Slices, PCLS) soweit optimiert, dass ein hohes Maß an Vitalität mit nur geringer Streuung der Werte erreicht werden konnte. Die Kultivierung von PCLS lieferte mit zwei verschiedenen Vitalitätstests, der Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) und der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (WST1-Assay), sowohl nach 4 als auch nach 24 Stunden gute Werte. Die Vitalität war nach beiden Inkubationszeiten hoch und ermöglichte so die Untersuchung auf toxische Effekte, selbst wenn sie nur zu geringen Vitalitätsverlusten führten. Die Messung der Vitalität über einen Zeitraum von mehreren Tagen zeigte, dass die PCLS auch bis zu 72 Stunden kultiviert werden können.

Die Bestimmung von Gewicht und Proteinmenge der PCLS zeigte eine gute Reproduzierbarkeit in der Herstellung der Schnitte.

Die Zugabe bakterieller Lipopolysaccharide (LPS) in das Inkubationsmedium hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der PCLS. Jedoch reagierten die PCLS auf die Stimulation mit LPS mit einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Zytokinausschüttung, gemessen anhand von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-8 (IL-8).

Im zweiten Schritt wurden die PCLS zur Beurteilung der Toxizität von Silber-Nanopartikeln herangezogen. Hierzu wurde Ratten in Narkose 50 μ g Ag-Nanopartikel oder zur Kontrolle nur 80 μ l des Lösungsmittels für die Suspension der Partikel intratracheal instilliert und nach Ablauf von 24 Stunden die PCLS hergestellt.

In beiden Tests hatte die Instillation von 50 μ g Ag-Nanopartikeln keinen Einfluss auf die Vitalität der PCLS.

Die LPS-induzierte Zytokinausschüttung wurde sowohl nach Instillation der Ag-Nanopartikel als auch des Lösungsmittels in gleicher Weise deutlich erhöht. Der Effekt war deshalb nicht auf die Nanopartikelbelastung zurückzuführen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die PCLS als relativ robustes *ex vivo*-System erwiesen. Die Ergebnisse mahnen zu kritischer Beurteilung von Studien mit Zellkulturen. PCLS stellen einen Mittelweg dar, zwischen der Relevanz von *in vivo*-Studien einerseits und der Schonung von Tierleben andererseits.

7 Summary

The aim of this study was to establish a system appropriate for toxicological testing of nanoparticles in the lung as main target organ.

In a first step, the production of precision-cut lung slices (PCLS) was optimized to achieve a high degree of viability with low variability. Using 2 test systems for assessment of viability, release of lactate dehydrogenase (LDH) and activity of mitochondrial dehydrogenases (WST1 assay) showed that cultivation of PCLS for 4 or 24 hours afford good values. After both incubation times viability was high enough to establish even low effects in toxicological tests. Determination of the viability of the PCLS over several days showed that cultivation of PCLS is possible for at least 72 hours.

Determination of weight and protein content of PCLS proved a high reproducibility in the preparation of the slices.

Addition of bacterial lipopolysaccharids (LPS) to the incubation medium did not affect slice viability. However, stimulation of PCLS with LPS resulted in a dose-related release of cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-8 (IL-8).

In the second step, the PCLS were used for toxicological testing of exposure to silver nanoparticles. For this, anaesthetised rats were instilled intratracheally with either a suspension of 50 μ g silver nanoparticles or for control with 80 μ l of solvent only. PCLS were prepared 24 hours after treatment.

Using both test systems, instillation of 50 μ g silver nanoparticles had no effect on the viability of the PCLS.

The LPS-induced release of cytokines was significantly increased by both the instillation of nanoparticles and instillation of the solvent. Therefore, this effect was not due to the nanoparticles.

