

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,  
plastische und ästhetische Operationen  
der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

# **Zyto- und Genotoxizität von Zinkoxid-Nanopartikeln in humanen mesenchymalen Stammzellen nach repetitiver Exposition und im Langzeitversuch**



## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Martin Wagner**

aus Bergisch Gladbach

Würzburg, August 2021

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser MHBA  
Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper  
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag des Promotionskolloquiums: 15.03.2022

Der Promovend ist Arzt

Allen motivierenden Gedanken, allen überlisteten Ablenkungen, allen  
überwundenen Steinen im Weg, meiner Familie und meinen Lieben.



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Nanotechnologie - eine moderne Errungenschaft?	1
1.2	Von Nanotechnologie und Nanowissenschaft	3
1.3	Nanopartikel – ein alltäglicher Konsum?	5
1.4	Zinkoxid-Nanopartikel	9
1.5	Nanotoxikologie und humane mesenchymale Stammzellen	12
1.5.1	Fragestellung und Zielsetzung	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Methoden	17
2.2	Humane Zellkultur	18
2.2.1	Expansionsmedium für Stammzellen	19
2.2.2	Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe	20
2.2.3	Zellkultivierung	21
2.2.4	Zellzählung	22
2.2.5	Kryokonservierung	22
2.3	Nanopartikel	23
2.4	MTT-Test	24
2.5	Comet Assay	26
2.6	Repetitive Versuche	30
2.7	Langzeitversuche und Elektronenmikroskopie	30
2.8	Abhängigkeit der Toxizität vom Differenzierungsgrad	31
2.8.1	Gefrierschnitte der andifferenzierten Zellkultur	32
2.8.2	Histologische Färbung der andifferenzierten Kultur	33
2.9	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	MTT-Test nach 24 stündiger Exposition	37
3.2	MTT-Test nach repetitiver Exposition	38
3.3	MTT-Test nach adipogener und osteogener Andifferenzierung	39
3.4	Comet Assay nach 24 stündiger Exposition	40
3.5	Comet Assay nach repetitiver Exposition	41
3.6	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung	41
3.6.1	Expositionsdauer von 30, 60 und 180 Minuten	42

3.6.2	Expositionsdauer von einer, drei und sechs Wochen	43
3.6.3	Zusammenfassung der elektronenmikroskopischen Analyse	44

### **4 Diskussion 45**

4.1	Konzentrationsabhängigkeit von zyto- und genotoxischen Effekten	45
4.2	Vergleichbarkeit nanotoxikologischer Studienarbeiten	47
4.2.1	Protektivität durch Verlust der Multipotenz	48
4.3	Zeitliche Abhängigkeit von zyto- und genotoxischen Effekten	51
4.3.1	Repetitive Exposition – ein realistischeres Szenario?	51
4.4	Partikelgröße – ein entscheidender Faktor für Genotoxizität?	54
4.5	Die menschliche Haut – eine suffiziente Barriere?	57
4.6	<i>In vitro</i> - versus <i>in vivo</i> -Testverfahren	60
4.6.1	Fallstricke des MTT-Tests	61
4.6.2	Fallstricke des Comet Assay	63
4.7	Nanotechnologie und der Endverbraucher	67
4.8	Ausblick	69
4.8.1	Standardisierte Versuchsabläufe	69
4.8.2	Partikelgröße, NP-Konzentrationen und Langzeitversuche	69
4.8.3	Stammzellen und Andifferenzierung	70
4.8.4	Intrazelluläre Mechanismen	71
4.8.5	Verbraucherschutz	71

### **5 Zusammenfassung 73**

### **6 Literaturverzeichnis 75**

## Appendix

- I. **Abkürzungsverzeichnis**
- II. **Abbildungsverzeichnis**
- III. **Tabellenverzeichnis**
- IV. **Versuchsspezifische Labormaterialien**
- IV.I **Laborgeräte**

**IV.II Verbrauchsmaterialien**

**IV.III Reagenzien**

**IV.IV Versuchsspezifische Lösungen, Puffer und Medien**

**IV.V Software**

**V. Curriculum vitae**

**VI. Kongressbeiträge und Publikation**

**VI.I Kongressbeiträge**

**VI.II Publikation**



## 1 Einleitung

Im Folgenden wird ein Überblick über die Nanotechnologie im Allgemeinen sowie über die Nanotoxikologie in Bezug auf Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO-NP) gegeben. Danach werden unsere Hypothesen und Fragenstellungen dargelegt.

### 1.1 Nanotechnologie - eine moderne Errungenschaft?

Die Natur produziert Nanostrukturen unterschiedlicher Funktion wie Proteine und Zellorganellen (Ochekpe et al. 2009). Ein Großteil unserer körpereigenen intra- und extrazellulären Prozesse spielen sich auf der Nanoebene ab. So ist ein DNA-Molekül etwa 2,5 nm breit und ein typisches Protein hat eine Größe von 1 bis 20 nm (Roco 1999). Bei Bränden und Vulkaneruptionen werden große Mengen an kohlenstoffhaltigen Nanopartikeln frei und die Ozeane geben mit der Brandung salzhaltige sowie nanoskalige Aerosole ab. Für das Farbenspiel der Sonnenuntergänge sind Reflexionen des Lichts in einer nanopartikelhaltigen Atmosphäre verantwortlich. Als die Vulkaninsel Krakatau 1883 explodierte, gab es deshalb über Jahrzehnte hinweg eindrucksvolle Sonnenuntergänge (Smith 2006).

Auch der Mensch hat sich schon früh mit Nanomaterialien auseinandergesetzt. Im 4. Jahrhundert nach Christus schufen römische Kunsthandwerker den Lykurgos-Becher, der sich heute im British Museum in London befindet (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Der Lykurgos-Becher, ein römisches Trinkgefäß, stammt aus dem 4. Jahrhundert n. Chr. Durch die in das Glas eingebetteten Nanopartikel wechselt der Becher bei Durchleuchtung die Farbe. The British Museum, 1958, CC BY-NC-SA 4.0.

Die in das geschmolzene Glas eingebetteten Silber- und Goldnanopartikel lösen bei Durchleuchtung einen Farbeffekt von Grün zu Rot aus (Freestone et al. 2007). Im Mesopotamien des 9. Jahrhunderts verarbeiteten Handwerker Nanopartikel

(NP), um einen glänzenden Effekt auf der Oberfläche von Gefäßen zu erzielen. Die im 10. Jahrhundert in Persien entwickelten Methoden waren später in Spanien nachweisbar. Von dort breitete sich das Verwenden von Gold- und Silber-NP in der Keramik-Herstellung über den Rest von Europa aus (Erhardt 2003). Im Mittelalter und in der Renaissance fanden Gold- und Kupfer-NP im Handwerk Verwendung, um eine Glanzpatina zu erzeugen (Sattler 2010).

Für die moderne Wissenschaft beginnt die Nanotechnologie am 29. Dezember 1959 mit Richard P. Feynman, einem renommierten amerikanischen Physiker und späteren Nobelpreisträger. In seiner Rede am *California Institute of Technology* „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ beschreibt er erstmalig die Möglichkeiten und das Konzept der Nanotechnologie (Miyazaki et Islam 2007; Sahoo et al. 2007). Feynman spricht dabei über die Vorstellung, die gesamte „*Encyclopaedia Britannica*“ um den Faktor 25.000 zu verkleinern und den Inhalt aller Seiten auf den Kopf einer Stecknadel zu schreiben. Neben den Vorteilen der Datenkomprimierung und von miniaturisierten Computern beschreibt Feynman das Potential von hochauflösenden Elektronenmikroskopen sowie mikroskopisch kleinen Maschinen auf Zellebene (Feynman 1960). Die Bezeichnung „Nanotechnologie“ findet das erste Mal im Jahre 1974 durch Norio Taniguchi, einen Wissenschaftler der Universität Tokio, Verwendung (Taniguchi et al. 1974). Der führende Drang und das Streben in Richtung Nanoebene geht zu dieser Zeit von der Elektroindustrie aus, die zunehmend kleinere, schnellere und komplexere Geräte entwickelt (Sahoo et al. 2007).

Der amerikanische Ingenieur und Physiker Kim Eric Drexler greift in seiner 1981 erschienenen Publikation „*Molecular engineering*“ die Visionen Feynmans auf und beschreibt die möglichen Innovationen durch Manipulation von biologischen Materialien (Drexler 1981). Der Begriff „*Nanotechnology*“ wurde damit publik und etablierte sich fest im Sprachgebrauch. Im Jahr 1992 veröffentlichte er das weltweit erste Buch über Nanotechnologie „*Nanosystems*“. Inhaltlich hat es mit zahlreichen Gleichungen und Diagrammen sowie Entwürfen von nanoskaligen Maschinen die Theorie von der molekularen Fertigung auf eine technisch fundierte wissenschaftliche Debatte gehoben (Melnik et Shagalina 2011).

Vor allem in den letzten drei Jahrzehnten hat sich die Nanotechnologie weiterentwickelt und der Trend zu immer kleineren Geräten und Produkten mit Wirkungen auf Nanoebene setzt sich kontinuierlich fort. Nanotechnologie ist nicht nur ein fester Bestandteil der interdisziplinären, wissenschaftlichen Forschung, sondern steht zunehmend auch im kommerziellen Interesse. Im Rahmen der industriellen Fertigung werden von den Herstellern mit stetig steigender Anzahl innovative Produkte auf den Markt gebracht. Dem Einsatz von Nanomaterialien wird ein immenses Potential mit sehr hohen Wachstumschancen in unterschiedlichen Bereichen der Wirtschaft zugeschrieben. Auch in der Meta-Datenbank Pubmed spiegelt sich das enorme wissenschaftliche Interesse an der Nanotechnologie wider. Bisher lassen sich allein 114.449 Publikationen (Stand August 2021) unter dem Suchbegriff „*Nanotechnology*“ finden.

### **1.2 Von Nanotechnologie und Nanowissenschaft**

Als Konsumenten haben wir alle bereits Kontakt mit Nanotechnologie gemacht, auch wenn dieser für den Einzelnen kaum nachvollziehbar ist. In naher Zukunft wird dieser Umstand ein immer häufiger auftretendes Phänomen darstellen.

Das Präfix „Nano“ stammt ursprünglich aus dem Griechischen und lässt sich allgemein mit „Zwerg“ übersetzen. Die Größenordnung in der sich Nanotechnologie bewegt sind Nanometer. Dabei entspricht ein Nanometer dem billionsten Teil von einem Meter oder auch der Weite von sechs Kohlenstoffatomen oder zehn Wassermolekülen (Sahoo et al. 2007). Auf der Fläche des Punktes dieses „i“ kann man 100 Millionen Nanopartikel unterbringen (Lauterwasser 2005).

Eine weltweit einheitliche Definition für den Begriff Nanotechnologie existiert nicht. Generell wird allerdings zwischen Nanotechnologie und Nanowissenschaften unterschieden. Erstere wird als die Entwicklung, Charakterisierung, Produktion und Verwendung von Strukturen, Geräten und Systemen durch das Kontrollieren der Gestalt und Größe auf Nanoebene definiert (Royal Society London et Royal Academy of Engineering 2004). Nanowissenschaft dagegen wird als das Studium von Phänomenen und

Manipulation von Materialien auf atomarer, molekularer und makromolekularer Ebene beschrieben (Royal Society London et Royal Academy of Engineering 2004). Das *National Science and Technology Council* (NSTC) in Washington erklärt Nanotechnologie als das Verständnis und die Kontrolle über Materie in der Dimension zwischen 1 und 100 nm (National Science and Technology Council et al. 2014). Durch das Umstrukturieren auf molekularer und atomarer Ebene macht man sich die einzigartigen Eigenschaften und Phänomene in dieser Größenordnung zu eigen (Zhu et al. 2004). Nanotechnologie ist dabei multidisziplinär und wird unter anderem im Ingenieurwesen, in der Physik, Chemie sowie Biologie angewendet (Sahoo et al. 2007)

Nanomaterialien werden als unlösliche sowie biologisch beständige und absichtlich hergestellte Materialien, die mit ihren äußerlichen und innerlichen Ausmaßen und Strukturen in der Größenordnung von 1 bis 100 Nanometern liegen, beschrieben (Europäisches Parlament et Europäischer Rat 2009). Nanopartikel weisen andere und erweiterte Eigenschaften auf als ihre chemische Basis, einzelne Atome oder Moleküle. Dabei unterscheiden sie sich durch ihre physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften (National Science and Technology Council et al. 2014). Kausal ist die Divergenz zwischen großer Oberfläche und kleinem Volumen bei sehr kleiner Größe (Williams 2008). Die dadurch entstehenden Quanteneffekte bestimmen die magnetischen, thermischen, optischen und elektrischen Eigenschaften des Nanomaterials (Ochepke et al. 2009). Eine Zunahme der Oberfläche korrespondiert mit einer Zunahme der chemischen Reaktivität (Royal Society London et Royal Academy of Engineering 2004).

Bei der synthetischen Herstellung von Nanomaterialien zählen zu den populärsten Methoden das Top-Down- sowie das Bottom-Up-Verfahren. Das Top-Down-Verfahren entspricht einem mechanisch-physikalischen Herstellungsverfahren, bei dem die nanoskaligen Partikel durch Mahlprozesse und Zermahlung in Hochenergie-Kugelmöhlen erzeugt werden. Es eignet sich vor allem für die Herstellung von metallischen und keramischen NP. Nachteilig sind die breite Partikelgrößenverteilung von 10 bis 1000 nm und die Verunreinigung

durch Abrieb der Mahlkörper. Eine Herstellung von NP gleicher Größe und Geometrie ist mit diesem Verfahren unmöglich (Anu et Saravanakumar 2017; Raab et al. 2008). Das Grundprinzip des Bottom-up-Verfahrens ist es, ausgehend von der kleinstmöglichen Einheit wie Atomen und Molekülen größere Strukturen unter Kontrolle der Löslichkeit und der Aggregationseigenschaften zu kreieren (Pan et Zhong 2016). Dabei macht man sich die physikalisch-chemischen Grundsätze der atomaren und molekularen Selbstorganisation zu Nutze. Ein entscheidender Vorteil hierbei ist, dass nanoskalige Strukturen von identischer Größe und Morphologie erzeugt werden können (Raab et al. 2008).

### 1.3 Nanopartikel – ein alltäglicher Konsum?

Tatsächlich kommen Nanopartikel in vielen alltäglichen Konsumprodukten der Kosmetik-, Textil-, Elektro- und Bauindustrie vor (Abb. 2). Auch in der Medizin

Nanomaterial	Produktgruppe	Anteil in %
TiO <sub>2</sub>	Kosmetika (inkl. Sonnencreme)	70-80
	Beschichtungen, Reinigungsmittel	< 20
	Kunststoffe	<20
	Farben	10-30
	Zement	1
	andere	< 10
ZnO	Kosmetika (inkl. Sonnencreme)	70
	Farben	30
CeO <sub>2</sub>	Chemisch-mechanische Polituren	45-80
	Kraftstoff-Katalysator	1-50
	UV-Beschichtungen, Farben	5-10
CNT	Verbundwerkstoffe und Polymerradditive	20-50
	Werk-/Baustoffe	80
	Batterien	50
Ag	Farben, Beschichtungen, Reinigungsmittel	10-30
	Textilien	30-50
	Unterhaltungselektronik, Konduktoren	10-20
	Kosmetika	20
	Medizintechnik	20

**Abbildung 2:** Überblick über die Produktverteilung von Nanopartikeln, ZnO-NP rot markiert (Piccinno et al. 2012).

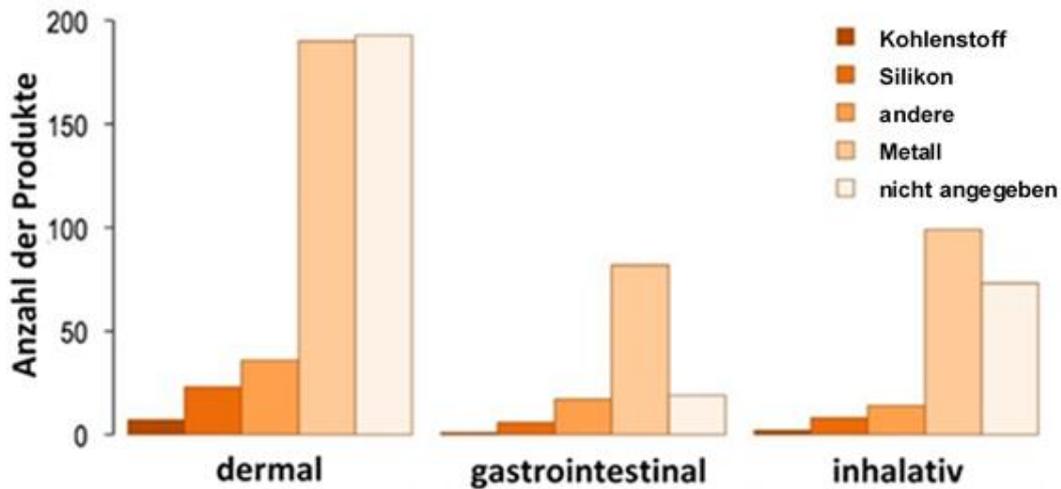
und Pharmazie finden Nanopartikel zunehmend, z. B. in der Arzneimittelgabe, Verwendung (Anselmo et Mitragotri 2019). Nach Vance und Kollegen sind gegenwärtig weltweit mehr als 1814 Konsumprodukte von 622 Herstellern in 32 Ländern mit Nanomaterialien auf den Markt verfügbar. Mit 762 Produkten und

einem prozentualen Anteil von 42 % bedient der Gesundheits- und Fitness-Sektor den größten Markt (Vance et al. 2015). Die von dänischen Instituten betreute Bestandsaufnahme „Nano-Database“ listet aktuell 5189 Produkte (Stand August 2021), die mit dem Präfix oder dem Wort „Nano“ auf den internationalen Märkten vertrieben werden. Ergänzend ist dort für jedes Nanoprodukt ein Risikoprofil bezüglich Exposition und Effekte auf Mensch und Umwelt gelistet (DTU Environ. et al. 2021).

Global gesehen sind nach Vance und Kollegen Metalle und Metalloxide die am häufigsten verwendeten Ausgangsstoffe für industriell hergestellte NP. Titandioxid- ( $\text{TiO}_2$ ), Silikondioxid- and ZnO-NP sind, beruhend auf ihrer Massenbasis, die am meisten hergestellten Nanomaterialien weltweit (Vance et al. 2015). Silber-Nanopartikel (Ag-NP) zählen aufgrund ihrer antimikrobiellen und bakteriziden Wirkung zu den regelmäßig eingesetzten Nanomaterialien (Bartłomiejczyk et al. 2013; Nowack et al. 2011). Neben der Herstellung antimikrobieller Beschichtungen finden Ag-NP auch in der Produktion von Textilien, Farbstoffen und Reinigungsmitteln Verwendung (Piccinno et al. 2012). Ag- und  $\text{TiO}_2$ -NP werden zudem in der industriellen Fertigung am häufigsten mit anderen Nanomaterialien kombiniert (Vance et al. 2015).

Der Kontakt des menschlichen Organismus mit Nanomaterialien erfolgt pulmonal, gastrointestinal sowie dermal (Lin et al. 2015). Als Haupteintrittspforten gelten hierbei die dermale und inhalative Aufnahme von Nanomaterialien (Vilas-Boas et Vinken 2021). Die Haut wurde als primäres Kontaktorgan bezüglich der Exposition von Nanomaterialien in Konsumprodukten identifiziert (Vance et al. 2015). Dies ist vor allem durch den großen Anteil der Kosmetik- und Gesundheitsprodukte, die NP enthalten, zu begründen. Daneben besteht auch eine große Anzahl an Konsumprodukten mit Nanopartikel beschichteten Oberflächen. Aus diesem Grund ist der dominante Expositionsweg von ZnO-NP sowie anderen metallenen NP die dermale Auftragung (Abb. 3). Prozentual betrachtet findet dabei ein möglicher Kontakt mit Nanoprodukten zu 58 % über

die Haut sowie zu 25 % über den Respirationstrakt und zu 16 % über die Nahrungsaufnahme statt (Vance et al. 2015).



**Abbildung 3:** Potenzielle Expositionswege bei dem zu erwartenden Gebrauch von Konsumprodukten, gruppiert anhand den führenden Nanomaterialien-Zusammensetzungen (Vance et al. 2015).

Insgesamt gesehen gelten die Atemwege als Haupteintrittspforte für Nanomaterialien unterschiedlicher Genese in den menschlichen Körper (Oberdörster et al. 2005). Angesichts der nur 1  $\mu\text{m}$  dicken sowie etwa 140  $\text{m}^2$  großen Oberfläche der Luft-Blut-Barriere wird angenommen, dass für den Menschen besonders bei inhalativem Kontakt mit Nanomaterialien gesundheitliche Risiken bestehen (Beth-Hübner 2009).