In conclusion, PCLS proved to be a relatively stable *ex vivo* system. The results sound a note of caution for studies using cell cultures. PCLS are a compromise between the relevance of *in vivo* studies on the one hand and the protection of animal lives on the other hand.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht toxikologischer <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Testsysteme in Hinblick auf deren Komplexität und Spezifität.....	- 3 -
Abbildung 2:	Handbetriebenes Mikrotom aus dem Jahr 1980 nach Krumdieck et al. [4].....	- 5 -
Abbildung 3:	Größenverhältnis eines 10 nm Goldpartikels: 10 Millionen mal kleiner als ein Fußball, der ebenfalls 10 Millionen mal kleiner als die Erde ist. (aus Beckers et al. [16]).....	- 12 -
Abbildung 4:	Übersicht über das Vorkommen von Nanopartikeln im Alltag (aus Schulenburg [17]).....	- 15 -
Abbildung 5:	Der Weg von Partikeln nach inhalativer Aufnahme (aus Schwedt [26]).....	- 17 -
Abbildung 6:	Lunge nach Polymerisation der Agaroselösung und Ausstanzen eines Gewebezylinders	- 25 -
Abbildung 7:	PCLS im Kulturmedium.....	- 26 -
Abbildung 8:	Prinzip des „Cytotoxicity Detection Kits“: Das freigesetzte LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, wobei das Coenzym NAD ⁺ zu NADH/H ⁺ reduziert wird. Anschließend werden durch das Enzym Diaphorase die zwei Wasserstoff-Atome des NADH/H ⁺ auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid) übertragen, das sich zum Formazansalz rot färbt.	- 27 -
Abbildung 9:	Prinzip des WST1-Assay: Durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen wird das chromogene Tetrazoliumsalz WST1 (Natrium 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfafonat) reduktiv aufgespalten, wodurch ein wasserlösliches, rotes Formazansalz entsteht.....	- 28 -
Abbildung 10:	Prinzip des BCA Protein Assay Kit: A) Im alkalischen Medium kommt es zur Komplexbildung zwischen den Amid-Stickstoffen der Peptidbindungen und Cu ²⁺ -Kationen, wobei Cu ²⁺ zu Cu ⁺ reduziert wird (Biuret-Reaktion). B) Im zweiten Schritt bildet sich aus dem einwertigen Kupfer und zwei Molekülen der Bicinchoninsäure ein violetter Chelatkomplex.	- 29 -
Abbildung 11:	Intubation der Ratte und Instillation der Nanopartikel: Die Ratte hängt mit den Incisivi an einem Gummiband, das sich an einem im 60° Winkel stehenden Brett befindet. Unter Sichtkontrolle wird die flexible Braunüle in die Trachea vorgeschoben und mit einem Einatemzug die Partikel instilliert.	- 32 -
Abbildung 12:	LDH-Freisetzung durch PCLS nach 4 und 24 Stunden Inkubation in William's Medium. Es wurden jeweils 1, 2, 3 und 4 Schnitte in 0,5 mL bzw. 1 mL Medium inkubiert. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf den Gesamt-LDH-Gehalt von Triton-lysierten PCLS. MW ± SEM, n=3-4.....	- 34 -
Abbildung 13:	LDH-Freisetzung in Abhängigkeit von LPS durch jeweils 4 PCLS/Well nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf Gesamt-LDH-Gehalt von Triton-lysierten PCLS. MW ± SEM, n=4.....	- 36 -
Abbildung 14:	WST1-Umwandlung in Abhängigkeit von LPS durch jeweils 4 PCLS/Well nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham. Die Ergebnisse beziehen sich prozentual auf die WST1-Umwandlung in unbehandelten Kontrollschnitten (100%). MW ± SEM, n=4.....	- 37 -
Abbildung 15:	LDH-Freisetzung durch jeweils 4 PCLS/Well nach Inkubation in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham für 0, 4, 24, 48 und 72 Stunden. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf den Gesamt-LDH-Gehalt von Triton-lysierten PCLS. MW ± SEM, n=4; * signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)....	- 38 -
Abbildung 16:	Durchschnittliche Gewichte (g) und Proteingehalte (mg/mL) von jeweils 4 PCLS/Well, sowie LDH-Freisetzung nach 4 h Inkubation in Stunden in 0,5 mL DMEM/F-12 Ham mit steigenden LPS-Konzentrationen. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf den Gesamt-LDH-Gehalt von Triton-lysierten PCLS. MW ± SEM, n=4.....	- 39 -
Abbildung 17:	Ausschüttung von TNF-α durch jeweils 4 PCLS/Well in Abhängigkeit von LPS nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation. MW ± SEM, n=3-7; *, **: signifikant verschieden von der Kontrolle, p<0,05 (*) und p<0,01 (**).....	- 40 -
Abbildung 18:	Ausschüttung von IL-8 durch jeweils 4 PCLS/Well in Abhängigkeit von LPS nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation. MW ± SEM, n=6; *, **: signifikant verschieden von der Kontrolle, p<0,05 (*) und p<0,01 (**); UDD: Wert unterhalb des Detektionslimits.	- 41 -