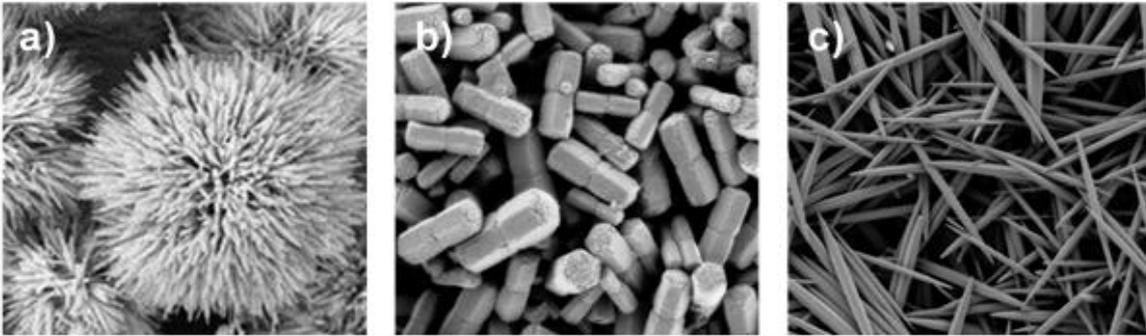
Der Kontakt mit Nanopartikeln erfolgt nicht nur beim Konsum entsprechender Produkte, sondern ist auch abhängig von unserer alltäglichen Umwelt. Generell wird zwischen Nanomaterialien der naturgegebenen Umwelt und anthropogenen NP unterschieden. Dabei werden die anthropogenen NP entsprechend ihrer Intention in bewusst und gewollt synthetisierte NP und NP in Form von Abfallprodukten unterschieden. Letztere entstehen vor allem bei Hitzeprozessen, wie z. B. in Verbrennungsmotoren, Müllverbrennungsanlagen und auch bereits beim Kochen bzw. Grillen (Oberdörster et al. 2009). In diesem Zusammenhang werden die NP auch als ultrafeine Partikel definiert (Jud et al. 2013). Global gesehen ist der motorisierte Verkehr insbesondere in urbanen Regionen die

Hauptquelle für ultrafeine Partikel (Kumar et al. 2014). An zweiter Stelle folgt die Entstehung von sekundären Aerosolen (Brines et al. 2015).

Der Verbraucher ist sich der Exposition gegenüber NP oft nicht bewusst, da die Hersteller gesetzlich zu einer entsprechenden Produkt-Deklaration nicht verpflichtet sind. In der Europäischen Union wurde 2013 die Kosmetik-Verordnung (EG) Nr.1223/2009 verabschiedet, die erstmalig Nanopartikel aufführte. In Artikel 16 der Verordnung wird der Umgang mit Nanomaterialien in kosmetischen Produkten reguliert. Um ein hohes Gesundheitsschutzniveau zu gewährleisten, sind NP beinhaltende Produkte sechs Monate vor Markteinführung zu notifizieren (Europäisches Parlament et Europäischer Rat 2009). Im Sinne des Verbraucherschutzes müssen hierbei neben der Nennung auch die spezifischen Eigenschaften, das toxikologische Profil, die Menge sowie die Expositionsbedingungen des Nanomaterials aufgeführt werden (Europäisches Parlament et Europäischer Rat 2009). Seit 2014 besteht zudem nach der Lebensmittelverordnung Nr.1169/2011 der EU eine Deklarationspflicht von Nanomaterialien in Lebensmitteln. Die Verordnung sieht vor, dass auf die Bezeichnung aus Nanomaterialien hergestellter Zutaten das in Klammern gesetzte Wort "Nano" folgen muss (Europäisches Parlament et Europäischer Rat 2011). Jedoch besteht nach dem Bundesinstitut für Risikobewertung keine allgemeine Meldepflicht für Nanomaterialien in Konsumprodukten, sodass keine gesicherten Informationen zum Umfang der auf dem Markt erhältlichen Nanoprodukte vorliegen (Bundesinstitut für Risikobewertung 2012). Aufgrund dessen werden eigentlich nanopartikelhaltige Produkte teilweise nicht in Nano-Datenbanken aufgenommen. Doch auch bei gelisteten Produkten ist aufgrund der fehlenden Deklarationspflicht die genaue Zusammensetzung oft nicht nachvollziehbar (Vance et al. 2015). Die dänische Nanodatabase führt aktuell 3648 (Stand August 2021) Produkte mit unklarer Zusammenstellung (DTU Environ. et al. 2021).

## 1.4 Zinkoxid-Nanopartikel

Zinkoxid ist die oxidierte Form von Zink und kommt in Form von farblosen, hexagonalen Kristallen oder eines weißen, lockeren Pulvers vor (Krug et al. 2016). Ein weiteres Merkmal von Zinkoxid sind die mehrdimensionalen Strukturvariationen (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Zinkoxid bildet diverse mehrdimensionale Strukturvariationen. In diesen liegen die vielfältigen physikalischen und chemischen Eigenschaften begründet: **(a)** blumenartig; **(b)** stangenförmig; **(c)** drahtartig (Bitenc et al. 2010; Kołodziejczak-Radzimska et Jesionowski 2014; Xie et al. 2005).

Wie Kołodziejczak-Radzimska und Jesionowski zusammenfassen, bildet eindimensionales Zinkoxid den größten Anteil z. B. in Form von Nanostangen oder –nadeln. Nanopellets oder Nanoplaten stellen zweidimensionales ZnO dar. In seiner dreidimensionalen Form bildet ZnO unter anderem blumen- oder schneeflockenartige Gebilde. Damit bietet ZnO mit das größte Angebot an Strukturvariationen aller bekannten Materialien (Kołodziejczak-Radzimska et Jesionowski 2014). Bei einer Dichte des ZnO von  $5,61 \text{ g/cm}^3$  beträgt die molare Masse  $81,4 \text{ g/mol}$  (Wölk et al. 2010). ZnO ist praktisch unlöslich in Wasser, in Säuren und Alkalien löst es sich unter Salzbildung (Krug et al. 2016). Kristallines Zinkoxid weist eine hohe thermische und chemische Stabilität auf und besitzt besondere elektrische und optische Eigenschaften (Wölk et al. 2010).

Nach Hackenberg sowie Vance und Kollegen stellt Zinkoxid neben Ag-NP und  $\text{SiO}_2$ -NP die dritthäufigste Basis für den Einsatz von Metall-Nanopartikeln in der Industrie dar (Hackenberg 2014a; Vance et al. 2015). Mit einen Anteil von 70 % an der industriellen Verarbeitung findet ZnO häufig auch in Kombination mit  $\text{TiO}_2$ -NP vor allem in der Kosmetikindustrie eine breite Anwendung (Piccinno et al.

2012). Als Additiv fördert Zinkoxid den Vulkanisierungsprozess in der Gummiherstellung von Autoreifen. Dabei erhöht es durch eine gute Wärmeleitfähigkeit die Abfuhr der durch Walkarbeit entstehenden Wärme. Zudem steigert Zinkoxid als Zugabe zu Zement dessen Beständigkeit gegen Wasser und verlängert die Verarbeitungszeit (Klingshirn et al. 2006). Aufgrund seiner Eigenschaften als Halbleiter, gilt Zinkoxid in der Entwicklung von Leuchtdioden und in der Elektroindustrie als vielversprechend (Hackenberg et al. 2010b; Klingshirn et al. 2006). Zudem sind ZnO-NP ein Bestandteil von Lacken und Farben (Piccinno et al. 2012).

Als anorganische UV-Blocker werden ZnO-NP auch in Kombination mit TiO<sub>2</sub>-NP insbesondere in Sonnenschutzprodukten eingesetzt (Abb. 5). Nach Reinoso und Kollegen reflektieren sie dabei vor allem die schädliche UV-A-Strahlung (Reinoso et al. 2016). UV-B- und UV-C-Strahlung werden zum größten Teil von der Ozonschicht absorbiert (Becheri et al. 2008). Der Vorteil gegenüber organischen



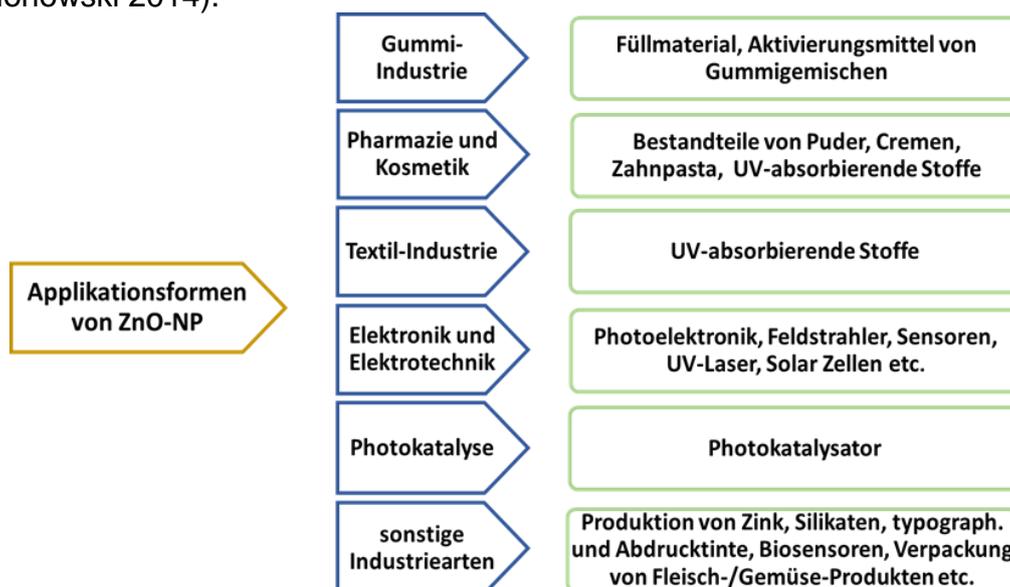
**Abbildung 5:** In Sonnenschutzprodukten werden vor allem TiO<sub>2</sub>-NP und ZnO-NP als anorganische UV-Blocker verwendet (*eigene Abbildung*).

UV-Filtern liegt in ihrer Photostabilität und ihrem geringen photoallergischen Potential. Durch den Einsatz von nanoskaligem ZnO und TiO<sub>2</sub> konnte eine höhere Dispersion beim Auftragen erreicht werden, sodass der für den Verbraucher lästige weiße Film und der okklusiv, körnige Effekt entfiel (Burnett et Wang 2011). Die dadurch entstehende kosmetische Verwendbarkeit wäre mit der Verarbeitung größerer Partikel nicht möglich (Cross et al. 2007).

Ferner finden ZnO-NP in der Textilindustrie Verwendung. Beschichtungen mit ZnO-NP haben eine erhöhte Luftdurchlässigkeit und sind effektive UV-Blocker (Yadav et al. 2006). Pharmazeutisch und medizinisch ist vor allem die antimikrobielle Wirkung von Metalloxiden wie ZNO-NP bedeutend (Dizaj et al. 2014; Jin et Jin 2021). In der Zahnmedizin können ZnO-NP in der dentalen

Infektionsprävention durch Hemmung des Wachstums und des Biofilms der oralen Flora eingesetzt werden (Khan et al. 2013). Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften finden ZnO-NP auch zunehmend in der Biomedizin Verwendung. Die Herstellung von ZnO-NP ist kostengünstig und die Oberfläche von ZnO-NPs ermöglicht Modifikationen durch verschiedene Beschichtungen (Wiesmann et al. 2020). Onkologisch sind nanomedizinische *in vitro*-Studien mit einer gezielten Krebsdiagnostik und Therapie durch ZnO-NP vielversprechend (Akhtar et al. 2012; Hong et al. 2015). Wie Wiesmann zusammenfasst, konnte in einigen Studien eine Selektivität der anti-tumorigenen Eigenschaften von ZnO-NP beschrieben werden. Somit könnte gesundes Gewebe in der Krebsbehandlung geschont werden (Wiesmann et al. 2020). Im Vordergrund stehen dabei die photokatalytischen Effekte von ZnO-NP, die in Kombination mit UV-A-Strahlung oder Röntgenstrahlung eine Reduktion der Tumorzellzahl erreichen (Generalov et al. 2015; Hackenberg 2010a; Hackenberg et al. 2014b). Neben der Einzelanwendung von ZnO-NP besteht auch die Möglichkeit diese mit einer Chemo- oder Strahlentherapie zu kombinieren (Wiesmann et al. 2020).

Zusammenfassend lässt die Varietät der Strukturen von ZnO-NP eine Vielzahl von Materialien mit vielversprechenden Eigenschaften und Anwendungsarten in multiplen Bereichen (Abb. 6) der Nanotechnologie (Kołodziejczak-Radzimska et al. Jesionowski 2014).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der industriellen Anwendung von ZnO-NP (nach Kołodziejczak-Radzimska et al. Jesionowski 2014).

## 1.5 Nanotoxikologie und humane mesenchymale Stammzellen

Nanotoxikologie wird als Erforschung der künstlich hergestellten Nanomaterialien aber auch anderer nanoskaliger Strukturen definiert und setzt sich mit den Effekten auf lebende Organismen auseinander (Oberdörster et al. 2005). NP können im Gegensatz zu anderen Materialien oder größeren Partikeln durch den Organismus migrieren. Beginnend an der Eintrittspforte kann es über unterschiedliche Wege bis zum Zielorgan zu Wechselwirkungen mit Flüssigkeiten, Zellen sowie Gewebe kommen. Eine biologische Antwort im Sinne von z. B. entzündlichen oder immunologischen Reaktionen ist denkbar (Donaldson et al. 2004).

Bei den möglichen toxischen Effekten wird die Zyto- von der Genotoxizität unterschieden. Erstere beschreibt eine Schädigung der zellulären Integrität durch ein Toxin wie z.B. NP. Genotoxizität dagegen wird als direkte Schädigung des zellulären Erbgutes im Zellkern und Mitochondrium definiert. Nach Barabadi und Kollegen verursachen Genotoxine destruktiv-genetische Veränderungen mit Genmutationen, strukturellen Chromosomenaberrationen und Rekombinationen (Barabadi et al. 2019).

Die diesbezüglich erhobenen Daten einer toxikologischen Charakterisierung von ZnO-NP werden in der Literatur kontrovers diskutiert (Ickrath et al. 2017). Die meisten nanotoxikologischen Studien mit ZnO-NP beschäftigen sich vor allem mit der Zytotoxizität, die Studienlage insbesondere für von ZnO-NP induzierte genotoxische Effekte ist begrenzt (Scherzad et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit werden sowohl die Zyto- als auch Genotoxizität von ZnO-NP in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) beleuchtet. Der Einsatz von hMSC in dieser Studie ist multikausal. Zum einem liegt dieser in den zelleigenen Eigenschaften mit hoher Proliferationsrate - auch in Langzeitversuchen - begründet. Zum anderen besteht ein wachsendes Interesse an hMSC in den letzten Jahren. hMSC gelten dabei als potentielle therapeutische Vehikel für diverse Krankheiten und Verletzungen insbesondere im Sinne des Tissue-Engineerings. Seit der Entdeckung des multilinearen Potentials von mesenchymalen Stammzellen verschiedener Spezies in den 1960er Jahren

wurde vor allem diese Eigenschaft über die Zeit ausführlich studiert (Baksh et al. 2004). Ferner legen Baksh und Kollegen in ihrer Übersichtsarbeit dar, dass MSC von Menschen, aber auch von Kaninchen, Mäusen und anderen Arten, die Kapazität besitzen sich in verschiedene mesenchymale Phänotypen wie Knochen, Knorpel, Bindegewebe, Muskel, Fettgewebe und Hämatopoese unterstützendes Stromagewebe zu differenzieren (Baksh et al. 2004; Bari et al. 2001). Humane mesenchymale Stammzellen sind dabei vor allem in die Gewebereparatur und Geweberegeneration involviert (Greulich et al. 2009). Laut Al-Nbaheen und Kollegen finden sie aufgrund ihrer Fähigkeit sich in mesodermale Zellen wie Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten zu differenzieren, insbesondere bei klinischen Versuchen zur Gewebsregeneration wie z. B. bei Knochen- oder Knorpeldefekten, Verwendung (Al-Nbaheen et al. 2013). So ist es heutzutage möglich, *in vitro* die Differenzierung von hMSC in bestimmte Zelllinien zu lenken und deren spezifische Eigenschaften zu untersuchen. Durch die hohe Differenzierungskapazität repräsentieren hMSC ferner ein optimales Zellmodell zur Analyse eines toxischen Einflusses durch Nanopartikel (Baksh et al. 2004; Greulich et al. 2009).

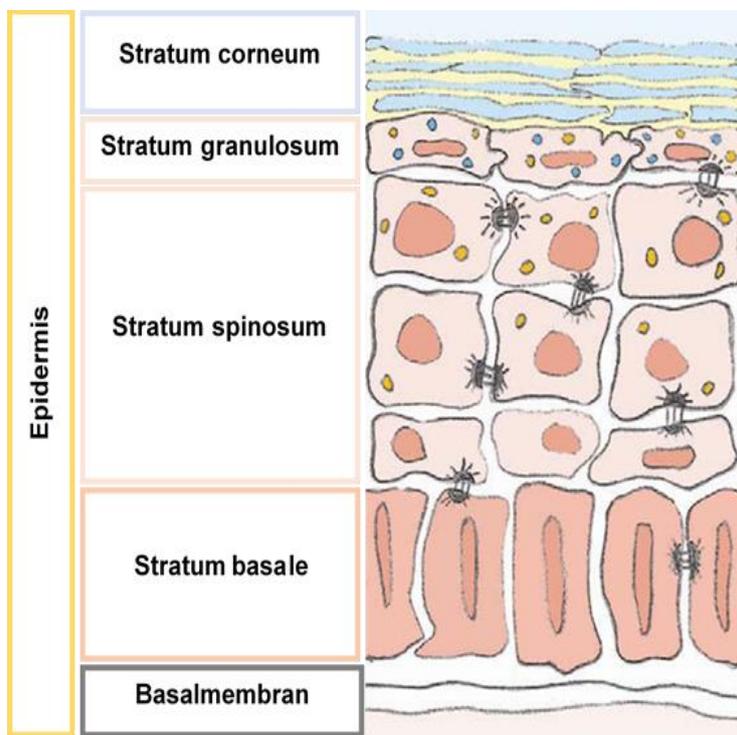
Nach der Isolation der Zellen aus dem Knochenmark, Fettgewebe und sogar der Haut können die hMSC bis auf die 200-fache Zellzahl kultiviert werden. Ein Vorteil gegenüber anderen humanen Gewebezellen besteht in der Stabilität ihrer zellulären DNA. hMSC können über längere Episoden, ohne ihre zellulären Eigenschaften zu verändern, kultiviert werden. Daher eignen sie sich hervorragend für Langzeitstudien (Al-Nbaheen et al. 2013; Grimes et al. 2009; Moratin et al. 2018; Reger et Wolfe 2008). Das Selbsterneuerungspotentials stellt die Fähigkeit, identische Kopien durch Mitose über lange Zeitintervalle bzw. der Lebensdauer des Organismus anzufertigen, dar (Baksh et al. 2004). Diese Eigenheiten sowie die hohe Proliferationsrate definieren hMSC als eine ideale Zellart für zyto- und genotoxikologische Studien. Insbesondere da die meisten nanotoxikologischen Untersuchungen mit ZnO-NP akute Expositions-Situationen simulieren und unser Wissen über die Bioakkumulation sowie die Effekte unter Langzeit-Exposition nur fragmentär vorhanden ist (Scherzad et al. 2017).

Überwiegend zeigte sich aber auch, dass in dem Großteil publizierter nanotoxikologischer Studien unsterbliche Zelllinien, also Tumorzellen oder transformierte Zellen, eingesetzt wurden (Hackenberg et al. 2013). Somit ist die Aussagekraft dieser Studien bezüglich Zyto- und Genotoxizität nur bedingt auf gesunde Zellen sowie gesundes Gewebe zu übertragen. hMSC sind keine malignen Zellen, sondern Gewebevorläuferzellen mit Multipotenz. Daher ist eine größere Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe als mit transformierten Zellen gegeben. Aus diesem Grund ist die Verwendung von Primärzellen wie hMSC supplementär und ausschlaggebend für das allgemeine Verständnis von Nanotoxikologie (Hackenberg et al. 2017). Einen interessanten Ansatz diesbezüglich stellt eine Studie unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2018 dar. Im Rahmen dieser Studie wurde das geno- und zytotoxische Potential von ZnO-NP zwischen primären humanen aus dem Knochenmark entnommenen mesenchymalen Stammzellen (BMSC) und Plattenepithelkarzinom-Zelllinien von Kopf und Hals (FaDu) verglichen. Es zeigte sich, dass Nanopartikelkonzentrationen, welche signifikant zytotoxisch bei den FaDu-Zellen waren, nicht zu einer Verminderung der Vitalität der BMSC führten (Moratin et al. 2018). Dies bekräftigt die Hypothese, dass *in vitro*-Untersuchungen mit malignen Zellen keine adäquate Aussage über die Risikobewertung von Nanopartikeln bezüglich gesunder Zelllinien zulassen.

Auch erscheint die Vergleichbarkeit diverser Studien aufgrund der entweder tierischen oder menschlichen Zellen vielfältigen Ursprungs fraglich. So ist eine differente Empfindlichkeit gegenüber zyto- und genotoxischen Effekten von NPs nicht nur bei malignen vs. benignen Zellen denkbar (Moratin et al. 2018). Die vermuteten toxischen Effekte sowie eine intrazelluläre Migration von Nanomaterialien im humanen Organismus beruht im Wesentlichen auf *in vitro*-Studien sowie Tierexperimenten (Hackenberg 2014a; Kroll et al. 2009). Daher lassen sich die gewonnenen Daten nicht spiegelbildlich auf die *in vivo*-Situation übertragen. Der Einsatz von hMSC anstatt tierischer Zellen ermöglicht ansatzweise eine Annäherung an die tatsächlich *in vivo* ablaufenden Prozesse im menschlichen Körper. Studienunabhängig hebt dies die Wichtigkeit von

*in vivo*-Versuchen zunächst am Tiermodell hervor, um eine umfassende nanotoxikologische Bewertung zu ermöglichen.