Abbildung 19:	Elektronenmikroskopisches Bild der Silberpartikel	- 42 -
Abbildung 20:	Hydrodynamischer Durchmesser bestimmt im Malvern Zeta Sizer	- 42 -
Abbildung 21:	Vitalität anhand der LDH-Freisetzung in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS/Well von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen 50 µg Ag-Nanopartikel oder 80 µL Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. Die LDH-Freisetzung bezieht sich prozentual auf den Gesamt-LDH-Gehalt von Schnitten, die mit Triton X-100 lysiert wurden. MW ± SEM, n=4	- 43 -
Abbildung 22:	Vitalität anhand der WST1-Umwandlung in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS/Well von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen 50 µg Ag-Nanopartikel oder 80 µL Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. Die Ergebnisse beziehen sich prozentual auf die WST1-Umwandlung von unbehandelten Kontrollschnitten (100%). MW ± SEM, n=4	- 44 -
Abbildung 23:	Ausschüttung von TNF-α in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS pro Well von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen 50 µg Ag-Nanopartikel oder 80 µL Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. MW ± SEM, n=4; **: signifikant verschieden von der Kontrolle, p<0,01	- 45 -
Abbildung 24:	Ausschüttung von IL-8 in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS pro Well von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen 50 µg Ag-Nanopartikel oder 80 µL Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. MW ± SEM, n=4; *, **: signifikant verschieden von der Kontrolle, p<0,05 (*) und p<0,01 (**)	- 45 -
Abbildung 25:	Ausschüttung von TNF-α (oben) und IL-8 (unten) in Abhängigkeit von LPS nach 4 h Inkubation durch je 4 PCLS pro Well von unbehandelten Ratten und von Ratten, denen 24 h vor Entnahme der Lungen 50 µg Ag-Nanopartikel oder 80 µL Lösungsmittel intratracheal instilliert wurde. MW ± SEM, n=4; a,b,c: signifikant verschieden von den unbehandelten Ratten p<0,05 (a), p<0,01 (b) und p<0,001 (c); d: signifikant verschieden von den Ratten nach Nanopartikelinstillation p<0,05	- 46 -

9 Literaturverzeichnis

1. Mückter H (1997) Testmethoden. in: Taschenatlas der Toxikologie; pp 20-23; ed.: Reichl F-X, Stuttgart, Thieme Verlag
2. Reichl F-X Schwenk M (2004) Toxikodynamik-Tests. in: Regulatorische Toxikologie: Gesundheitsschutz, Umweltschutz, Verbraucherschutz; pp 124-131; eds: Reichl F-X Schwenk M; Berlin, Springer Verlag
3. Eckert R (2004) Experimentelle Methoden der physiologischen Forschung. in: Tierphysiologie; p 36; eds: Eckert R Randall D Burggren W French K; 4. Auflage, Stuttgart, Thieme Verlag
4. Krumdieck CL Dos Santos JE Ho KJ (1980) A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal.Biochem.* 104:118-123
5. Placke ME Fisher GI (1987) Adult peripheral lung organ culture - A model for respiratory tract toxicology. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 90:284-298
6. Fisher RL Smith MS Hasal SJ Hasal KS Gandolfi AJ Brendel K (1994) The use of human lung slices in toxicology. *Hum.Exp.Toxicol.* 13:466-471
7. Martin C Uhlig S Ullrich V (1996) Videomicroscopy of methacholin-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur.Respir.J.* 9:2479-2487
8. Wohlsen A Uhlig S Martin C (2001) Immediate allergic response in small airways. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 163:1462-1469
9. Wohlsen A Martin C Vollmer E Branscheid D Magnussen H Becker WM Lepp U Uhlig S (2003) The early allergenic response in small airways of human precision-cut lung slices. *Eur.Respir.J.* 21:1024-1032
10. Henjakovic M Martin C Hoymann HG Sewald K Ressmeyer AR Dassow C Pohlmann G Krug N Uhlig S Braun A (2008) Ex vivo lung function measurements in precision-cut lung slices (PCLS) from chemical allergen-sensitized mice represent a suitable alternative to in vivo studies. *Toxicol.Sci.* 10:444-453
11. Wohlsen A Hirrlinger A Tenor H Marx D Beume R (2009) Effect of cyclic AMP-elevating agents on airway ciliary beat frequency in central and lateral airways in rat precision-cut lung slices. *Eur.J.Pharmacol.* 653:177-183
12. Richter E Friesenegger S Engl J Tricker AR (2000) Use of precision-cut tissue slices in organ culture to study metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by hamster lung, liver and kidney. *Toxicology* 144:83-91
13. Richter E Engl J Friesenegger S Tricker AR (2009) Biotransformation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in lung tissue from mouse, rat, hamster, and man. *Chem.Res.Toxicol.* 22:1008-1017
14. Russel WMS Burch RL (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique.* London, UK, Methuen & Co.