Bezugnehmend auf die in unserer Studie verwendeten ZnO-NP steht vor allem die transdermale Aufnahme im Vordergrund. Mit einer Oberfläche von 2 m<sup>2</sup> ist die Haut das größte Organ des Menschen und einer Vielzahl von äußeren Einflüssen ausgesetzt (Greßler et al.). Sie ist ein sich kontinuierlich selbst erneuerndes Organ, das die Oberfläche unseres Körpers bedeckt und eine Barriere zum Schutz gegen pathogene Keime, Strahlung, mechanische und chemische Einflüsse sowie Verlust von Wasser bildet (Baroni et al. 2012). Wie in



**Abbildung 7:** Die Epidermis gliedert sich in vier Schichten und wird durch die Basalmembran von der Dermis getrennt. Im Stratum basale sind die Stammzellen lokalisiert (nach Baroni et al.).

allen regenerativen Geweben finden sich auch in der Haut adulte Stammzellen (Lavker et Sun 1983). Diese sind im Stratum basale lokalisiert (Abb. 7) und für die Regeneration der Haut verantwortlich (Baroni et al. 2012; Jensen et al. 1999). Die in dieser Studie verwendeten und aus Fettgewebe isolierten hMSC sollen repräsentativ auch für die Stammzellen des Stratum basale stehen.

### 1.5.1 Fragestellung und Zielsetzung

Trotz zukunftssträchtiger Neuerungen in Wissenschaft und Medizin durch Nanotechnologie wird die postulierte Unbedenklichkeit von Nanomaterialien in Konsumgütern in der Literatur kontrovers diskutiert. Vor allem aufgrund der Hinweise auf potentiell toxische Eigenschaften bestimmter Nanopartikel ist zur

Gewährleistung eines verantwortungsbewussten Umgangs mit NP eine detaillierte Analyse der Interaktionen mit humanen Zellen notwendig. Insbesondere zu repetitivem Kontakt mit Nanomaterialien ist die Datenlage noch unvollständig.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Darstellung sowohl der zytotoxischen als auch der genotoxischen Effekte der ZnO-NP bei repetitiver Exposition und im Langzeitversuch bis zu 6 Wochen auf humane Zellen. Dies stellt besondere Anforderungen an die Zellkultivierung dar. Der Vorteil der Verwendung von humanen mesenchymalen Stammzellen liegt dabei in der guten Proliferation über mehrere Passagen und der Stabilität des Genoms begründet. Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie sollten zudem die zelluläre Aufnahme der ZnO-NP sowie die zelluläre Distribution und Retention in humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht werden.

Es stellen sich hierbei die folgenden Fragen:

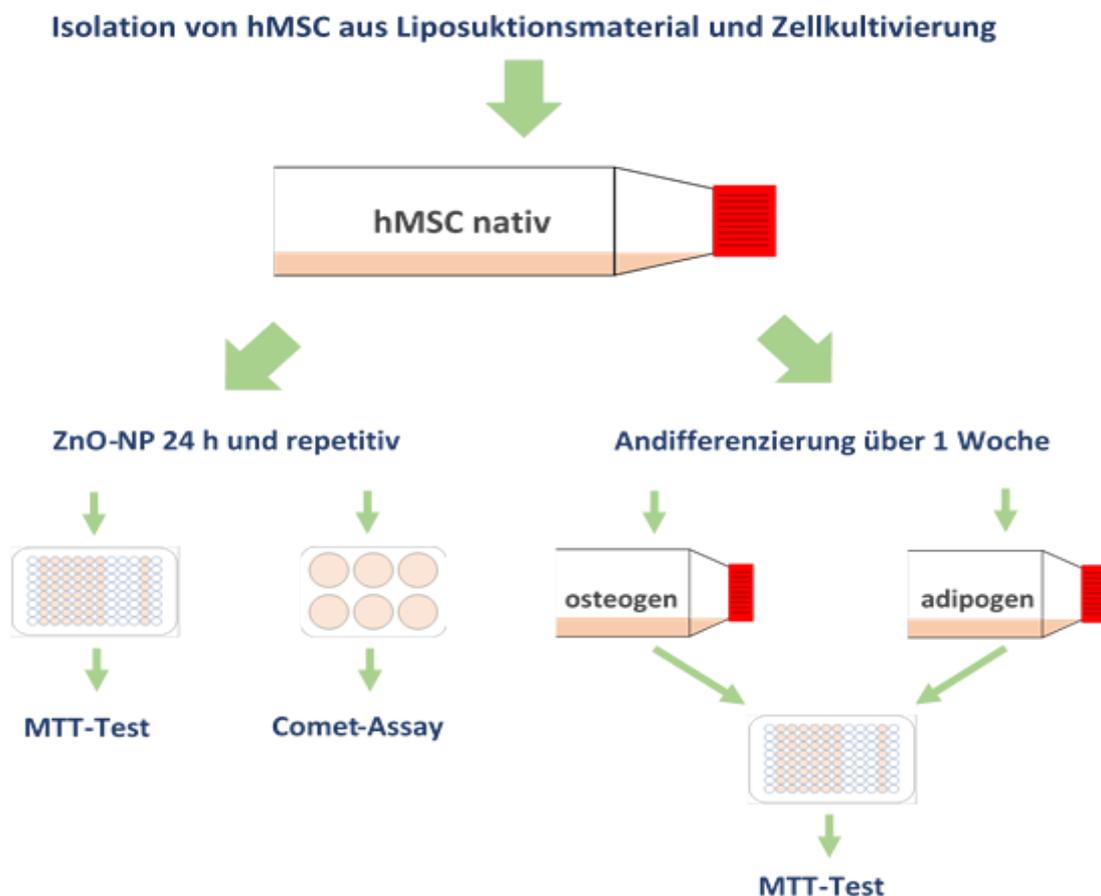
- In welchen Dosis-Bereichen können bei humanen mesenchymalen Stammzellen zyto- oder genotoxische Konzentrationen nachgewiesen werden?
- Werden durch repetitive Expositionen mit in der Einzelexposition nicht zytotoxischen Konzentrationsdosen geno- und zytotoxische Effekte induziert?
- Sind die zytotoxischen Effekte abhängig vom Differenzierungsgrad der hMSC?
- Wie und in welchem Zeitraum werden die Nanopartikel in die Zelle aufgenommen?
- Kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation der Nanopartikel im Langzeitversuch?
- Welche Zellorganellen werden im Rahmen der intrazellulären Distribution infiltriert?

## 2 Material und Methoden

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Zellkultivierung, den jeweiligen Versuchsaufbauten sowie der statistischen Auswertung und graphischen Darstellung. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Zellmedien, Lösungen und Puffer sind in den Tabellen 5 bis 8 hinterlegt.

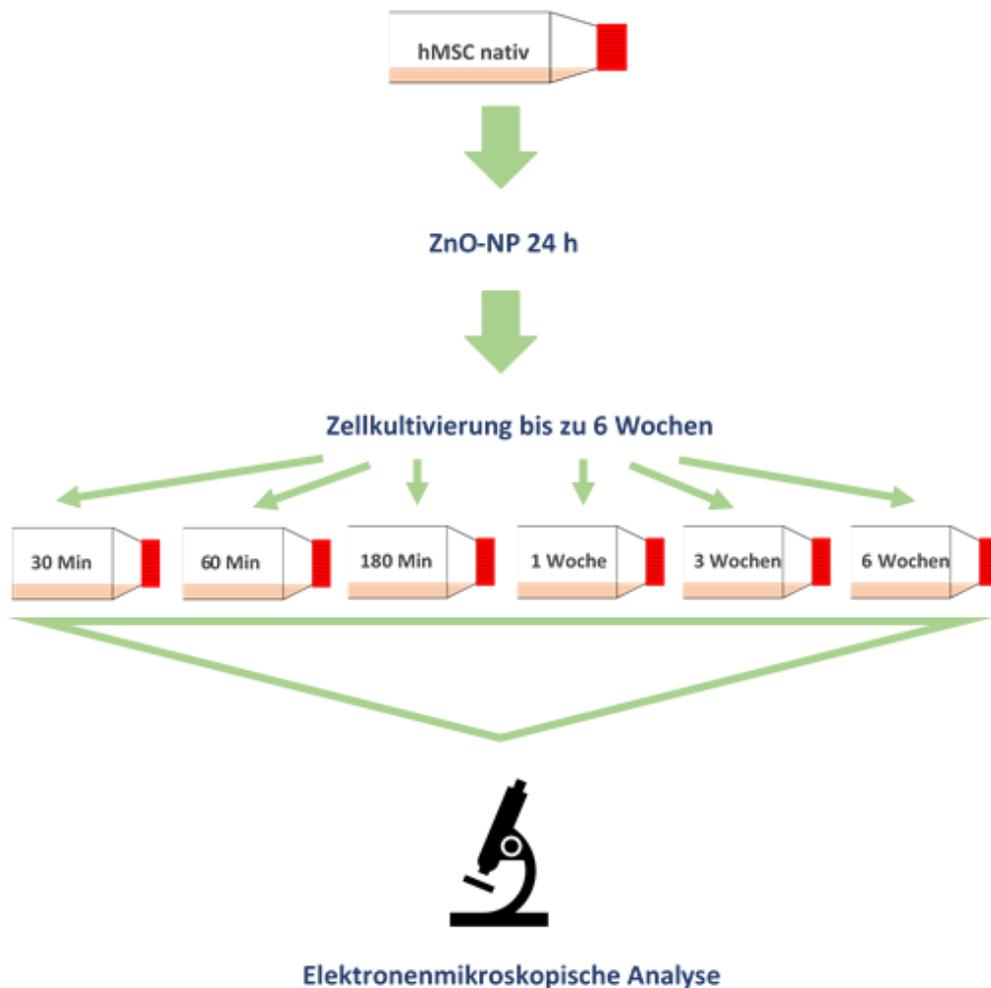
### 2.1 Methoden

Zur Beantwortung der Fragenstellung ergab sich folgender in Flussdiagrammen dargestellter Versuchsaufbau. Abbildung 8 gibt die zyto- und genotoxikologische Analyse der hMSC nach 24-stündiger und repetitiver Inkubation mit ZnO-NP wieder. Zudem ist der Versuchsaufbau der über eine Woche adipogen oder



**Abbildung 8:** Versuchsaufbau der zyto- und genotoxikologischen Analyse: Die hMSC wurden nativ sowie nach einwöchiger Andifferenzierung über 24 Stunden und repetitiv ZnO-NP ausgesetzt. Anschließend wurde der MTT-Test zum Nachweis von Zytotoxizität und der Comet Assay zum Nachweis von Genotoxizität durchgeführt *(eigene Abbildung)*.

osteogen andifferenzierten hMSC abgebildet. Auch diese Zelllinien wurden 24 Stunden mit ZnO-NP inkubiert und anschließend der zytotoxikologischen Analyse zugeführt. Abbildung 9 zeigt den Ablauf der elektronenmikroskopischen Analyse, bei der die hMSC nach 24-stündiger Inkubation mit ZnO-NP über verschiedene Zeitintervalle von bis zu 6 Wochen kultiviert wurden.



**Abbildung 9:** Versuchsaufbau der elektronenmikroskopischen Analyse. Die hMSC wurden nach einer 24-stündigen Inkubation mit ZnO-NP über verschiedene Zeitintervalle von bis zu 6 Wochen kultiviert. Anschließend wurden von den Zellkulturen Gefrierschnitte angefertigt und diese durch Elektronenmikroskopie bezüglich einer zellulären Aufnahme und intrazellulären Distribution ausgewertet (*eigene Abbildung*).

## 2.2 Humane Zellkultur

Es wurden ausschließlich multipotente mesenchymale Stammzellen für die Versuchsreihen verwendet, die im Rahmen von medizinisch indizierten Operationen im Zentrum für operative Medizin (ZOM) der Universitätsklinik

Würzburg aus subkutanem Fettgewebe isoliert wurden. Durch eine intraoperative Probenentnahme im vorliegenden Situs bestanden für die Patienten/Spender keinerlei Risiken oder Gefährdungen. Auch kam es zu keinen Wundsetzungen zur Probenentnahme. Das Patientenkollektiv umfasste acht Personen. Präoperativ erfolgte eine ausführliche, ärztliche Aufklärung über das Spenden von Gewebe zur wissenschaftlichen Verwendung sowie eine schriftliche Einwilligungserklärung. Eine Infektion mit HIV oder Hepatitis sowie maligne Erkrankungen galten als Ausschlusskriterien. Im Sinne des Datenschutzes wurden die Patientenproben pseudonymisiert. Eine Genehmigung des Ethikantrages zur Verwendung von hMSC und des Studienaufbaus erfolgte unter den Nummern E72/06 und E16/06 durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Durch wie folgt beschriebene, standardisierte Verfahren gelang die Anzucht und Kultivierung von nicht kontaminierten hMSC. Es fanden ausschließlich hMSC ab der ersten bis zur vierten Passage Verwendung, da sich die Proliferationsrate sowie die weiteren Eigenschaften der hMSC mit wachsender Passage-Zahl ändern (Reger et Wolfe 2008).

### **2.2.1 Expansionsmedium für Stammzellen**

Als Nährmedium (vgl. Tabelle 6) wurde ausschließlich ein Expansionsmedium (EM) für Stammzellen verwendet. Dieses DMEM-EM wurde aus mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom GmbH) und 1 % P/S (Biochrom GmbH) versetzten DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) hergestellt. Das FCS enthielt viele für die Kultivierung von Stammzellen essenzielle Proteine und Wachstumsfaktoren. Penicillin-Streptomycin wurde präventiv zur Vermeidung von Kontaminationen mit mikrobiologischen Organismen wie Bakterien und Pilzen verwendet. Das Medium wurde kühl gelagert und vor dem Verwenden stets in einem 37°C Schüttelwasserbad (HAAKE SWB25, Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland) erwärmt.

### **2.2.2 Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe**

Zur Verfügung gestelltes Liposuktionsmaterial wurde nach der Operation in autoklavierten Glasflaschen aus dem Operationsaal im ZOM der Universitätsklinik Würzburg abgeholt. Unter laminarer Luftströmung in einer Sterilwerkbank (HERAsafe KS, Thermo Fisher Scientific Inc.) wurden das Gewebe auf sterile Glasflaschen (Labor-Glasflasche 250 ml, Teqler®, Wecker, Luxemburg) aufgeteilt bis diese halb gefüllt waren. Falls das Fettgewebe noch blutig war, wurde es im nächsten Schritt in zwei Zyklen mit 500 ml phosphatgepufferter Salzlösung 1x (PBS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und 10 ml 1 % Penicillin-Streptomycin (P/S, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen. Mit Pasteurpipetten (Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) konnte das Blut sorgfältig von unten abgesaugt werden. Folgend wurden 10 mg sterilfiltrierte Collagenase P (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) pro 100 ml Liposuktionsmaterial zu PBS und P/S gegeben. Die Deckel der Glasflaschen wurden mit einer Folie (Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging Inc., Menasha, WI, USA) so verschlossen, dass eine Zellatmung noch möglich war. In einem desinfizierten Inkubations-Schüttler (Typ New Brunswick E24R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 1500 U/min erfolgte eine dreistündige Verdauung bei 37°C. Dann wurde das zellhaltige Liposuktionsmaterial auf 50 ml Röhrchen (Falcon-Tubes, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) verteilt und bei 1300 U/min für 10 min abzentrifugiert. Dabei entstanden drei Phasen: Pelletierte Zellphase, Blutphase und Fettphase. Die beiden letzteren wurden anschließend dekantiert und verworfen.

In der weiteren Aufbereitung wurde zu jedem Zellpellet 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) gegeben und die Zellen darin resuspendiert. Dann wurden je vier 5 ml-Ansätze zu einem Ansatz mit 20 ml Volumen vereinigt und für 10 min im Schüttler (New Brunswick E24R, Eppendorf AG) bei 37°C inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation mit 1300 U/min für 10 min. Die entstandenen Überstände wurden abgesaugt und verworfen. Die Zellpellets wurden in je 10 ml mit 1 % P/S (Biochrom GmbH)

versetztem PBS (Roche Diagnostics GmbH) resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Die nun entstandenen Pellets wurden in 10 ml DMEM-EM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde gefiltert und das Zellfiltrat auf Zellkulturflaschen (Cellstar Gewebekulturflaschen 175 cm<sup>2</sup>, Mediscan GmbH & Co. KG, Kremsmünster, Österreich) unter Zugabe von 25 ml DMEM-EM verteilt. Nach Adhärenz erfolgte der erste Mediumwechsel nach 24 Stunden, dann folgend alle 2-3 Tage. Je nach Bedarf konnten die isolierten, multipotenten, adipogenen, mesenchymalen Stammzellen weiter kultiviert oder zur Lagerung kryokonserviert werden.

### 2.2.3 Zellkultivierung

Die multipotenten, adipogenen hMSC wurden in Kulturflaschen (Cellstar Gewebekulturflaschen 175 cm<sup>2</sup>, Mediscan GmbH & Co. KG) mit 25 ml DMEM-EM im Brutschrank (Typ CB 210, BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dreimal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel. Nichtadhärente Zellen konnten auf diese Weise entfernt werden. Die Beurteilung des Zellwachstums und der Eignung der Zelle für die Versuche erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Typ 473028, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Sobald die Zellen ein dichtes Wachstum mit einer Konfluenz von > 70% aufwiesen, wurden sie passagiert. Eine Konfluenz von über 90 % wurde aufgrund der dann auftretenden Kontaktinhibition der Zellteilung vermieden. Beim Passagieren erfolgte eine Waschung mit 7 ml PBS (Roche Diagnostics GmbH) und anschließend eine 4 Minuten dauernde Exposition mit 4 ml 0,25 % Trypsin-EDTA 1x (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) im Brutschrank. Durch Klopfen auf dem Flaschenboden wurden noch angewachsene Zellen mechanisch gelöst. Um die Wirkung des Trypsins aufzuheben, wurde zu den Zellen 25 ml DMEM-EM gegeben und mit einer 20 ml Pasteurpipette (Brand GmbH + Co. KG) die Zellsuspension mehrmals resuspendiert. Noch adhärenz Zellen wurden abgespült. Die Zellsuspension wurde anschließend in einem 50 ml Falcon-Tube (Greiner Bio-One GmbH) gesammelt. Eine Bestimmung der Zellkonzentration wurde nach dem im Kapitel 2.2.4 genannten Verfahren

durchgeführt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Durchführung der Testverfahren oder die Zellen wurden in neuen Flaschen kultiviert.

#### **2.2.4 Zellzählung**

Mit einem automatischen Zellzähler (CASY Cell Counter & Analyzer Systems TT, OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland) wurden neben der absoluten Zellzahl auch die Anzahl der vitalen Zellen sowie die gesamte Vitalität in Prozent gemessen. Hierfür wurden aus der Zellsuspension 100 µl entnommen und in ein mit 10 ml isotoner Salzlösung (CASYton, OMNI Life Science GmbH & Co. KG) gefülltes und beschriftetes Messröhrchen (CASY-Cups, OMNI Life Science GmbH & Co. KG) überführt. Ein Durchmischen der Messprobe erfolgte durch zweimaliges Drehen des Messröhrchens.

Nach dem Einschalten des Zellzählers wurde über das Menü die Mess-Einstellung gewählt. Mesenchymale Stammzellen entsprechen dem Setup 07. Über eine definierte Kapillare mit Elektroden erfolgte eine Dreifachmessung des elektrischen Widerstands der Zellen (Omni Life Sciences 2018). Anhand der Messparameter konnte beurteilt werden, ob sich die Zellkultur für die folgenden Versuche eignete. Nach jeder Messung erfolgte ein Reinigungszyklus mit einem Kapillar- und Systemreiniger (CASYclean, OMNI Life Science GmbH & Co. KG).

#### **2.2.5 Kryokonservierung**

Um Zelllinien auch für spätere Versuche verwenden zu können, wurden diese kryokonserviert. Nach initialer Zählung wurden Zellen mit mindestens einem Volumen von  $1 \times 10^6$ /ml in ein Falcon-Tube (Greiner Bio-One GmbH) überführt. Anschließend wurden die Zellen 7 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert (Zentrifuge 5810R, Eppendorf AG). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 1 ml Einfriermedium sorgfältig resuspendiert und in ein Kryotube (Kryoröhrchen Nalgene™, Thermo Fisher Scientific Inc.) überführt. Das Einfriermedium aus 1 ml FCS (Biochrom GmbH) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) bot einen effizienten Kälteschutz für hMSC (Reger et Wolfe 2008). Um die Zellen nicht zu schädigen, erfolgte eine langsame Kühlung um 1 °C/min in einem Isopropanoltopf (Cryo 1 % Freezing

Container, Thermo Fisher Scientific Inc.). In diesem wurden die Zellen mindestens 48 Stunden aber maximal 72 Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Anschließend wurden die Zellen in eine flüssige Stickstoffatmosphäre überführt und konnten mit einer 30-75 prozentigen Überlebensrate über mehrere Jahre erhalten werden (Reger et Wolfe 2008). Je nach Bedarf konnten die Zelllinien wieder aufgetaut und kultiviert werden.

Ein schonendes und schnelles Auftauen der Zelllinien erfolgte in einem  $37^{\circ}\text{C}$ -Schüttelwasserbecken (HAAKE SW B25, Thermo Electron GmbH). Dies verhinderte die Bildung von schädigenden Eiskristallen intrazellulär (Reger et Wolfe 2008). Die aufgetaute Zellsuspension wurde mit 10 ml vorgewärmten Nährmedium (DMEM) versetzt und für 7 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem DMEM-EM versetzt und zügig in eine Kulturflasche (CellStar Gewebekulturflasche  $175\text{ cm}^2$ , Mediscan GmbH & Co. KG) überführt. Ein erster Mediumwechsel fand nach Adhärenz der Zellen am Folgetag statt. Nach einer Passage konnten die Zellen für Versuche verwendet werden.