15. DIMDI (2010) AnimAlt-ZEBET <http://www.dimdi.de/static/de/db/dbinfo/zt00.htm>
16. Beckers, J., Behrendt, H., Cyrus, J., Duggen, S., Frankenberger, M., Heinrich, J., Heyder, J., Kreyling, W., Maier, K., Matuschek, G., Meyer, T., Möller, W., Peters, A., Scheuch, G., Schulz, H., Wichmann, H. E., Wittmaack, K., Ziegler-Heitbrock, L., and Zimmermann, R. (2005) Aerosolforschung in der GSF <http://www.helmholtz-muenchen.de/neu/Aktuelles/Zeitschriften/Aerosole/Aerosolbroschuere.pdf>
17. Schulenburg, M. (2008) Nanopartikel - kleine Dinge, große Wirkung http://www.bmbf.de/pub/nanopartikel_kleine_dinge_grosse_wirkung.pdf
18. Marshall JD Behrentz E (2005) Vehicle self-pollution intake fraction: children's exposure to school bus emissions. *Environ.Sci.Technol* 39:2559-2563
19. Zimmer AT (2002) The influence of metallurgy on the formation of welding aerosols. *J.Environ.Monit.* 4:628-632
20. Dennekamp M Howarth S Dick CA Cherrie JW Donaldson K Seaton A (2001) Ultrafine particles and nitrogen oxides generated by gas and electric cooking. *Occup.Environ.Med.* 58:511-516
21. Grunwald A Fleischer T (2007) Nanotechnologie - wissenschaftliche Basis und gesellschaftliche Folgen. in: *Nano - Chancen und Risiken aktueller Technologien*; pp 1-4; eds: Gaszó A Greßler S Schiemer F; Berlin, Springer Verlag
22. Schmid G Decker M Ernst H Fuchs H Grünwald A Hofmann H Mayor M Rathgeber W Simon U Wyrwa D (2003) *Small Dimensions and Material Properties: A Definition of Nanotechnology*. Graue Reihe 35; Bad Neuenahr-Ahrweiler, Europäische Akademie zur Erforschung von Folgen wissenschaftlich-technischer Entwicklungen
23. Jordan A Scholz R Maier-Hauff K van Landeghem F Waldoefner N Teichgraeber U Pinkernelle J Bruhn H Neumann F Thiesen B von Deimling A Roland F (2006) The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J.Neuro-Oncol.* 78:7-14
24. Thiesen B Jordan A (2008) Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int.J.Hyperthermia* 24:467-474
25. Kreuter J Shamenkov D Petrov V Ramge P Cychutek K Koch-Brandt C Alyautdin R (2002) Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J.Drug Target.* 10:317-325
26. Schwedt G (1996) *Toxikologisches Lexikon zum Umweltchemikalienrecht*. Würzburg, Vogel Buchverlag
27. Kreyling W Semmler M Erbe F Mayer P Takenaka S Schulz H (2002) Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size-dependent but very low. *J.Toxicol.Environ.Health* 65:1513-1530