### 2.3 Nanopartikel

Für die Versuche wurden Zinkoxid-Nanopartikel (Zinc oxide nanopowder  $< 100\text{ nm}$ , Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit einer vom Hersteller angegebenen Reinheit von  $> 99\%$  verwendet. Zur Herstellung der Expositions-Suspension wurden 10 mg ZnO-NPs abgewogen und in  $870\text{ }\mu\text{l}$  destilliertem Wasser (eigene Herstellung) gelöst. Die Lösung wurde zwei Minuten lang im Ultraschallhomogenisator (Sonopuls HD 60, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) bei  $4,2 \times 100\text{ kJ/m}^3$  sonikiert. Für einen hohen Dispersionsgrad wurden  $30\text{ }\mu\text{l}$   $1,5\text{ mg/ml}$  Bovines Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hinzugefügt. Dies verhinderte auch ein erneutes Verklumpen. Zuletzt wurden  $100\text{ }\mu\text{l}$  zehnfach konzentriertes PBS (Roche Diagnostics GmbH) dazugegeben. Hierdurch konnte eine physiologische Salzkonzentration mit einem pH-Wert von 7,4 erreicht werden. Im Anschluss konnten die Stammlösungen mit den entsprechenden Konzentrationen von 0,01,

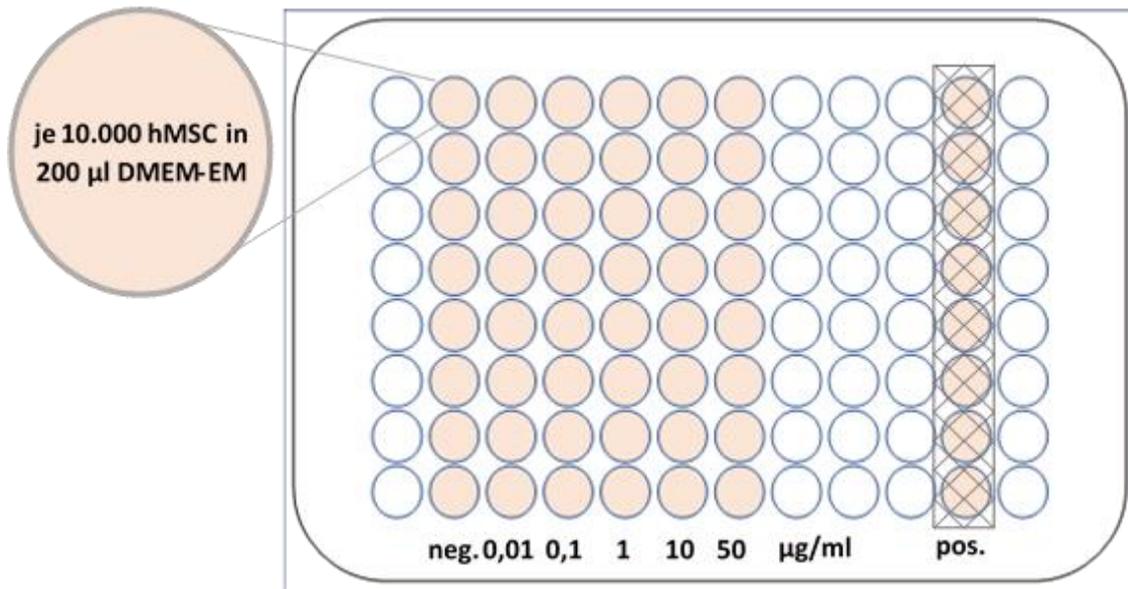
0,1, 1, 10, 50 µg/ml ZnO-NP angesetzt werden. Dabei wurde die ZnO-NP in DMEM-EM entsprechend verdünnt und anschließend umgehend verwendet.

#### 2.4 MTT-Test

Zur Messung der zytotoxischen Effekte fand der von Mosmann 1983 erstmals beschriebene MTT-Test Verwendung. Dieser basiert darauf, dass vitale Zellen in der Lage sind, den safrangelben und wasserlöslichen Farbstoff Thiazolylblau oder auch 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid (MTT) aufzunehmen. Intrazellulär wird der Farbstoff zum blauvioletten und wasserunlöslichen Formazan reduziert und bestimmt so die mitochondriale Aktivität (Kumar et al. 2018; Mosmann 1983). Die Quantifizierung beruht auf einer Absorptions- bzw. Fluoreszenzmessung (Holder et al. 2012). Er gehört zu den weltweit am häufigsten verwendeten Anwendungen zur Messung von Zellproliferation, Zellvitalität und Zytotoxizität von Stoffen (Stepanenko et Dmitrenko 2015). Das Testverfahren ist für den Gebrauch von 96-Well-Platten ausgelegt, diese Miniaturisierung erlaubt es, viele Proben gleichzeitig und schnell zu analysieren (Weyermann et al. 2005). So können mit dem MTT-Test die Zellproliferation sowie die Zellaktivität und damit indirekt auch die Zytotoxizität einer exponierten Substanz nachgewiesen werden. Mit einem Multiwell-Scanning-Spectrophotometer konnte der Anteil des Formazans mit hoher Präzision gemessen werden (Mosmann 1983).

Nach dem Ablösen und Zählen wurden die Zellen auf einer 96-Wellplatte (96-Well Cell Culture Plate, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät. Dabei wurde die Zelldichte so gewählt, dass sich pro Well jeweils 10.000 Zellen in 200 µl DMEM-EM befanden. Die NP-Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10, 50 µg/ml sowie die Negativkontrolle wurden mittig und mit zwei bis drei Zeilen Abstand zur Positivkontrolle angeordnet (Abb. 10). Es folgte eine 24-stündige Anwachsphase der adhärennten Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Typ CB 210, BINDER GmbH). Nach Prüfung der Adhärenz unter dem Lichtmikroskop (Typ 473028, Carl Zeiss AG) folgte die 24-stündige Exposition mit ZnO-NP der entsprechenden Konzentration. Die Stammlösungen wurden stets frisch nach dem in Kapitel 2.3 beschriebenen Procedere hergestellt. Als Negativkontrolle

diente DMEM-EM. Als Positivkontrolle wurde zytotoxisches tert-Butylhydrogenperoxid (tbHP, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verwendet. Hierfür wurden 50 µl tbHP in 950 µl DMEM gelöst und anschließend aufgetragen. Es folgte ebenfalls eine 24-stündige Exposition.



**Abbildung 10:** Versuchsaufbau MTT-Test, 96-Wellplatte nach Aussaat der hMSC mit den NP-Konzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10; 50 µg/ml sowie der Negativ- (neg.) und Positiv-Kontrolle (pos.) mit Parafilm (karierte Fläche) (eigene Abbildung).

Die Positivkontrollen wurden zudem mit einer undurchlässigen Folie (Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging Inc.) versehen, um eine Beeinflussung der anderen Proben zu verhindern. Nach Ablauf der Exposition wurde zunächst DMEM im Schüttelwasserbad (HAAKE SWB25, Thermo Electron GmbH) bei 37°C erwärmt. Mit Hilfe der Feinwaage (Präzisionswaage H 110, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) wurden 15 mg MTT (Thiazolylblau, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) abgewogen und in ein 50 ml Röhrchen (Falcon-Tube, Greiner Bio-One GmbH) überführt. Anschließend wurden 10 ml DMEM dazugegeben und alles mit einem Kleinschüttler (Vortex Genie 2, Bender & Hobein GmbH, Zürich, Schweiz) durchmischt. Nun wurde das alte Medium mit ZnO-NP sowie Negativ- als auch Positivkontrolle abgesaugt und jeweils 100 µl pro Well des mit MTT versetzten DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc.) aufgetragen. Es folgte eine 4-stündige Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff im Brutschrank (CB210, BINDER GmbH) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Nach dem Einwirken des MTT wurde dieses abgesaugt und 100 µl Isopropanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) pro Well aufgetragen. Nach einer 25-minütigen Exposition erfolgte die photometrische Messung des Formazan durch ein Plattenlesegerät (Elisa Microplats Reader ELx800, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 570 nm. Basierend auf diesen Daten wurde für jede Konzentration und Kontrolle der Mittelwert berechnet und anschließend die Vitalität der Zellen in Prozent bestimmt. Dabei entsprach die Negativkontrolle stets 100 %.

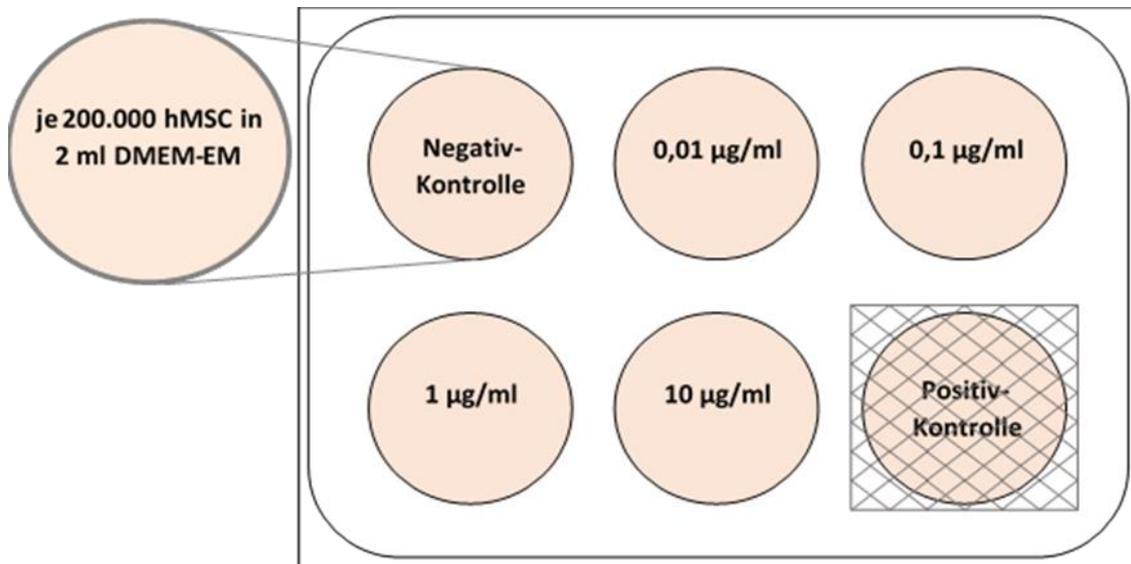
## **2.5 Comet Assay**

Der Comet Assay wird auch Einzelzellmikrogelelektrophorese genannt und ermöglicht den Nachweis von DNA-Schäden in einzelnen Zellkernen. Erstmals beschrieben wurde dieses Verfahren von Østling und Johanson im Jahre 1984 (Østling et Johanson 1984). Basierend auf diesen Ergebnissen entwickelten Singh (Singh et al. 1988) und Olive (Olive 1989) das Verfahren mit der Neuerung einer alkalischen Elektrophorese weiter. Dadurch war es erstmalig möglich, neben den DNA-Doppelstrangbrüchen auch DNA-Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen nachzuweisen. Das Prinzip des Comet Assays beruht auf der Lyse von in Agarose fixierten einzelnen Zellen. Nach Auflösung der Zellmembran sowie der Kernmembran liegt das genetische Erbgut der Zelle frei. Durch die folgende Exposition mit dem alkalischen Elektrophoresepuffer kommt es zur Relaxation und der Entwindung der DNA-Doppelhelix. Danach werden die freiliegenden Kerne einem elektrischen Feld ausgesetzt, innerhalb dessen die negativ geladene DNA von der Kathode zur Anode wandert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die beschädigten Kerne als Kometen mit Schweifen aus DNA-Fragmenten sichtbar. Dabei befinden sich die intakte DNA im Kopf und die geschädigte und fragmentierte DNA im Schweif. Die Länge des Schweifes korreliert mit dem Ausmaß der Schädigung und entspricht der Schweiflänge der DNA-Wanderung in der Elektrophorese. Aufgrund der Fluoreszenzstärke und der Schweiflänge können die genotoxischen Effekte quantitativ erfasst werden. Als einheitslose Maßeinheit für die Quantifizierung der DNA-Schädigung dient der Olive Tail

Moment (Olive et al. 1993). Dieser wird als Produkt des prozentualen DNA-Anteils im Schweif (%TD) und der Distanz zwischen den Massezentren des Zellkerns und des Schweifes definiert (Mozaffarieh et al. 2008). Als Messparameter eignet sich der OTM bei der Beschreibung von Heterogenität innerhalb einer Zellpopulation, da die unterschiedliche DNA-Verteilung im Schweif berücksichtigt wird (Kumaravel et al. 2009). Als weiterer Parameter kann die Tail Length (TL) erfasst werden. Diese entspricht der Schweiflänge und damit der DNA-Migration im elektrischen Feld.

Im Rahmen der Vorbereitungen für den Comet Assay wurden die Zellen zunächst nach dem Ablösen gezählt und die Vitalität gemessen. Lag diese unter 80 %, wurden die Zellen nicht verwendet. Anhand der Zellzahl konnte die Aussaat so berechnet werden, dass sich in jedem der Wells etwa 200.000 Zellen in 2 ml Zellsuspension befanden. Es folgte das 24-stündige Anwachsen der Zellen in einer 6-Wellplatte (6-Well Cellculture Plate, Greiner Bio-One GmbH) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Dann wurde die Adhärenz der Zellen unter dem Lichtmikroskop (Typ 473028, Carl Zeiss AG) kontrolliert. Folgend wurden 10 mg ZnO-NP und 15 mg BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit 1 ml destilliertes Wasser (eigene Herstellung) in je ein Reaktionsgefäß (Eppendorf-Tube 3810X 1,5 ml transparent, Eppendorf AG) gegeben. Die Expositionslösungen wurden nach dem im Kapitel 2.3 beschriebenen Schema hergestellt. Es wurde basierend auf den Ergebnissen des MTT-Test die nicht zytotoxischen NP-Konzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10 µg/l auf das entsprechende Well aufgetragen (Abb. 11). Für die Positivkontrolle wurde MMS (Methylmethansulfonat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verwendet. Hierfür wurden zunächst 8,4 µl MMS in 991,4 µl DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gelöst. Im nächsten Schritt wurden 20 µl der Lösung entnommen und in 80 µl DMSO überführt. Anschließend konnten 20 µl in 2 ml DMEM-EM gelöst und in das entsprechende Well übertragen werden. Um eine Beeinflussung der anderen Proben zu verhindern, wurde die Positivkontrolle mit einer Folie (Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging Inc.) versiegelt. Als Negativkontrolle fand DMEM-EM Verwendung. Abhängig vom Versuchsaufbau

erfolgte eine 24 stündige oder repetitive Exposition der Zellen mit den Nanopartikeln.



**Abbildung 11:** 6-Wellplatte des Comet Assay nach Aussaat der hMSC mit den nicht-zytotoxischen NP-Konzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10 µg/ml sowie der Negativ- und Positiv-Kontrolle mit Parafilm (karierte Fläche) (*eigene Abbildung*).

Um eine Kühlung von 4°C zu erreichen, wurde der Elektrophorese-Puffer bereits am Vortag hergestellt. Dafür wurden 1870 ml Aqua bidestillata (eigene Herstellung) zusammen mit 120 ml Natriumhydroxid (5M NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 10 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA 0,2M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) vermischt. Ferner wurden Objektträger (Objektträger 26 x 76 mm, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) einseitig mit einer Mischung von 1,5 g Normal-Agarose (Agarose Typ I normal melting point, Carl Roth GmbH + Co. KG) und 100 µl PBS (Roche Diagnostics GmbH) beschichtet und 12 h getrocknet. Dies führte später zu einer erhöhten Haftung der gelösten Zellen auf dem jeweiligen Objektträger.

Nach der NP-Exposition folgte die Ablösung der Zellen. Die Zellsuspension wurde in Reaktionsgefäße (Eppendorf-Tube 3810X 1,5 ml transparent, Eppendorf AG) überführt und 2 Minuten bei 21°C und mit 1300 U/min zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf AG). Der Überstand bis auf 100 µl wurde verworfen. Folgend wurde Low-Melting-Agarose (Agarose Type II low melting point, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in einer Mikrowelle (Bauknecht, Schorndorf,

Deutschland) verflüssigt und auf einer Heizplatte (Typ M6, CAT / M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland) warmgehalten. Das Pellet und der restliche Überstand wurden mit einer Pipette (Pipettenspitze 200 µl, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 180 µl der erwärmten Agarose überführt. Jeweils 60 µl wurden auf die agarosebeschichteten Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen (Deckgläser 24 x 32 mm, Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) versehen. Nach einem drei bis fünf Minuten dauernden Antrocknen konnten die Deckgläser wieder entfernt werden. Insgesamt wurden zwei Objektträger pro ZnO-NP-Konzentration angefertigt. Dann wurden die agarosefixierten Zellen UV-Licht-geschützt in einer Küvette (Küvette Typ Hellendahl, Carl Roth GmbH + Co. KG) Lysepuffer ausgesetzt. Die Lyse fand stets bei 4°C mit einer minimalen Dauer von 90 min bis maximal 24 h statt. Für die Elektrophorese wurde die Elektrophoresekammer (Elektrophoresekammer 220 V-50 H, Renner, Dannstadt, Deutschland) in Eis gebettet und mit dem auf 4°C abgekühlten Elektrophorese-Puffer befüllt. Dann konnten die Objektträger bei der Anode beginnend waagrecht in der Elektrophorese-Kammer platziert werden. Dabei wurden nicht ausgefüllte Stellen mit leeren Objektträgern besetzt und darauf geachtet, dass alle Objektträger mit dem Puffer bedeckt waren. Anschließend wurden die Zellen lichtgeschützt 20 min der alkalischen Pufferlösung zur Denaturierung und Entwinden der DNA-Stränge ausgesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 300 mA und einer Stromspannung von 25 V gestartet. Zuvor war die Stromstärke durch vorsichtige Volumenänderungen am Elektrophorese-Puffer eingestellt worden. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Objektträger der Kammer entnommen und 5 min in eine Küvette mit TRIS-Neutralisationspuffer (pH 7,4) gestellt. Schließlich konnten nach dem Abtropfen die Proben mit Ethidiumbromid (Merck KGaA) angefärbt werden. Dabei wurden jeweils 20 µl der Färbelösung aufgetragen und die Objektträger mit Deckgläsern versehen. Unter Ausschluss von Licht konnten die Präparate feucht bis zu sieben Tage bei 4°C gelagert werden.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Comet 5.5 (Kinetic Imaging, Liverpool, UK). Insgesamt wurden pro Konzentration ZnO-NP 100 Zellkerne (50

pro Objektträger) bei einer 40fachen Vergrößerung fluoreszenzmikroskopisch (Fluoreszenzmikroskop DM 4000B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet. Die Daten wurden mit Microsoft Excel (Office Excel 2010, Microsoft, Redmond, WA, USA) tabellarisch sowie graphisch dargestellt und gespeichert.

## **2.6 Repetitive Versuche**

Mit der repetitiven Versuchsreihe wurden die zytotoxischen und genotoxischen Effekte auf die Zellen und auf deren Erbgut nach wiederholter Exposition mit nicht zytotoxischen Konzentrationen von 0,01; 0,1; 1 und 10 µg/ml ZnO-NP untersucht. Nach entsprechender Kultivierung wurden die Zellen jeweils eine Stunde der entsprechenden Konzentration ZnO-NP exponiert. Danach schloss sich eine einstündige Erholungsphase an. Dieser Zyklus wurde insgesamt dreimal wiederholt, sodass insgesamt eine dreistündige Exposition der hMSC mit den ZnO-NP erfolgte. Anschließend wurde sowohl der MTT-Test als auch der Comet Assay durchgeführt.

## **2.7 Langzeitversuche und Elektronenmikroskopie**

Die zelluläre Aufnahme sowie die intrazelluläre Akkumulation und Verteilung der NP wurde mit Kurz- und Langzeitversuchen und anschließender elektronenmikroskopischer Auswertung exemplarisch an einer Zelllinie untersucht. Dabei wurden die Zellen mit der Konzentration von 10 µg/ml ZnO-NP über die Zeiträume von 0,5 h, 1 h, 3 h, 1 Woche, 3 und 6 Wochen kultiviert und exponiert. Insgesamt wurden pro Zellkulturflasche (CellStar Gewebekulturflasche 175 cm<sup>2</sup>, Mediscan GmbH & Co.KG) 200.000 Zellen ausgesät. Nach Adhärenz wurden die ZnO-NP für die entsprechende Expositionsdauer aufgetragen. Anschließend folgten der regelmäßige Mediumwechsel mit partikelfreiem DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc.) und die Kultivierung der Zellen bis zu sechs Wochen.

Folgend wurden die Zellen abgelöst und zunächst in 15 ml Falcon-Tubes (Greiner Bio-One GmbH) überführt. Nach einer 4-minütigen Zentrifugation (Zentrifuge 5810R, Eppendorf AG) bei 1500 U/min wurde der Überstand bis auf etwa 1 ml

abgesaugt und das Pellet darin gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf-Tube 3810X 1,5 ml transparent, Eppendorf AG) überführt und erneut zwei Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin bis knapp über das Pellet abgesaugt und die Zellen mit 950 µl Glutaraldehyd (GA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) fixiert. In der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften wurden die Pellets dann bei 4°C mit 2 % Formaldehyd (FA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 2,5 % GA für 30 bis 45 Minuten fixiert. Daran schloss sich eine Waschung der Präparate mit 50 mM Cacodylatpuffer an. Dieser Schritt wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Nach erneuter Fixation der Proben mit 2 % gepuffertem Osmiumtetroxid (Carl Roth GmbH + Co. KG) für 120 min folgte eine fünfmalige Waschung mit destilliertem Wasser (eigene Herstellung). Über Nacht wurden die Zellproben mit 2 % wässrigem Uranylacetat (Science Services GmbH, München, Deutschland) kontrastiert und anschließend wieder fünfmalig mit destilliertem Wasser gewaschen. Im weiteren Procedere erfolgte die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (Ethanol ≥99,5 % Ph.Eur., reinst, Carl Roth GmbH + Co. KG) und die anschließende Einbettung und Polymerisation in Epon 812 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Im Anschluss wurden die Zellproben getrocknet und ultradünn geschnitten. Es folgte die elektronenmikroskopische Analyse der intrazellulären NP-Distribution innerhalb von 1 bis 2 Wochen. Das Transmissionselektronenmikroskop (JEM-2100, JOEL GmbH, Freising, Deutschland) wurde vom Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften zur Verfügung gestellt. Die angefertigten Schnitte wurden systematisch nach Nanopartikel, insbesondere in den Zellorganellen und Zellkernen abgesucht. Für die Fragestellung interessante Vorgänge wurden fotografiert und anschließend digitalisiert. Die Sicherung der Aufnahmen erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop 2010 (Adobe Inc., San José, CA, USA).

## **2.8 Abhängigkeit der Toxizität vom Differenzierungsgrad**

Um festzustellen, ob Zellen, die sich aus den multipotenten mesenchymalen Stammzellen differenzieren, toleranter gegenüber den toxischen Eigenschaften der ZnO-NP sind, wurden die hMSC über 7 Tage zu adipogenen und osteogenen

Zellen andifferenziert. Die Differenzierungsmedien basierten auf DMEM-EM, diesem wurden die jeweiligen Zusätze hinzugefügt (Tab. 7 und 8). Der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich, wobei das adipogene Differenzierungsmedium stets frisch und das osteogene Differenzierungsmedium wöchentlich hergestellt wurden. In einer 6-Well-Platten (6-Well Cell Culture Plate, Greiner Bio-One GmbH) wurden jeweils 20.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach einer 24-stündigen Anwuchsphase und Kontrolle der Adhärenz wurde je Well 100 µl Differenzierungsmedium aufgetragen. Die Andifferenzierung der hMSC zu Fett- und Knochenzellen dauerte 7 Tage. Anschließend folgte eine Kontrolle der Adhärenz sowie der Zelldichte unter dem Lichtmikroskop (Typ 473028, Carl Zeiss AG). Die hMSC wurden 24 Stunden mit 0,01, 0,1, 1, 10 µg/ml ZnO-NP inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurde tbHP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) über denselben Inkubationszeitraum aufgetragen. Zur Negativkontrolle wurde DMEM-EM verwendet. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der Zytotoxizität anhand des MTT-Tests. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten belassen. Erst das Isopropanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde nach der Einwirkzeit in die 96-Well-Platte (96-Well Cell Culture Plate, Greiner Bio-One GmbH) überführt. Abschließend erfolgte die Messung mit einem Plattenlesegerät (Elisa Microplate Reader ELx800, BioTek Instruments GmbH) bei 570 nm und die statistische Auswertung der Daten.

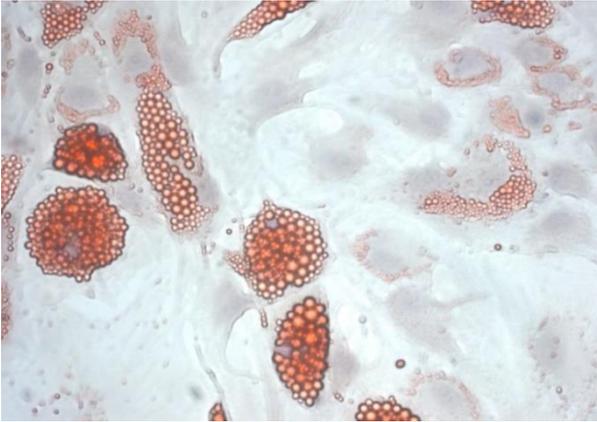
### **2.8.1 Gefrierschnitte der andifferenzierten Zellkultur**

Für den lichtmikroskopischen Beweis der osteogenen und adipogenen Andifferenzierung durch spezielle Färbungen wurden Gefrierschnitte angefertigt. Nach der Zellkultivierung wurden die Zellen gelöst und zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde stufenweise mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth GmbH + Co. KG) über Nacht fixiert. Die Fixation diente der Stabilisierung der intrazellulären Bestandteile. Danach erfolgte eine zweimalige Waschung der Präparate mit 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (NaPP). Anschließend folgte eine Inkubation zum Gefrierschutz mittels einer 30 % Saccharose-Lösung (Saccharose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 0,1 M NaPP bis das Gewebe abgesunken war. Darauffolgend wurden die Präparate erneut einer 30 %

Saccharose-Lösung in 0,1 M NaPP sowie dem Kryo-Einbettmedium Tissue-Tek (Tissue-Tek O.C.T Compound, Sakura Finetek Germany GmbH, Umkirch, Deutschland) im Verhältnis 1:1 für mindestens 8 Stunden ausgesetzt. Folgend wurden die Zellen erneut für mindestens 8 Stunden in Tissue-Tek (Tissue-Tek O.C.T Compound, Sakura Finetek Germany GmbH) gegeben und anschließend auf Kryo-Einbettformen (Cryomolds 4728, Sakura Finetek Germany GmbH) überführt. Diese wurden auf einen ca.  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Edelstahlblock eigener Herstellung gebettet, sodass diese von unten nach oben einfroren. Dann konnten die Präparate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt mittels Kryostat (Leica GM 1510, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei  $-23^{\circ}\text{C}$  und einer Schnittdicke von  $10\ \mu\text{m}$  koronar geschnitten werden. Folgend wurden die Schnitte der entsprechenden Färbung zugeführt.

### **2.8.2 Histologische Färbung der andifferenzierten Kultur**

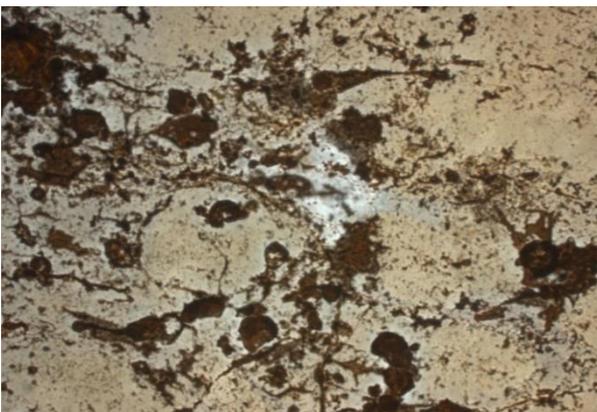
Der Nachweis der adipogenen Andifferenzierung gelang durch die von Lillie 1944 beschriebene Oil-Red-O-Färbung. Die Gefrierschnitte wurden einmalig mit Aqua bidestillata (eigene Herstellung) zur Rehydrierung gewaschen und anschließend in einer 1,2-Propylenglycol-Lösung 100 % für 5 Minuten inkubiert. Zeitgleich wurde die Oil-Red-O-Färbelösung entsprechend dem Protokoll angefertigt und im Wasserbad (Laborwasserbad HAAKE P10, Thermo Electron GmbH) auf  $60^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die Schnittserie wurde 10 Minuten der Farbe-Lösung ausgesetzt und folgend für 2 Minuten in eine 85 % 1,2-Propylenglycol-Lösung (Propylenglycol, Fauth GmbH + Co. KG, Mannheim, Deutschland) gegeben. Dann wurden die Schnitte zum Entfernen der Färbelösung dreimalig mit Aqua bidestillata gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation über 30 Sekunden mit der Hämatoxylin-Lösung nach Mayer (Merck KGaA). Damit die Lipide bis zum Mikroskopieren nicht platzten, wurden die Schnitte in PBS (Roche Diagnostics GmbH) gebettet und dadurch auch ein Austrocknen verhindert. Zusätzlich wurden Deckgläschen  $24 \times 32\ \text{mm}$  (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) aufgelegt. Im Lichtmikroskop (Typ 473028, Carl Zeiss AG) zeigten sich (Abb.12) die Fettvakuolen intensiv rot bis orange und die Zellkerne mit ausgeprägt blauer Färbung (Lillie 2009).



**Abbildung 12:** Oil-Red-O-Färbung von adipogen andifferenzierten hMSC: Darstellung der Fettvakuolen rot bis orange (*eigene Abbildung*).

Die osteogene Andifferenzierung wurde mittels der Von-Kossa-Färbung (Von Kossa 1901) nachgewiesen. Zur Rehydrierung wurden die Gefrierschnitte einmalig

mit Aqua bidestillata gewaschen. Dann folgte eine Inkubation mit einer einprozentigen Silbernitrat-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 20 Minuten unter einer UV-Lampe (Desaga Uvis, Heidelberg, Deutschland). Nach dreimaliger Waschung mit Aqua bidestillata wurde die Schnittserie 5 Minuten einer fünfprozentigen Na-Thiosulfat-Lösung (Natriumthiosulfat, Merck KGaA) exponiert. Anschließend folgte eine erneute dreimalige Waschung mit Aqua bidestillata. Die Gegenfärbung wurde mit Kernechtrot (Nuclear Fast Red, Merck KGaA) für 5 Minuten durchgeführt und es schloss sich eine weitere dreimalige Waschung mit Aqua bidestillata an. Abschließend wurden die Schnitte mittels aufsteigender EtOH-Reihe (70 %, 90 % und 100 %) dehydriert, getrocknet und mit Eindeckmittel (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) eingedeckelt. Die Kalziumablagerungen innerhalb der Zellen färbten sich zunächst schwarz und nach der Gegenfärbung mit Kernechtrot orange-rot an (Abb. 13).



**Abbildung 13:** Von-Kossa-Färbung der osteogen andifferenzierten hMSC: Darstellung der Kalzium-Ablagerungen innerhalb der Zellen zunächst schwarz und nach der Gegenfärbung mit Kernechtrot orange-rot (*eigene Abbildung*).

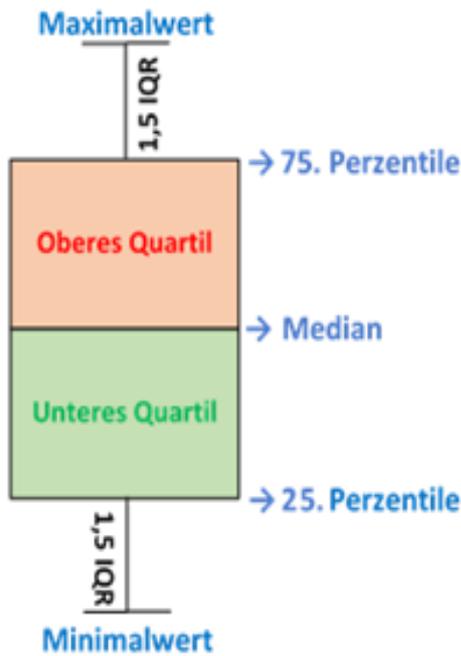
## 2.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus dem MTT-Test sowie des Comet Assays erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 26.0.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Im Rahmen der statistischen Beratung durch das Institut für Klinische Epidemiologie und Biometrie wurde als statistisches Verfahren der Mann-Whitney-U-Test festgelegt, da die Voraussetzungen für ein parametrisches Verfahren nicht erfüllt waren. Er ermittelt ob die zentralen Tendenzen zweier unterschiedlicher unabhängiger Stichproben verschieden sind.

Ergänzend wurde der Friedman-Test durchgeführt. Dieses Testverfahren bildet Ränge aus den abhängigen Variablen und vergleicht ob die zentralen Tendenzen von mehr als zwei abhängiger Stichproben signifikant unterschiedlich sind. Das Ziel ist es, die 0-Hypothese (es gibt keine signifikanten Unterschiede) zu verwerfen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe entsprach die statistische Signifikanz einem p-Wert von  $< 0,05$ . Diese wurde in den Graphiken mittels Stern-Symbol (\*) gekennzeichnet. Eine Alpha-Korrektur wurde aufgrund der geringen Fallzahl von 8 Patienten nicht durchgeführt.

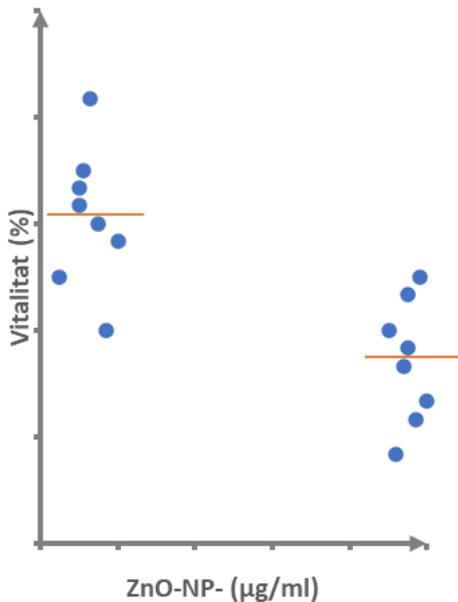
Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte über das Programm Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) und anschließend für die endgültige Visualisierung über GraphPad Prism Version 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) Diese erfolgte hauptsächlich in der Boxplot-Darstellung nach Tukey (Abb. 14). Der Median ist innerhalb des Boxplots als horizontal verlaufende Linie gekennzeichnet. Die Box stellt die mittleren 50 % der Daten dar und wird in ein oberes und unteres Quartil durch die Medianlinie geteilt. Die obere bzw. untere Begrenzungslinie entspricht dabei der 75. bzw. 25. Perzentile. Die t-förmigen Antennen werden „Whisker“ genannt. Sie entsprechen den Minimal- und Maximalwerten innerhalb eines 1,5-fachen Interquartilabstandes (engl. interquartile range = IQR). Werte außerhalb des IQR werden als Ausreißer beschrieben.



**Abbildung 14:** Aufbau eines Boxplots nach Tukey (eigene Abbildung).

Die Ergebnisse der osteogenen und adipogenen Versuchsreihe wurden aufgrund der exemplarischen Durchführung an einer Zelllinie ( $n = 1$ ) und der damit verbundenen kleinen Datenmenge als Punktdiagramm (Abb. 15) dargestellt. Die x-Achse gibt die ZnO-NP-Konzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$  und die y-Achse die Vitalität der Zellen in % wieder. Die einzelnen Ergebnisse des MTT-Tests wurden

der entsprechenden ZnO-NP-Konzentration zugeordnet und in das Diagramm eingetragen. Dies erfolgte leicht versetzt, um eine bessere Ablesbarkeit der einzelnen Werte zu gewährleisten. Der Median wurde als vertikale Linie dargestellt.



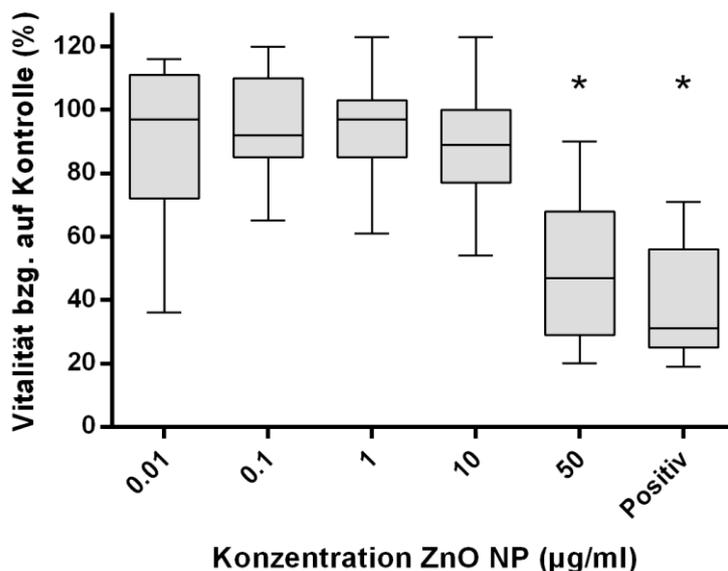
**Abbildung 15:** Aufbau eines Punktdiagramms. Die einzelnen Werte einer ZnO-NP-Konzentration (x-Achse) werden jeweils leicht versetzt als Punkte (blau) und der Median als vertikale Linie (orange) dargestellt. Die y-Achse entspricht der Zellvitalität in % (eigene Abbildung).

### 3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der jeweiligen Versuche aufgeführt und graphisch dargestellt. Neben den zytotoxischen und genotoxischen Effekten, abhängig von der Expositionsdauer und dem Differenzierungsgrad der Zellen, werden auch die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Analyse sowie die dabei entstandenen und digitalisierten Fotoaufnahmen beschrieben.

#### 3.1 MTT-Test nach 24 stündiger Exposition

Um die Fragestellung einer möglichen Zytotoxizität von ZnO-NP zu beantworten, wurden zuvor die unterschiedlichen NP-Konzentrationen vom nicht-zytotoxischen bis in den zytotoxischen Bereich festgelegt. Es handelt sich dabei um die Konzentrationen von 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 50 µg/ml ZnO-NP. Nach Kultivierung der hMSC, erfolgte nach einer 24 stündigen Exposition der Zellen mit ZnO-NP der MTT-Test. Das Ziel war es eine



**Abbildung 16:** Vitalität der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) in Prozent nach 24 h Exposition mit Zinkoxid-Nanopartikeln. n = 8. Als Marker der Zellvitalität wurde der Negativ-Kontrolle der Referenzwert 100 % zugeordnet. 200 µM Tert-Butylhydroperoxid (tbHP) diente als Positiv-Kontrolle. Eine signifikante Abnahme der hMSC-Vitalität (%) konnte bei einer Konzentration von 50 µg/ml ZnO-NP beobachtet werden. \* = signifikant.

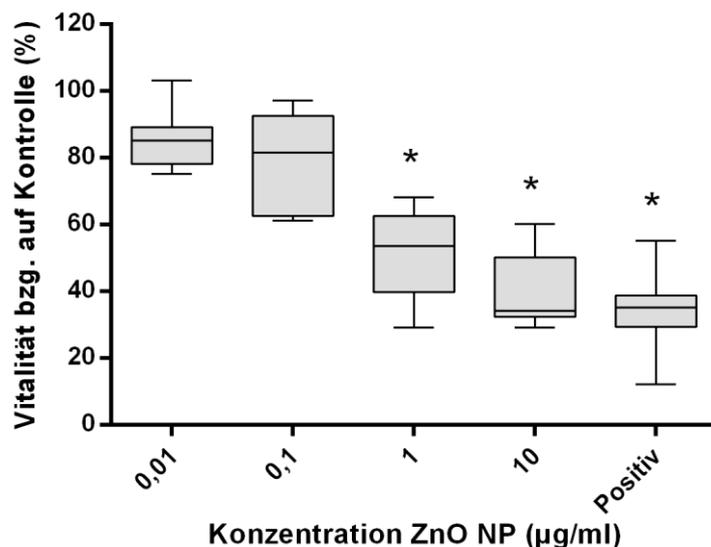
Vitalitätskurve, abhängig von den zytotoxischen Effekten, der unterschiedlichen NP-Konzentrationen zu erstellen. Abbildung 16 gibt die Ergebnisse des MTT-Tests nach 24 stündiger Inkubation mit ZnO-NP als Boxplot wieder. Es zeigte sich eine Abnahme der medianen Zellvitalität ab einer ZnO-NP-Konzentration von 10 µg/ml. Im Friedman-Test ergaben sich unterschiedliche Ten-

denzen zwischen der Negativ-Kontrolle und der einzelnen ZnO-NP-Konzentrationen. In der genauen Analyse mit dem Man-Whitney-U-Test konnte mit einem p-Wert von  $< 0,05$  eine Zellschädigung für die Konzentration 50  $\mu\text{g/ml}$  ZnO-NP und für die Positiv-Kontrolle nachgewiesen werden. Für die Konzentrationen 0,01  $\mu\text{g/ml}$  sowie 0,1  $\mu\text{g/ml}$  und 1  $\mu\text{g/ml}$  ZnO-NP konnte keine Zellschädigung nachgewiesen werden.

### 3.2 MTT-Test nach repetitiver Exposition

Ob durch wiederholtes Inkubieren der Zellkultur mit ZnO-NP zytotoxische Effekte induziert werden, untersucht diese Versuchsreihe. Dabei wurden die hMSC dreimal, jeweils 60 Minuten, der entsprechenden Konzentration ZnO-NP und anschließend, gleichfalls 60 Minuten, reinem Nährmedium ausgesetzt.

Abbildung 17 gibt die Ergebnisse in Form von Boxplots wieder. Es zeigten sich eine Abnahme der medianen Zellvitalität mit steigender ZnO-NP Konzentration.



**Abbildung 17:** Vitalität der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) in Prozent nach repetitiver Exposition mit Zinkoxid-Nanopartikeln.  $n = 8$ . Als Marker der Zellvitalität wurde der Negativ-Kontrolle der Referenzwert 100 % zugeordnet. 200  $\mu\text{M}$  Tert-Butylhydroperoxid (tbHP) diente als Positiv-Kontrolle. Eine signifikante Abnahme der hMSC-Vitalität (%) konnte bei einer Konzentration von 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  ZnO-NP beobachtet werden. \* = signifikant.