28. Semmler M Seitz J Erbe F Mayer P Heyder J Oberdörster G Kreyling WG (2004) Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal.Toxicol.* 16:453-459
29. Oberdörster G (2000) Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.* 358:2719-2740
30. Heckel K Kiefmann R Dörger M Stoeckelhuber M Goetz AE (2004) Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am.J.Physiol.* 287:L867-L878
31. Seaton A MacNee W Donaldson K Godden D (1995) Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345:176-178
32. Oberdörster G Sharp Z Atudorei V Elder A Gelein R Kreyling W Cox C (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal.Toxicol.* 16:437-445
33. Jani P Halbert GW Langridge J Florence AT (1990) Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J.Pharm.Pharmacol.* 42:821-826
34. Schleh C Semmler-Behnke M Lipka J Wenk A Hirn S Schäffler M Schmid GN Simon U Kreyling WG (2011) Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology* epub ahead
35. Kim S Lim YS Soltesz EG De Grant AM Lee J Nakayama A (2004) Near infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat.Biotechnol.* 22:93-97
36. Cho KH Park JE Osaka T Park SG (2005) The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim.Acta.* 51:956-960
37. Braydich-Stolle LK Hussain SM Schlager JJ Hofmann MC (2005) In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol.Sci.* 88:412-419
38. Carlson C Hussain SM Schrand AM Braydich-Stolle LK Hess KL Jones RL Schlager JJ (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J.Phys.Chem.B.* 112:13608-13619
39. Greulich C Kittler S Epple M Muhr G Köller M (2009) Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch.Surg.* 394:495-502
40. Kittler S Greulich C Diebdorf J Köller M Epple M (2010) Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chem.Mater.* 22:4548-4554

41. Richter E Marchand D Tricker AR (2000) Chemointervention of N'-nitrosornicotine (NNN) metabolism by PEITC in hamster liver and lung. *Drug Metab. Rev.* 32 (Suppl. 1):95
42. Henjakovic M Sewald K Switalla S Kaiser D Müller M Veres TZ Martin C Uhlig S Krug N Braun A (2008) Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 231:68-76
43. Switalla S Knebel J Ritter D Krug N Braun A Sewald K (2010) Effects of acute in vitro exposure of murine precision-cut lung slices to gaseous nitrogen dioxide and ozone in an air-liquid interface (ALI) culture. *Toxicol.Lett.* 196:117-124
44. Cammack R Atwood TK Campbell PN Parish JH Smith AD Stirling JL Vella F (2006) Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology. 2; London, Oxford University Press
45. Switalla S Knebel J Ritter D Krug N Braun A Sewald K (2010) Effects of acute in vitro exposure of murine precision-cut lung slices to gaseous nitrogen dioxide and ozone in an air-liquid interface (ALI) culture. *Toxicol.Lett.* 196:117-124
46. Switalla S Lauenstein L Prenzler F Knothe S Förster C Fieguth HG Pfennig O Schaumann F Martin C Guzman CA Ebensen T Müller M Hohlfeld JM Krug N Braun A Sewald K (2010) Natural innate cytokine response to immunomodulators and adjuvants in human precision-cut lung slices. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 246:107-115
47. Umachandran M Ioannides C (2006) Stability of cytochromes P450 and phase II conjugation systems in precision-cut rat lung slices cultured up to 72 h. *Toxicology* 224:14-21
48. Lassnack B Richter E Tricker AR (2004) Metabolism of N-nitrosornicotine by precision-cut rodent lung slices. *Proc.Am.Ass.Cancer Res.* 45:A3198
49. Lassnack B (2005) Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins N-Nitrosornicotin in Gewebeschnitten von Mäusen, Ratten und Menschen sowie Möglichkeiten der Hemmung durch Nicotin, Cotinin und Phenethylisothiocyanat (PEITC). Dissertation am Fachbereich der Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Giessen
50. Dandurand RJ Wang CG Phillips NC Eidelman DH (1993) Responsiveness of individual airways to methacholin in adult rat lung explants. *J.Appl.Physiol.* 75:364-372
51. Nassimi M Schleh C Lauenstein HD Hussein R Lübbers K Pohlmann G Switalla S Sewald K Müller M Krug N Müller-Goymann CC Braun A (2009) Low cytotoxicity of solid lipid nanoparticles in *in vitro* and *ex vivo* lung models. *Inhal.Toxicol.* 21:104-109
52. Ressmeyer AR Larsson AK Vollmer E Dahlén SE Martin C (2006) Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. *Eur.Respir.J.* 28:603-611