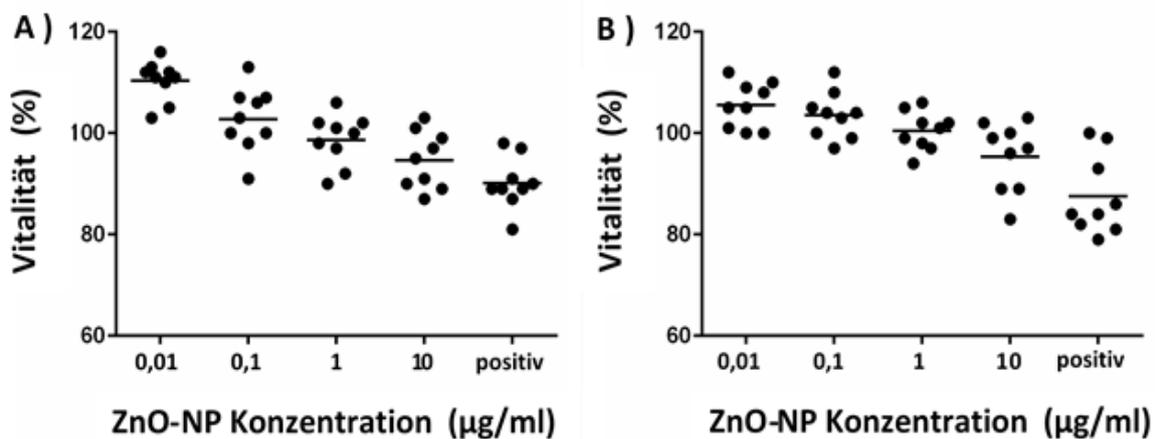
Im Friedman-Test konnten unterschiedliche Tendenzen der einzelnen ZnO-NP Konzentrationen gegenüber der Negativ-Kontrolle ermittelt werden. Im Man-Whitney-U-Tests, konnte bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  nach repetitiver ZnO-NP-Exposition eine Zellschädigung nachgewiesen werden. Für die ZnO-NP-Konzentrationen 0,01  $\mu\text{g/ml}$  und 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ergaben sich trotz repetitiver Exposition keine Zellschädigung.

Im direkten Vergleich zur einmaligen, 24 stündigen Exposition zeigte sich bei repetitiver Exposition eine ausgeprägtere Abnahme der Zellvitalität im Sinne einer Zunahme der zytotoxischen Effekte. Eine Zellschädigung war schon in einer zehnfach geringeren ZnO-NP-Konzentration (1 µg/ml) gegenüber der einmaligen, 24 stündigen ZnO-NP-Exposition vorhanden.

### 3.3 MTT-Test nach adipogener und osteogener Andifferenzierung

Für die Fragestellung, inwieweit eine adipogene oder osteogene Andifferenzierung von hMSC das Potential für zytotoxische Effekte verändert, wurden die hMSC eine Woche einem entsprechenden Nährmedium ausgesetzt. Im Anschluss folgten der MTT-Test nach 24 stündiger ZnO-NP Exposition und das Erstellen der Zellvitalitätskurve.

Sowohl bei den adipogen als auch bei den osteogen andifferenzierten Zellen zeigte sich gegenüber der Negativ-Kontrolle eine Abnahme der medianen Zellvitalität mit steigender ZnO-NP-Konzentration (Abb. 18). Dabei lag die mediane Zellvitalität für die ZnO-NP-Konzentrationen 0,01 und 0,1 µg/ml mit

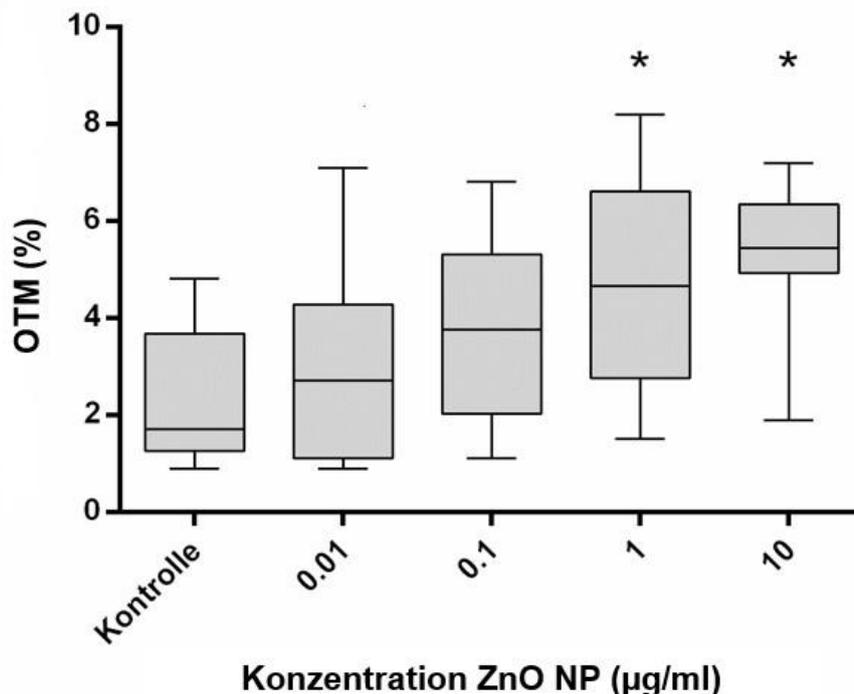


**Abbildung 18:** Vitalität der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) nach **A)** osteogener und **B)** adipogener Andifferenzierung für eine Woche und 24 stündiger ZnO-NP-Exposition.  $n = 8$ . Bei der Negativ-Kontrolle wurde als Zellvitalität der Referenzwert 100 % festgelegt. 200 µM Tert-Butylhydroperoxid (tbHP) diente als Positiv-Kontrolle. Die Punkte im Diagramm spiegeln die einzelnen Werte der Zellvitalität wider. Der Median ist als schwarzer Balken dargestellt. Im Mann-Whitney-U-Test konnte keine signifikante Abnahme der Zellvitalität im Sinne von zytotoxischen Effekten nach einer Exposition von 0,01; 0,1; 1 und 10 µg/ml ZnO-NP nachgewiesen werden. \* = signifikant.

Werten > 100 % über der Negativ-Kontrolle, welche stets 100 % entspricht. Der Friedman-Test war mit einem p-Wert von < 0,05 signifikant. In der genauen Analyse mit dem Man-Whitney-U-Test konnte jedoch weder für die adipogen noch für die osteogen andifferenzierte Zellreihe eine Zellschädigung nachgewiesen werden.

### 3.4 Comet Assay nach 24 stündiger Exposition

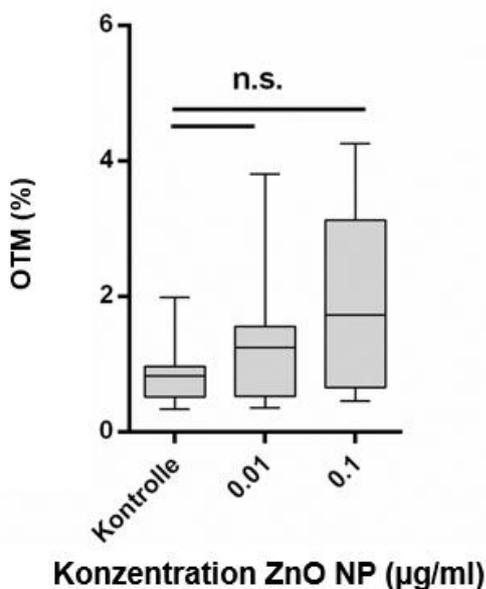
Zur Untersuchung eines genotoxischen Potentials von ZnO-NP wurden hMSC diesen für 24 Stunden exponiert. Anschließend wurde der Comet-Assay durchgeführt. In der Auswertung zeigte sich bei steigender NP-Konzentration ein zunehmendes genotoxisches Potential der ZnO-NP auf die hMSC (Abb. 19). Im Friedman-Test ergaben sich unterschiedliche Tendenzen zwischen der Negativ-Kontrolle und der einzelnen ZnO-NP-Konzentrationen. Der Man-Whitney-U-Test konnte eine DNA-Schädigung ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  nachgewiesen werden. Für die ZnO-NP-Konzentrationen 0,01  $\mu\text{g/ml}$  und 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ergaben sich keine erbgutschädigenden Effekte.



**Abbildung 19:** OTM der hMSC nach 24-stündiger ZnO-NP-Exposition. 300 mM Methylmethansulfonat (MMS) diente als Positiv-Kontrolle. n=8. Ein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung zeigte sich bei den Konzentrationen 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  ZnO-NP. \* = signifikant.

### 3.5 Comet Assay nach repetitiver Exposition

Diese Versuchsreihe beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob durch wiederholtes Inkubieren der Zellkultur genotoxische Effekte induziert werden können. In Anlehnung an die Versuche zur repetitiven Exposition im MTT-Test wurde für diesen Versuch ein Konzentrationsbereich im nicht zytotoxischen Dosisbereich von ZnO-NP gewählt. Dieser entsprach den Konzentrationen 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml ZnO-NP. Gegenüber der 24 stündigen Exposition konnte kein Anstieg der DNA schädigenden Effekte in dem Konzentrationsbereich von < 1 µg/ml ZnO-NP nachgewiesen werden (Abb. 20). Bei p-Werten von > 0,05 war eine Signifikanz im Man-Whitney-U-Test nicht gegeben. Mittels Friedman-Test ergaben sich keine unterschiedliche Tendenzen der einzelnen ZnO-NP-Konzentrationen gegenüber der Negativ-Kontrolle.



**Abbildung 20:** OTM der hMSC nach repetitiver ZnO-NP-Exposition. 300 mM Methylmethansulfonat (MMS) diente als Positiv-Kontrolle. n=8. Die statistische Signifikanz wurde an einem p-Wert von < 0,05 in Abhängigkeit zur Kontrollgruppe gemessen. Es konnte kein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung nachgewiesen werden.

### 3.6 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung

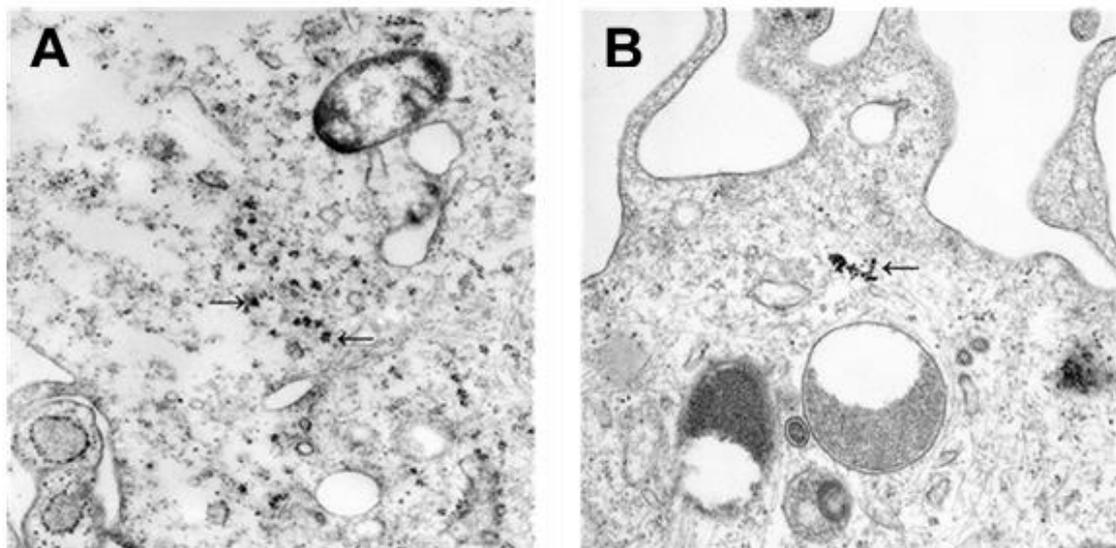
Ziel der elektronenmikroskopischen Analyse war es, die zelluläre Aufnahme der Nanopartikel sowie die intrazelluläre Akkumulation und Distribution zu untersuchen. In enger Zusammenarbeit mit der Abteilung für Elektronenmikroskopie des Theodor-Boveri-Instituts für Biowissenschaften wurden mikroskopische Präparate der Zellproben angefertigt und diese unter dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) systematisch nach

Nanopartikeln abgesucht. Bei jeder Aufnahme wurde eine optimale Einstellung zwischen 7.000- und 30.000-facher Vergrößerung für die Nanopartikel und die umgebenden Zellorganellen gewählt.

### 3.6.1 Expositionsdauer von 30, 60 und 180 Minuten

In den nach 30-minütiger Exposition angefertigten Schnitten konnte keine Membranpenetration und keine endozytotische Aufnahme der ZnO-NP nachgewiesen werden. Auch intrazellulär waren keine Nanopartikel im Zytoplasma oder in den Zellorganellen nachweisbar.

Nach einer einstündigen Exposition der hMSC mit ZnO-NP zeigte sich eine Aufnahme der NP in die Zelle. Die ZnO-NP wurden dabei über Vesikel endozytotisch in die Zelle aufgenommen und lagen anschließend als kleinere Konglomerate oder solitär frei im Zytoplasma vor (Abb. 21 A). Es war zu



**Abbildung 21:** TEM-Fotografie humaner mesenchymaler Stammzellen nach **(A)** 60-minütiger und **(B)** 180 min Exposition gegenüber 10 µg/ml ZnO-NP. **A:** Im Zytoplasma sind einzelne, aber auch zu kleineren Konglomeraten akkumulierte NP (Pfeile) nachweisbar. **B:** Es bilden sich zunehmend größere, frei im Zytoplasma liegende Konglomerate von Nanopartikeln (Pfeil). Solitäre Nanopartikel finden sich seltener. Jeweils 30.000-fache Vergrößerung.

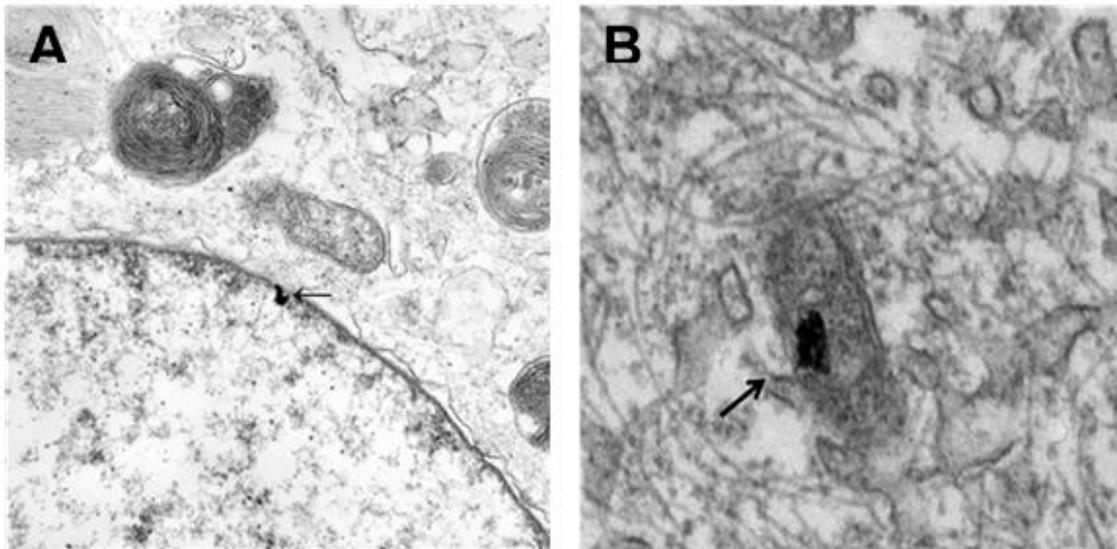
beobachten, dass sich die ZnO-NP bereits im extrazellulären Raum zu Konglomeraten unterschiedlicher Größe verbunden hatten und die zelluläre

Aufnahme in Vesikel nicht nur solitär, sondern auch mit zu Konglomeraten akkumulierten NP erfolgte.

Nach einer dreistündigen Exposition konnten die ZnO-NP weiterhin intrazellulär nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Schnitten nach 60-minütiger Exposition bestand zudem eine zunehmende intrazelluläre Akkumulation der NP. Dabei lagen diese als größere Konglomerate und selten solitär diffus im Zytoplasma vor. Eine exozytotische Ausschleusung der ZnO-NP konnte nicht beobachtet werden (Abb. 21 B).

### 3.6.2 Expositionsdauer von einer, drei und sechs Wochen

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zum Zeitpunkt einer Woche nach der ZnO-NP-Exposition waren die NP persistent intrazellulär nachweisbar. Dabei war eine unterschiedliche intrazelluläre Distribution zu beobachten. Während die NP im Zytoplasma zu Konglomeraten akkumulierten, penetrierten einzelne solitäre NP oder kleinere Agglomerate den Zellkern und die Zellorganelle (Abb. 22 A).



**Abbildung 22:** EM-Fotografie humaner mesenchymaler Stammzellen **(A)** eine Woche und **(B)** drei Wochen nach 24 stündiger Exposition gegenüber 10 µg/ml ZnO-NP. **A:** Vereinzelt konnte eine Penetration des Zellkerns durch solitäre aber auch kleiner Agglomerate vermutlich über die Kernporen in das Nukleoplasma beobachtet werden (Pfeil). **B:** Fortbestehende intrazelluläre Akkumulation in größeren Konglomeraten sowie Penetration der Zellorganelle wie Mitochondrien durch solitäre Nanopartikel oder kleinerer Konglomerate (Pfeil). Jeweils 30.000-fache Vergrößerung.

Im Verlauf der Beobachtung über 3 bis hin zu 6 Wochen zeigte sich eine intrazelluläre progrediente Akkumulation zu größeren Konglomeraten. Ferner ergab sich eine persistente Penetration von Zellkern und Zellorganellen wie Mitochondrien durch einzelne NP aber auch Konglomeraten geringerer Größe (Abb. 22 B). Eine Ausschleusung der Partikel konnte nicht erfasst werden.

### **3.6.3 Zusammenfassung der elektronenmikroskopischen Analyse**

Insgesamt kam es zu einer raschen endozytotischen Aufnahme der ZnO-NP in die Zelle innerhalb der ersten 60 Minuten. Die Nanopartikel akkumulierten bereits extrazellulär zu größeren und kleineren Konglomeraten und wurden endozytotisch über Vesikel in die Zelle aufgenommen. Nach Aufnahme lösten sich die Vesikel auf und die Nanopartikel lagen frei sowie diffus verteilt im Zytoplasma vor. Dabei bewahrten sie die Form als kleinere Konglomerate unterschiedlicher Größe und kamen nur sehr selten solitär vor. Im weiteren zeitlichen Verlauf bildeten sich auch zunehmend größerer Konglomerate, seltener fanden sich jedoch auch weiterhin solitäre NP und kleiner Konglomerate.

Über den gesamten Inkubationszeitraum der hMSC mit ZnO-NP über 3 bis hin zu 6 Wochen konnte vereinzelt eine Migration der Partikel über die Kernporen in den Zellkern und in andere Zellorganelle nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich die NP in den Zellorganellen als solitäre NP oder als Konglomerate geringerer Größe. Die im Zytoplasma verbliebenen ZnO-NP behielten ihre Form als größere Konglomerate bei.

Eine Ausschleusung der Nanopartikel über zelluläre Mechanismen wie z. B. Exozytose konnte über den gesamten Zeitraum nicht beobachtet werden.

## 4 Diskussion

Nanomaterialien finden als Schlüsselement für vielfältige industrielle Anwendungen zunehmend den Weg in Konsumprodukte des täglichen Bedarfs. Insbesondere ZnO-NP befinden sich als Inhaltsstoff in einer Vielzahl von Kosmetika. Diesbezügliche Gefahren für die körperliche Gesundheit werden zum aktuellen Zeitpunkt kontrovers diskutiert. Daher ist das Ziel der vorliegenden Arbeit die toxikologische Risikobewertung von ZnO-NP in humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro*. Anhand verschiedener Methoden und Versuche konnte sowohl ein zyto- als auch ein genotoxisches Potential für ZnO-NP in Abhängigkeit von Dosis und Expositionsdauer nachgewiesen werden. Dabei wurden die hMSC im MTT-Test sowie Comet Assay über 24 Stunden, aber auch repetitiv, mit Nanopartikeln inkubiert. Neben einem signifikant zyto- sowie genotoxischen Bereich konnte hierbei auch ein Konzentrationsbereich ohne zyto- und genotoxische Effekte nachgewiesen werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Zellkultivierung im Langzeitversuch mit anschließender elektronenmikroskopischer Analyse. Hierbei wurden die Art und zeitliche Dauer der zellulären Aufnahme sowie die intrazelluläre Distribution und Akkumulation in Langzeitversuchen bis hin zu 6 Wochen beschrieben. In einem weiteren Ansatz wurden exemplarisch die zytotoxischen Effekte von ZnO-NP an differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen den undifferenzierten hMSC gegenübergestellt.

### 4.1 Konzentrationsabhängigkeit von zyto- und genotoxischen Effekten

Zyto- und genotoxische Effekte in hMSC in Abhängigkeit der ZnO-NP-Konzentration wurde unsererseits vermutet. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits 2011 aufzeigen, dass eine DNA-Schädigung bei niedrigeren ZnO-NP-Konzentrationen im Vergleich mit den zytotoxischen Effekten auftrat. Zytotoxizität konnte ab einer Konzentration von 50 µg/ml und Genotoxizität ab einer Konzentration von 10 µg/ml nachgewiesen werden (Hackenberg et al. 2011c). Im Rahmen der Fragestellung waren daher vor allem niedrige Konzentrationen von ZnO-NP interessant, bei denen zuvor keine zytotoxischen Effekte nachgewiesen

worden waren. Daher fanden Konzentrationen mit 0,01, 0,1, 1 und 10 µg/ml ZnO-NP in den weiteren Versuchen bezüglich Genotoxizität und repetitiver Exposition Verwendung.