53. Yamamoto Y He P Klein TW Friedman H (1994) Endotoxin induced cytotoxicity of macrophages is due to apoptosis caused by nitric oxide production. *J.Endotoxin Res.* 1:181-187
54. Arditi M Zhou J Dorio R Rong GW Goyert SM Kim KS (1993) Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14. *Infect.Immun.* 61:3149-3156
55. Wörle-Knirsch JM Pulskamp K Krug HF (2006) Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 6:1261-1268
56. Gandolfi AJ Brendel K Fisher RL Michaud JP (1995) Use of tissue slices in chemical mixture toxicology and interspecies investigations. *Toxicology* 105:285-290
57. Engl J (1999) Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins NNK in Gewebeschnitten von Mäusen, Ratten und Menschen. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
58. Lowry OH Rosebrough NJ Farr AL Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275
59. Leon CG Tory R Jia J Sivak O Wasan KM (2008) Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharm.Res.* 25:1751-1761
60. Driscoll KE Carter JM Hassenbein DG Howard B (1997) Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Eviron.Health.Perspect.* 105 (Suppl. 5):1159-1164
61. Radon K Danuser B Iversen M Monso E Weber C Hartung J Donham K Palmgren U Nowak D (2002) Air contaminants in different European farming environments. *Ann.Agric.Enviroin.Med.* 9:41-48
62. Corteling R Wyss D Trifilieff A (2002) In vivo models of lung neutrophil activation. Comparison of mice and hamsters. *BCM Pharmacol.* 2:1
63. Booth JL Coggeshall KM Gordon GB Metcalf JP (2004) Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk. *J.Virol.* 78:4156-4164
64. Schleh C Mühlfeld C Prenzler F Schmiedl A Nassimi M Lauenstein HD Braun A Krug N Erpenbeck VJ Hohlfeld JM (2009) The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonary surfactant function and ultrastructure. *Resp.Res.* 10:90
65. Lipka J Semmler-Behnke M Sperling RA Wenk A Takenaka S Schleh C Kissel T Parak WJ Kreyling WG (2010) Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials* 31:6574-6581

66. Kim YS Song MY Park JD Song KS Ryu HR Chung YH Chang HK Lee JH Oh KH Kelman BJ Hwang IK Yu IJ (2010) Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part.Fibre Toxicol.* 7:20
67. Sung JH Ji JH Song KS Lee JH Choi KH Lee SH Yu IJ (2011) Acute inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol.Ind.Health* 27:149-154
68. Gabrisch K Zwart P (2008) *Krankheiten der Heimtiere. 7*; Hannover, Schlüter-sche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG
69. Ji JH Jung JH Kim SS Yoon YU Park JD Choi BC Chung YH Kwon IH Jeong J Han BS Shin JH Sung JH Song KS Yu IJ (2007) Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in sprague-dawley rats. *Inhal.Toxicol.* 19:857-871
70. Dörger M Allmeling AM Kiefmann R Münzing S Messmer K Krombach F (2002) Early inflammatory response to asbestos exposure in rat and hamster lungs: role of inducible nitric oxide synthase. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 181:93-105

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Wolfram Breuer und Herrn Prof. Dr. Walter Hermanns für die Ermöglichung der Promotion an der Veterinärmedizinischen Fakultät der LMU München bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Elmar Richter für die Überlassung des Themas, seine allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Herrn Dr. Carsten Schleh vom Helmholtz Zentrum München möchte ich besonders danken. Er stand mir von Anfang an mit Rat und Tat zur Seite und hatte zu allen möglichen Zeiten ein offenes Ohr für meine Probleme. Sein geduldiges Wesen und seine aufmunternden Worte gaben mir immer wieder neuen Aufschwung.

Herrn Dr. Wolfgang Kreyling vom Helmholtz Zentrum München möchte ich für die Ermöglichung des Kooperationsprojektes sowie für die geleistete Hilfe danken.

Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Matthias Epple danke ich für die Herstellung sowie die Bereitstellung der Silber-Nanopartikel, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Frau Christiana Oehlmann danke ich für die Einführung in die Laborarbeit. Ihr, wie auch Verena, Heike und Brigitte danke ich für die angenehme Zeit im Walther-Straub-Institut.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie. Ohne ihre Unterstützung wäre im Laufe meines beruflichen Werdegangs vieles nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt auch Andreas, der immer für mich da war und mich gerade während der Zeit des Studiums und der Promotion immer wieder mit seinen aufmunternden und liebevollen Worten unterstützt hat.