In einer 2017 publizierten Studie konnten ähnliche Ergebnisse im MTT-Test beschrieben werden (Tabari et al. 2017). Dabei wurden ZnO-NP von vergleichbarer Beschaffenheit mit humanen Zahnpulpa-Stammzellen (DPSC) in Konzentrationen von 25, 50, 75 und 100 µg/ml über Zeiträume von 24, 48 und 72 Stunden exponiert. In dem ähnlichem Versuchsaufbau konnte bereits eine Zytotoxizität ab 25 µg/ml nachgewiesen werden. Dies entspricht auch den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Sahu. Sie konnte ein signifikantes zytotoxisches Potential von 25 µg/ml ZnO-NP innerhalb von 24 Stunden in humanen Lungenepithelzellen beschreiben (Sahu et al. 2013). Taccola und Mitarbeiter konnten für ZnO-NP Zytotoxizität ab einer Konzentration von 20 µg/ml an humanen Neuroblastomzellen nachweisen (Taccola et al. 2011). Dieser Konzentrationsbereich wurde in unserer Studie jedoch nicht direkt dargestellt, da lediglich Konzentrationen von 0,01; 0,1; 1; 10 und 50 µg/ml Verwendung fanden. In einer Arbeit aus unserer gemeinsamen Arbeitsgruppe von 2018 konnte eine signifikante Zytotoxizität für die Zwischenkonzentrationen 12 µg/ml, 16 µg/ml, 20 µg/ml dargestellt werden (Moratin et al. 2018). Jedoch wurden in dem durchgeführten MTT-Test maligne FaDu-Zellen verwendet. Ob Versuche mit transformierten Zellen in der Lage sind die physiologischen Verhältnisse annähernd wiederzugeben, ist für die Risikobewertung von Nanopartikel generell in Frage zu stellen.

Im Comet Assay ergaben sich signifikante DNA-Schäden bei einer Konzentration von 1 µg/ml und 10 µg/ml ZnO-NP. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Studien anderer Arbeitsgruppen erzielt werden. So konnte Sharma et al. eine signifikante Genotoxizität für die Konzentrationen 0,8 und 5 µg/ml bei einer Expositionsdauer von lediglich 6 Stunden in menschlichen Epidermiszellen nachweisen (Sharma et al. 2009). Ferner zeigte sich in den Konzentrationsbereichen von 0,001 bis 0,08 µg/ml keine signifikante Schädigung des Erbgutes (Sharma et al. 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit bestand in dem Konzentrationsbereich von 0,01

bis 0,1 µg/ml keine signifikante DNA-Schädigung. In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte Genotoxizität jedoch bereits ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml ZnO-NP nach 24 stündiger Exposition beschrieben werden. Allerdings wurden dort nicht hMSC, sondern humane nasale Mukosazellen verwendet (Hackenberg et al. 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit aber auch anderer Arbeitsgruppen bestätigen die Annahme, dass für zyto- und genotoxische Effekte eine Dosisabhängigkeit besteht. Anhand unserer Ergebnisse besteht Zytotoxizität ab einer Konzentration von 10 µg/ml ZnO-NP und Genotoxizität ab 0,1 µg/ml ZnO-NP.

#### **4.2 Vergleichbarkeit nanotoxikologischer Studienarbeiten**

Die oben genannten Konzentrationsbereiche können der Orientierung dienen. Eine Festlegung einer Toxizitätsschwelle kann jedoch anhand der vorliegenden Arbeit sowie der Literatur bisher nicht erfolgen. Die Vergleichbarkeit der Studien, auch bei ähnlichen Versuchsaufbau, erscheint aufgrund der unterschiedlichen Zellarten und Nanopartikel nur bedingt möglich. Bezüglich zyto- und genotoxischer Effekte könnte eine differente Empfindlichkeit einzelner Zelllinien bzw. -arten bestehen. Chen und Kollegen beschreiben in ihrer Übersichtsarbeit eine Schädigung der DNA durch TiO<sub>2</sub>-NP in tierischen Leber- und Knochenmarkszellen, nicht jedoch in Gehirnzellen (Chen et al. 2014). An humanen Leberzellen konnten Sharma und Kollegen eine DNA-Schädigung ab einer Konzentration von 14 µg/ml ZnO-NP nach sechs-stündiger Exposition nachweisen (Sharma et al. 2012). Für humane, epidermale Keratinozyten konnten sie eine Genotoxizität schon ab einer Konzentration von 8 µg/ml ZnO-NP ebenfalls nach sechs-stündiger Exposition beschreiben (Sharma et al. 2011). Unsere Arbeitsgruppe konnte aufzeigen, dass in humanen, peripheren Blut-Lymphozyten auch bei hohen TiO<sub>2</sub>-NP-Konzentrationen von 200 µg/ml keine zytotoxischen oder genotoxischen Effekte auftraten (Hackenberg 2010a; Hackenberg et al. 2011a). An hMSC konnte unsere Arbeitsgruppe eine Genotoxizität ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml Ag-NP schon nach einer Expositionsdauer von einer Stunde nachweisen. Auch nach einer drei- und 24-stündigen Exposition waren die genotoxischen Effekte signifikant (Hackenberg et

al. 2011b). Im Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit traten DNA-Schäden durch Ag-NP bereits bei einer geringeren Dosierung auf. Auch ist davon auszugehen, dass genotoxische Effekte bei ZnO-NP-Exposition erst jenseits einer Stunde auftreten, da in der elektronenmikroskopischen Analyse bis zu diesem Zeitpunkt keine Penetration des Zellkerns beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse des MTT-Tests mit Nachweis von Zytotoxizität von 10 µg/ml Ag-NP entsprechen zum Teil denen unserer Ergebnisse mit ZnO-NP. Jedoch bestand Zytotoxizität bei Ag-NP auch bereits ab einer Expositionsdauer von einer und drei Stunden (Hackenberg et al. 2011b). Es ist also anzunehmen, dass auch die Art der verwendeten Nanopartikel Einfluss auf die Auswirkung von zyto- und genotoxischen Effekten haben. So können die ZnO-NP-Konzentrationen mit Nachweis von Zyto- und Genotoxizität nicht zwangsläufig für Nanopartikel anderer Materie gelten. Diesbezüglich wird in der Literatur unter anderem die Löslichkeit von NP als weitere Determinante diskutiert. Nach Liu und Kollegen wird diese wiederum durch den pH-Wert des Umgebungsgewebes beeinflusst (Liu et al. 2016). Unterschiedliche Zellen bzw. Gewebearten weisen somit gegenüber NP eine differente Vulnerabilität auf. So sind für Stammzellen genotoxische Effekte bereits bei niedrigeren ZnO-NP-Konzentrationen vergleichend zu Keratinozyten oder Mucosazellen nachgewiesen (Ickrath et al. 2017). Eine Vergleichbarkeit nanotoxikologischer Studien ist somit nur bei Verwendung gleicher Nanopartikel und Zellkulturen möglich. Der kontroversen Studienlage könnte mit einer höheren Anzahl von Studien mit standardisierten Untersuchungsaufbau entgegengewirkt werden, um eine umfassendere Beschreibung des zyto- und genotoxischen Potentials von ZnO-NP und anderer Nanomaterialien zu ermöglichen.

#### **4.2.1 Protektivität durch Verlust der Multipotenz**

Den Aspekt der differenten Empfindlichkeit einzelner Zelllinien bzw. -arten aufgreifend wurden die hMSC unter Zugabe spezieller Nährmedien über eine Woche andifferenziert. Diese Medien erlaubten jeweils eine adipogene oder osteogene Andifferenzierung der Zellen. Es stellte sich die Frage, ob durch eine Andifferenzierung mit Verlust der Multipotenz, die hMSC eine erhöhte

Empfindlichkeit oder Toleranz gegenüber den zytotoxischen Effekten von ZnO-NP entwickeln. Die undifferenzierten hMSC wurden hierfür dem nicht-zytotoxischen Konzentrationsbereich, d. h. 0,01; 0,1; 1 und 10 µg/ml ZnO-NP, ausgesetzt. Mittels der Oil-Red-O-Färbung sowie der Von Kossa-Färbung konnte der adipogene bzw. osteogene Differenzierungsgrad nachgewiesen werden. Nach anschließender 24-stündiger ZnO-Exposition folgte der MTT-Test.

Im Rahmen des Versuches ergab sich kein Nachweis einer signifikanten Zytotoxizität. Das Ergebnis ähnelt somit dem der ebenfalls für 24 Stunden mit ZnO-NP exponierten multipotenten hMSC (vgl. Kap. 3.1). Ab einer Konzentration von 1 µg/ml ZnO-NP nahm die Zellvitalität zunehmend ab, sodass von zytotoxischen Effekten auch bei höheren Differenzierungsgraden ausgegangen wird. Eine unsererseits angenommene Protektivität der Andifferenzierung aufgrund des Verlustes der Multipotenz konnte weder bewiesen noch widerlegt werden. Ob Stammzellen mit den ausdifferenzierten Zellen in nanotoxikologischen Studien vergleichbar sind, ist somit weiterhin nicht geklärt. Auch kann keine Aussage bezüglich einer möglichen Protektivität durch Multipotenz in Stresssituationen getroffen werden. Da Adipozyten und Osteozyten langsam proliferierende Zelltypen sind, wäre jedoch eine geringere Vulnerabilität als bei hMSC denkbar (Ickrath et al. 2017). Andererseits wäre auch eine höhere Reparaturfähigkeit denkbar, die bei ausdifferenzierten Zelllinien verloren geht. Um sich den offenen Fragen zu stellen, ist somit auch nach unseren exemplarischen Versuchen noch viel Forschungsbedarf vorhanden.

Bezüglich möglicher Geno- und Zytotoxizität von Nanopartikeln gegenüber aus- bzw. undifferenzierten Zellen wurden nur wenige Studien publiziert. Der Schwerpunkt liegt hier vor allem auf der Biokompatibilität im Sinne der Anwendung von Nanopartikeln in der Biomedizin. Das Verstehen der Interaktion zwischen Nanomaterialien und biologischen Zellen ist grundlegend für die kontrollierte Manipulation für biomedizinische Anwendungen (Yi et al. 2010). So beschreibt unter anderem die Arbeitsgruppe um Yi eine Beschleunigung der osteogenen Differenzierung über mechanischen intrazellulären Stress und eine Hemmung der adipogenen Differenzierung von hMSCs durch Au-NP (Yi et al.

2010). Auch für Ag-NP wird eine unterstützende Wirkung auf die osteogene Zelldifferenzierung von Stammzellen im nicht zytotoxischen Konzentrationsbereich beschrieben (Qin et al. 2014). Diesen Erkenntnissen wird enormes Potential im Rahmen des Tissue-Engineering zugeschrieben.

Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Orazizadeh. Diese konnte zytotoxische und apoptotische Effekte durch ZnO-NP an adipogen differenzierten mesenchymalen Stammzellen (ASC) aus Ratten im niedrigen Dosisbereich nachweisen (Orazizadeh et al. 2015). Es wurden Konzentrationen von 10, 50 und 100 µg/ml verwendet. Interessant war auch die Beobachtung, dass die ASC bei den Konzentrationen 10 und 50 µg/ml ihre Zellmorphologie änderten. So wurde das Aussehen der Zellen insbesondere bei 10 µg/ml vorwiegend als rund anstatt Fibroblasten-ähnlich beschrieben (Orazizadeh et al. 2015). Darüber hinaus konnte unsere eigene Arbeitsgruppe eine reduzierte Mobilität von Stammzellen nach ZnO-NP Exposition nachweisen (Hackenberg et al. 2013). Es ist davon auszugehen, dass diese Effekte sich nicht nur bei ZnO-NP, sondern auch bei anderen Nanomaterialien beobachten lassen. Nanopartikel beeinflussen die Zellen somit auf vielfältige Art und Weise. Die dahinterstehenden intrazellulären Abläufe sind bis dato weitgehend unbekannt.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass zytotoxische und genotoxische Auswirkungen nur ein Teil eines Repertoires an Effekten sind, die mit Nanopartikeln in Verbindung gebracht werden können. Die genauen intrazellulären Mechanismen und Abläufe im Rahmen der durch NP induzierten Zyto- und Genotoxizität bedürfen noch weiterer Forschung, um einen gefahrlosen Einsatz in Konsumgütern zu propagieren. Unterschiedliche Studienansätze mit multipotenten Stammzellen aber auch ausdifferenzierten Zelllinien erscheinen sinnvoll. Dabei sollte für ZnO-NP insbesondere der Konzentrationsbereich zwischen 10 und 50 µg/ml für Zytotoxizität und zwischen 0,1 und 1 µg/ml für Genotoxizität mehrschrittig analysiert werden. Ergänzend sollten in standardisierten Testverfahren mit einheitlichen Zelllinien die zyto- und genotoxischen Konzentrationsbereiche für alle Nanopartikel bestimmt werden. Anhand der dann erhobenen Daten könnten vergleichende Studien folgen.

### 4.3 Zeitliche Abhängigkeit von zyto- und genotoxischen Effekten

Bei der komplexen Betrachtung nanotoxikologischer Fragestellungen sollten nicht nur Konzentrationsdosen definiert, sondern auch der zeitliche Aspekt der Inkubationsdauer mit einbezogen werden. Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe um Sharma das zytotoxische Potential von ZnO-NP bereits in niedrigeren Dosierungen, aber auch in Abhängigkeit der Expositionsdauer, anhand von humanen epidermalen Zellen beschreiben. So war die erfasste Zytotoxizität von ZnO-NP bereits bei einer Konzentration von 20 µg/ml nach dreistündiger Exposition signifikant. Nach 24 stündiger Exposition war diese bei 5 µg/ml und nach 48 stündiger Exposition bei 0,8 µg/ml signifikant (Sharma et al. 2009). In einer Studie aus 2013 konnte bei Eisenoxid-NP aufgezeigt werden, dass es bei einer prolongierten Expositionsdauer von 24 anstatt 12 Stunden zu einer erhöhten Mortalität der behandelten Zellen kam (Kouchesfehani et al. 2013). Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Analyse konnten wir belegen, dass eine endozytotische Aufnahme der Nanopartikel ins Zytoplasma nach 60 Minuten erfolgt (vgl. Kap. 3.6.2). Daher ist von genotoxischen Effekten frühestens nach 60 Minuten auszugehen. In welchem Zeitintervall die Nanopartikel und wie sie zum Zellkern gelangen ist unklar. Im Falle einer intrazellulären Migration könnte die Infiltration des Nukleus oder der Mitochondrien und letztendlich die vollen genotoxischen Effekte jenseits des hier gewählten zeitlichen Rahmens von maximal 24 Stunden liegen. Auch eine indirekte Schädigung durch Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels über den Inkubationszeitraum hinaus ist denkbar. Die Arbeitsgruppe um Alarifi konnte anhand von ZnO-NP aufzeigen, dass es zu einem signifikanten Anstieg der Zyto- und Genotoxizität mit folgender Apoptose nach einer Expositionsdauer von 48 Stunden kommt (Alarifi et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich eine Standardexpositionsdauer von 24 Stunden verwendet. Der Aspekt der Zeitkomponente sollte daher in zukünftigen Projekten im Sinne von Langzeitexpositionen weiterverfolgt werden.

#### 4.3.1 Repetitive Exposition – ein realistischeres Szenario?

Den zeitlichen Aspekt aufgreifend wurden die hMSC in der vorliegenden Arbeit neben singulären Expositionen auch repetitiv niedrigdosierten ZnO-NP exponiert.

Aufgrund der intrazellulären Akkumulation (vgl. Kapitel 3.6) wurde eine signifikante Zunahme der Zyto- und Genotoxizität angenommen. Der Konzentrationsbereich für den MTT-Test wurde von 0,01 µg/ml bis 10 µg/ml und der für den Comet Assay von 0,01 bis 0,1 µg/ml festgelegt. Diese entsprachen den bei 24 stündiger Inkubation nicht zyto- bzw. -genotoxischen Dosierungen von ZnO-NP. Die hMSC wurden dreimalig für je eine Stunde den ZnO-NP ausgesetzt. Zwischen den einzelnen Inkubationen erfolgte eine Erholungsphase von jeweils einer Stunde mit partikelfreiem Medium. Der Untersuchungsaufbau entsprach einer wiederholten Exposition von NP, wie z. B. das mehrfache Auftragen von Sonnencreme auf die Haut (Ickrath et al. 2017).

In der Auswertung zeigte sich gegenüber den einmalig für 24 Stunden mit ZnO-NP inkubierten Zellen, dass bereits ab einer Konzentration von 1 µg/ml eine signifikante Zytotoxizität nachgewiesen werden konnte. Wider Erwarten zeigte sich, dass das genotoxische Potential der ZnO-NP nach repetitiver Exposition gegenüber der 24-stündigen Exposition nicht gesteigert war. Diese Ergebnisse sind kontrovers zu betrachten und lassen einen großen Interpretationsspielraum offen. In einer 2011 publizierten Studie unserer Arbeitsgruppe konnte an humanen, nasalen Mukosazellen gegenüber einer 24-stündigen Exposition ein signifikanter Anstieg der genotoxischen Effekte bereits bei 0,1 µg/ml nachgewiesen werden (Hackenberg et al. 2011d). Dass eine Überschreitung des Signifikanzniveaus in dieser Studie nicht erreicht wurde, kann in der unterschiedlichen Toleranz der einzelnen Zelllinien „Nasenschleimhautzellen vs. Stammzellen“ gegenüber ZnO-NP begründet liegen (Vgl. Kap. 4.2). Denkbar ist jedoch auch, dass der Inkubationszeitraum von je einer Stunde zu kurz gewählt war, um nachweisbare genotoxische Effekte auszulösen. In der elektronenmikroskopischen Analyse konnte die intrazelluläre Aufnahme von NP über Endozytose beschrieben werden. Im Rahmen der repetitiven Exposition war somit von einer vermehrten intrazellulären Akkumulation der ZnO-NP auszugehen. Folglich bestünde dann gegenüber einer einmaligen Exposition ein gesteigertes zyto- und genotoxisches Potential. Jedoch ist unklar zu welchem Zeitpunkt der Untergang der Zellorganellen oder des Zellkerns beginnt. Trat keine signifikante Genotoxizität auf, da die ZnO-NP nach jeweils 60 Minuten

wieder entfernt wurden? Besonders mit Hinblick auf Genotoxizität müssen die ZnO-NP eine gewisse Distanz bis in den Zellkern zurücklegen. Es erscheint möglich, dass zytotoxische Effekte frühzeitig auftreten. Dies wird durch unser Ergebnis im MTT-Test bekräftigt. Das negative Ergebnis des Comet Assays erscheint somit nachvollziehbar. Es wäre jedoch auch möglich, dass eventuell entstandene Schäden durch Reparaturenzyme in der Erholungsphase kompensiert wurden. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der Genotoxizität trotz einer Regenerationsphase von 24 Stunden. Dies war auch bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml der Fall, obwohl zuvor nach ein- bis drei-stündiger repetitiver Exposition keine genotoxischen Effekte nachgewiesen werden konnten (Hackenberg et al. 2011d). Dieser Umstand scheint den Ansatz mit dem möglichen Eingreifen der Reparaturmechanismen zu widerlegen. Im Rahmen der Inkubations-Prozedur kommt es jedoch auch zu mechanischem Stress auf die Zellkultur. Der mehrfache Mediumwechsel und im Falle des MTT-Tests die Umbettung auf eine 96-Wellplatte könnte die Zellvitalität ebenfalls im Sinne einer Vorschädigung negativ beeinflussen. Eine Kombination der verschiedenen Aspekte scheint denkbar.

ZnO-NP findet vor allem in Kosmetika Verwendung. Die repetitive Exposition spiegelt somit eine alltägliche Situation bezüglich Nanomaterialien wider. Sie entspricht einer wiederholten Anwendung von z. B. Sonnencreme durch Konsumenten. Gegenüber einer einmaligen Exposition stellt die repetitive Inkubation somit ein realistischeres Szenario dar. Aufgrund der raren Studienlage ist weiteren Untersuchungen diesbezüglich ein großer Stellenwert einzuräumen. Dabei sollte zwischen kurzen und langen Intervallen unterschieden werden, denn bei ersteren können lediglich die akkumulierten zytotoxischen Effekte gemessen werden. Änderungen in der Aktivität von dutzenden mitochondrialen und nicht-mitochondrialen Oxidoreduktasen, dem zellulären Stoffwechsel sowie der Energie-Perturbation und des oxidativen Stresslevels könnten signifikante Auswirkungen auf die Ergebnisse des MTT-Tests haben (Stepanenko et al. 2015). Auch der Umstand einer zeitlich verzögerten Genotoxizität gegenüber einer direkten Zytotoxizität erscheint möglich. Eine progrediente DNA-

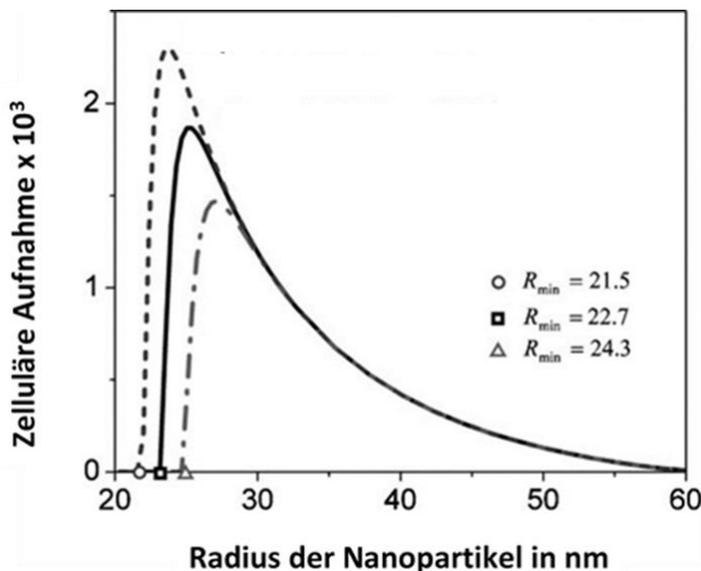
Schädigung trotz einer Regenerationsphase könnte im Persistieren der NP im Zytoplasma nach endozytotischer Aufnahme begründet liegen. Insbesondere nach repetitiver Exposition kommt es so zu größeren Ansammlungen von ZnO-NP intrazellulär. Aufgrund der Anatomie des Zellkerns mit Kernmembran und Kernporen erscheint eine Penetration des Nukleus in kurzen Zeiträumen erschwert. Ferner werden etwaige Reparaturmechanismen und deren Auswirkungen auf das zelluläre Überleben bei Versuchen mit kurzen Intervallen nicht erfasst (Ickrath et al. 2017). Eine erneute Versuchsreihe mit längeren Regenerationsphasen über 48 und 72 Stunden bis hin zu einer Woche zur Reevaluation ist anzustreben.

#### **4.4 Partikelgröße – ein entscheidender Faktor für Genotoxizität?**

Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer ähnlich, wie bei Sharma und Kollegen (Sharma et al. 2009), aufgebauten Versuchsreihe eine signifikante Zytotoxizität von ZnO-NP in MSC bei einer Konzentration von 5 µg/ml beschreiben (Hackenberg et al. 2013). Das Ergebnis ist jedoch aufgrund deutlich differierender Partikelgrößen nur bedingt mit den in dieser und der vorliegenden Arbeit verwendeten maximal 100 nm großen ZnO-NP zu vergleichen. Allerdings lässt dies den Rückschluss zu, dass die zytotoxischen Effekte in einer gewissen Abhängigkeit zur Partikelgröße stehen (Vandebriel et Jong 2012). Konkretisiert könnte somit ein differentes zytotoxisches und wahrscheinlich auch genotoxisches Potential bei unterschiedlich großen NP bzw. unterschiedlichen Arten von ZnO-NP bestehen. Laut Ickrath und Kollegen ist die Studienlage bezüglich der Partikelgröße in der Literatur jedoch widersprüchlich anzusehen (Ickrath et al. 2017). Die Arbeitsgruppe von Warheit konnte keinen Zusammenhang zwischen Partikelgröße und toxischen Effekten von großen und kleinen TiO<sub>2</sub>-NP beschreiben (Warheit et al. 2006). Dem gegensätzlich konnten Xia und Kollegen eine signifikant erhöhte Zytotoxizität von AuNP mit einer durchschnittlichen Größe von 5 nm gegenüber AuNP mit einer mittleren Größe von 20 bis 50 nm an humanen Hepatozyten sowie Leberkarzinom-Zellen beschreiben (Xia et al. 2019). Butler und Kollegen konnten vermehrt

genotoxische Effekte durch AgNP kleinerer Größe (10 und 20 nm) im Comet Assay und Mikrokern-Assay nachweisen (Butler et al. 2015).

Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Analyse konnte aufgezeigt werden, dass die ZnO-NP über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Jener



**Abbildung 23:** Die größenabhängige zelluläre Aufnahme von NP (Zhang et al. 2009).

Nanopartikel hatten eine Partikelgröße von unter 100 nm, sodass eine zelluläre Aufnahme von allen NP unwahrscheinlich erscheint. Durch Zhang und Kollegen konnte auch eine zelluläre Aufnahme von NP mit einem Radius von 60 nm kaum beobachtet werden (Zhang et al. 2009).

Auch die Arbeitsgruppe von Gao beschreibt einen optimalen Radius von etwa 27 bis 30 nm für sphärische Partikel (Gao et al. 2005). Die endozytotische Aufnahme der NP konnte dabei singulär aber auch als Konglomerat beobachtet werden. Es besteht daher die Annahme, dass bei Partikeln kleiner als der optimale Radius eine Ballung dieser in einem Endosom folgt. Somit können die NP als Konglomerat die optimale Größe für eine endozytotische Aufnahme erreichen (Gao et al. 2005). Im Gegensatz dazu konnte diese Kumulierung und Agglomeration jedoch elektronenmikroskopisch nicht nur extrazellulär sondern auch intrazellulär beobachtet werden. Dies entspricht Voruntersuchungen zu dieser Studie unserer Arbeitsgruppe (Hackenberg et al. 2011d). Dieses Verhalten

transmembranöse Transport war jedoch in der Auswertung der angefertigten Schnitte nur in einzelnen Zellen nachweisbar. Dies kann mit der Partikelgröße der ZnO-NP in Zusammenhang stehen. Der optimale Radius von Nanopartikeln (Abb. 23) für die Endozytose beträgt etwa 25-30 nm (Zhang et al. 2009). Die in dieser Studie verwendeten

konnte auch für Ag-NP in hMSC nachgewiesen werden (Hackenberg et al. 2011b). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe um Greulich. Sie konnten beobachten, dass Ag-NP von 80 nm hydrodynamischem Durchmesser (entspricht einem Radius von 40 nm) in den intrazellulären Raum von hMSC gelangen und dort perinukleär zu Agglomeraten kumulieren. Hierbei ist die Invasionsroute vergleichbar mit Nanopartikeln ähnlicher Größe aber anderer Zusammensetzung (Greulich et al. 2011).

Eine Penetration des Zellkerns oder anderer Zellorganelle konnte lediglich vereinzelt beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse liegen für unterschiedliche Nanopartikel in anderen Studienarbeiten vor (AshaRani et al. 2009; Hackenberg et al. 2010b; Hackenberg et al. 2011d; Hackenberg et al. 2011b). Dies widerspricht jedoch zum Teil den Beobachtungen von Greulich und Kollegen mit Ag-NP. Diese nahmen an, dass es aufgrund der Partikelgröße und der intrazellulären Agglomeration unwahrscheinlich sei, dass die NP den Zellkern, den Golgi-Apparat oder das endoplasmatische Retikulum penetrieren (Greulich et al. 2011). In ihrer Übersichtsarbeit beschreiben Hoshyar und Kollegen für die meisten *in vitro* Studien eine maximale Zellaufnahme in nichtphagozytischen Zellen im Größenbereich von 10–60 nm unabhängig von der Zusammensetzung des Nanopartikelkerns oder der Oberflächenladung (Hoshyar et al. 2016). Dieser Größenbereich passt auch zu den oben beschriebenen Ergebnissen von Zhang und Kollegen (vgl. Abb. 23). Es ist somit davon auszugehen, dass NP kleiner als 60 nm die Zellmembran wesentlich einfacher passieren können als ihre größeren Derivate. Ähnliche Bedingungen wären auch für die Passage der Kernmembran denkbar. Im Rahmen der vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen wiesen die den Zellkern oder die Zellorganellen penetrierenden Konglomerate deutlich geringere Ausmaße als die im Zytoplasma vorliegenden Konglomerate auf. Der Durchmesser der Nanopartikel müsste dabei einer kleineren Größe als der Durchmesser der Kernporen von 9 bis 10 nm entsprechen (AshaRani et al. 2009). Es ist möglich, dass aufgrund des Größendurchmessers die Kernporen eine suffiziente Barriere gegenüber Nanopartikeln von über 9 nm Durchmesser bilden. Sollten jedoch in weiteren Versuchen die intranuklearen Nanopartikel einen größeren Durchmesser

aufweisen, so spräche dies nicht unbedingt für eine Zellkernpenetration über die Porenstruktur. Denkbar wäre eine Inkludierung der Partikel während der Mitose, bei der die Nanopartikel an den Chromatinfäden des Spindelapparates haften könnten. Allerdings setzt dies eine offene Mitose mit vorübergehendem Abbau der den Nukleus umgebenden Zellmembran voraus (De Souza et al. 2007). Im Gegensatz zur zellulären Aufnahme von Nanopartikeln ist die Studienlage zur Penetration von Zellorganellen und Zellkern rar. Es existieren jedoch bereits Überlegungen, biochemisch veränderte Nanopartikeln vor allem in der Krebstherapie im Sinne eines gezielten intranuklearen Drug-Targetings einzusetzen (Pan et al. 2012; Pan et al. 2013; Tammam et al. 2016, 2017). Mit Hinblick auf die Ergebnisse dieser und der kontroversen Studienlage ist die intrazelluläre Distribution zum jetzigen Zeitpunkt noch als unklar zu betrachten. Weitere Untersuchungen insbesondere der genotoxischen Effekte sind essenziell und sollten vor der Verwendung von Nanopartikeln als Transporter für intrazelluläres Drug-Targeting erfolgen.

#### **4.5 Die menschliche Haut – eine suffiziente Barriere?**

Die transdermale Penetration stellt für ZnO-NP die Haupteintrittspforte dar. Aufgrund der Barrierefunktion der Haut sowie der in tieferen Hautschichten gelegenen Stammzellen ist von geringen Dosiskonzentrationen der Nanopartikel auszugehen. Dieser Umstand wurde durch die Verwendung des Konzentrationsbereichs von 0,01 bis 10 µg/ml in den einzelnen Versuchen simuliert.

Für TiO<sub>2</sub>-NP konnte eine transdermale Penetration von Titandioxid-Nanopartikeln hauptsächlich bis in das Stratum corneum disjunctum und in sehr seltenen Fällen bis ins Stratum spinosum nachgewiesen werden (Butz et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse liegen für Ag-NP vor. In einer im Jahr 2009 publizierten Studie zeigte sich eine nur geringe transdermale Aufnahme der Nanopartikel. Elektronenmikroskopisch waren die Ag-NP lediglich im Stratum corneum und den oberen Schichten der Epidermis nachweisbar (Larese et al. 2009). Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der Arbeit von Cross und Kollegen wider. Hierbei konnte in einer elektronenmikroskopischen Analyse

darlegt werden, dass auch eine Penetration der Haut durch ZnO-NP sich lediglich auf das äußere Stratum corneum beschränkt. Es konnten keine ZnO-NP in den tiefer gelegenen Schichten des Stratum corneums oder der vitalen Epidermis nachgewiesen werden (Cross et al. 2007). Die verschiedenen Schichten der Haut insbesondere das Stratum corneum scheinen also eine suffiziente Barriere darzustellen, sodass zumindest bei intakter Hautbarriere ein Kontakt mit den vitalen Zellen der Basalzellschicht ausgeschlossen werden kann (Butz et al. 2007). Dies liegt vor allem an der Architektur des Stratum corneum selbst. Diese oberste Hautschicht besteht aus abgestorbenen Keratinozyten, welche gefüllt mit Keratin und ohne Zellorganellen eingebettet in einer extrazellulären Matrix von multilaminären Lipiddoppelschichten liegen (Jadoul et al. 1999). Anders als bei den vitalen hMSC, ist bei diesen avitalen Zellen keine zelluläre Aufnahme über Endozytose möglich. Die aktuelle Studienlage deutet daraufhin, dass Nanomaterialien, die in kosmetischen Produkten wie Sonnencreme eingesetzt werden, kein Risiko für die menschliche Haut oder Gesundheit darstellen (Filipe et al. 2009; Mohammed et al. 2020). Zusammenfassend ist eine intakte Dermis ein suffizienter Schutz des menschlichen Organismus vor NP. Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit die Barrierefunktion der Haut bei Vorschädigung z. B. durch Strahlenschäden wie einer Dermatitis solaris oder Erkrankungen wie Psoriasis gewährleistet ist. Sollten Nanopartikel dann tiefere Hautschichten erreichen, wäre ein Kontakt mit den proliferierenden Zellen, den Stammzellen, denkbar. Die zytotoxischen Effekte oder gar Genotoxizität könnten gerade in den Stammzellen zu empfindlichen und nachhaltigen Schädigungen führen. Denn anders als die ausdifferenzierten Keratinozyten, die konsequent der Apoptose zugeführt und alle 2 Wochen abgestoßen werden (Christophers et al. 2003), persistieren Stammzellen im Gewebe. Insbesondere Schäden am zellulären Erbgut könnten so an die Tochterzellen weitergegeben werden und im Organismus persistent bleiben. Langfristig sollte auch hier ein kanzerogenes Potential von Nanopartikeln als mögliche Spätfolgen diskutiert und wissenschaftlich erfasst oder ausgeschlossen werden.

In der Tat belegen Studien bei vorgeschädigter Haut eine mögliche Invasion durch Nanopartikel. So konnte beobachtet werden, dass die Penetration durch

Ag-NP in vorgeschädigter Haut fünffach größer als in intakter Haut war (Larese et al. 2009). In einer *in vitro*-Studie mit TiO<sub>2</sub>-NP konnte aufgezeigt werden, dass eine Penetration in tierischer Haut auch bei einer Partikelgröße von unter 100 nm sowie beschädigtem Stratum corneum nicht stattfand (Mika et al. 2009). Verwendung fand dabei Haut vom Yucatan Minischwein, die nach Fujii und Kollegen in ihrem Aufbau menschlicher Haut ähnelt (Fujii et al. 1997). Interessanterweise kam es jedoch bei rasierter/epilierter Haut zu einer tiefen Penetration der NP in die Haut, wahrscheinlich über die leeren Haarfollikel (Mika et al. 2009). In einer weiteren Studie konnte beobachtet werden, dass repetitiv auf die Haut topisch aufgetragene ZnO-NP in den Stammzellen der Haarfollikel (HFSCs) akkumulieren und über DNA-Schäden zur Apoptose dieser führen (Ge et al. 2017). Dies könnte an der Verweildauer der Nanopartikel im Haarfollikel liegen. Während im Stratum corneum lokalisierte Nanopartikel weitgehend innerhalb eines Tages entfernt werden, persistieren sie in den Haarfollikeln über mehr als 10 Tage (Nohynek et al. 2007). Allerdings scheint trotz der tiefen Penetration über die Haarfollikel kein vitales Gewebe penetriert zu werden. Eine Ausscheidung der Nanopartikel erfolgt wahrscheinlich über die Talgdrüsen (Butz et al. 2007).

Auch in der vorliegenden Arbeit, insbesondere bei den oben aufgeführten Ergebnissen, konnten wir im Rahmen der elektronenmikroskopischen Analyse eine intrazelluläre Akkumulation der NP beobachten. Diese waren auch nach 6 Wochen in den Zellen persistent. Bereits in diesem zeitlichen Rahmen konnte vereinzelt eine Penetration des Zellkerns beobachtet werden, welche zu zytotoxischen oder genotoxischen Effekten führen könnte. Unklar bleibt, wie es sich mit den NP jenseits des zeitlichen Intervalls von 6 Wochen verhält. Über eine eventuelle Elimination der NP lässt sich nur spekulieren. Eine intrazelluläre Akkumulation der NP ist als äußerst problematisch zu betrachten, da so auch gering dosierte Expositionen für den Organismus zu kritischen intrazellulären Konzentrationen führen könnten. Insbesondere bei repetitivem Kontakt erscheint dies möglich zu sein (Hackenberg et al. 2013). Weitere Langzeitstudien sind diesbezüglich erforderlich. Als Schwerpunkt solcher Studien wären vor allem mögliche Eliminations- bzw. Ausschleusungsmechanismen relevant.

#### 4.6 *In vitro*- versus *in vivo*-Testverfahren

Um einen fundierten Überblick über die Nanotoxikologie von ZnO-NP zu geben, wurde versucht in der vorliegenden Arbeit möglichst nah an den physiologischen Gegebenheiten zu bleiben und diese zu simulieren. Die Konzentrationen von unter 1 µg/ml geben dabei am ehesten *in vivo*-Konzentrationen wieder (Kroll et al. 2011). Als *in vitro*-Testverfahren fanden für den Nachweis von Zytotoxizität der MTT-Test und von Genotoxizität der Comet Assay Verwendung. Der Vorteil von *in vitro*- gegenüber *in vivo*-Testungen besteht vor allem in der Einfachheit der Durchführung und Reproduzierbarkeit. Die Kosten sowie der zeitliche Aufwand sind begrenzt und die einzelnen Testverfahren sind in der Regel ethisch einfacher zu vertreten. Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden nach den in unserer Arbeitsgruppe festgelegten Protokollen durchgeführt. Eine Vergleichbarkeit von Studien innerhalb unserer Arbeitsgruppe ist somit gut möglich. Allgemeingültige, standardisierte Protokolle für die Herstellung und Anwendung von NP-Dispersionen sowie deren Expositionsbedingungen und Referenzmaterialien zur Verbesserung der Vergleichbarkeit von *in vitro*- und *in vivo*-Studien liegen jedoch bisher nicht vor (Kroll et al. 2011). Ferner zeigt sich auch, dass die einzigartigen Eigenschaften von Nanomaterialien mit standardisierten Protokollen interferieren und daher falsch-positive sowie falsch-negative Ergebnisse verursachen können (McNeil 2011). Nach Kroll und Kollegen beruhen die biologischen Auswirkungen von NP dabei auf der Vielzahl von physikochemischen Eigenschaften wie Größe, Oberflächenbeschichtung und Oberflächenchemie (Kroll et al. 2011). Diese physikochemischen Eigenschaften von Nanopartikeln schränken oft die Verwendung von etablierten *in vitro*-Toxizitätstest zur Risikobewertung ein (Kroll et al. 2009). Daher wird in nanotoxikologischen Untersuchungen von NPs eine detaillierte physikalisch-chemische Charakterisierung unter realen Versuchsbedingungen bevorzugt (Kwon et al. 2014). Dies betont die Notwendigkeit für eine gründliche physikalisch-chemische Charakterisierung und Toxizitätstests für jede Art von Nanopartikeln (Kroll et al. 2011). Dabei sollten die Messungen die Größe, Morphologie, Oberflächenbeschaffenheit, Ladung, chemische Zusammensetzung, Kristallinität, Verteilung und Agglomeration der jeweiligen Nanopartikel erfassen (Kwon et al. 2014).

Die Aussagekraft von *in vitro*-Studien ist somit limitiert, sodass *in vivo*-Untersuchungen zunächst am Tiermodell eine zunehmend wichtigere Stellung beziehen werden. Denn theoretisch besteht auch die Möglichkeit, dass z. B. die intrazelluläre Persistenz der NP ein reiner *in vitro*-Effekt ist und sich *in vivo* nicht reproduzieren lässt.

#### 4.6.1 Fallstricke des MTT-Tests

Durch photometrische Messung des chemisch zu Formazan reduzierten Thiazolylblaus konnten im Rahmen des MTT-Tests zytotoxische Effekt von ZnO-NP an hMSC nachgewiesen werden. Auch wenn der MTT-Test als ein etabliertes Testverfahren gilt, wäre eine Beeinflussung der Testergebnisse durch endo- und exogene Faktoren sowie den physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel denkbar.

Eine temporär erhöhte Permeabilität der Zellmembran aufgrund zytotoxischer Effekte kann in falsch-positiven Ergebnissen resultieren. Die Zellen würden dadurch im MTT-Test blau eingefärbt werden, obwohl sie sich jedoch zu einem späteren Zeitpunkt wieder erholen (Stepanenko et Dmitrenko 2015). Diese Vermutung können wir in der Zusammenschau, insbesondere der Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Bildgebung, nicht bestätigen. Eine primäre Schädigung der Zellmembran oder eine Diffusion der NP in den Intrazellulärraum war über die komplette Versuchsreihe nicht nachzuweisen. Daher ist nicht von einer gesteigerten Permeabilität mit folgender falsch-positiven Anfärbung der Zellen auszugehen.

Falsch negative Ergebnisse können aber auch dadurch entstehen, dass der blaue Farbstoff nekrotische Zellen sehr spät anfärbt. Zellen, die zwar noch intakte Zellmembranen vorweisen, jedoch die Apoptose bereits eingeleitet haben, werden nicht erfasst (Stepanenko et Dmitrenko 2015). Dies wäre insbesondere bei den niedrig dosierten ZnO-NP-Expositionen denkbar, die bisher keine signifikante Zellschädigung aufwiesen. Eine Überschreitung des Signifikanzlevels im weiteren zeitlichen Verlauf erscheint so möglich. Als Konsequenz wäre es denkbar, den Zellkulturen nach erfolgter NP-Exposition in

einem bisher undefinierten Zeitraum wieder Zellmedium zuzuführen. In diesem Intervall könnten sodann eingeschlagene apoptotische Pfade bei irreparabler Zellschädigung oder aber Reparaturmechanismen zur Gänze abgelaufen sein und so ein realistischeres Bild des zytotoxischen Schadens widerspiegeln. So betrachtet erscheint eine Verwendung des MTT-Tests insbesondere bei Langzeitstudien berechtigt. Mit Rückblick auf die Ergebnisse im Rahmen der zytotoxischen Analyse mittels MTT-Test ergab sich bei der 24-stündigen Exposition mit ZnO-NP eine signifikante Zytotoxizität ab einer Konzentration von 50 µg/ml. Für eine mögliche Langzeituntersuchung wäre also denkbar, dass die zytotoxischen Effekte bereits bei niedriger ZnO-Dosis, ähnlich wie beim repetitiven Versuchsansatz, signifikant wären. Andererseits könnten jedoch auch vermehrt Reparaturmechanismen greifen und somit die Toleranz gegenüber zytotoxischen Effekten von Nanopartikeln erhöhen.

ZnO-NP sind dadurch charakterisiert, dass sie sowohl eine große als auch chemisch aktive Oberfläche besitzen. Nach den Arbeitsgruppen von Holder und Kroll könnten diese Eigenschaften mit Bestandteilen oder den Messverfahren des Assays interferieren und eine falsche Bewertung der Zytotoxizität verursachen. Somit wird die Vergleichbarkeit mit anderen nanotoxikologischen Studien erschwert (Holder et al. 2012; Kroll et al. 2009). Eine nicht-zelluläre Reduktion des Thiazolylblaus konnte für Rußpartikel sowie TiO<sup>2</sup>- und ZnO-NP bei Konzentrationen ab 50 µg/ml nachgewiesen werden (Holder et al. 2012; Lupu et Popescu 2013). Daher wurde eine maximale Konzentration von 50 µg/ml in den einzelnen Versuchen festgelegt. Auch mögliche Interaktionen mit dem Auslesegerät werden aufgrund der Lichtbrechung und Lichtabsorption von NP diskutiert (Kroll et al. 2012). Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch nachweisen, dass bei Kontrollexperimenten ohne Zellen und ausschließlich mit ZnO-NP keine Blaufärbung im MTT-Test erfolgt, wodurch eine Interferenz der Partikel mit der Testsubstanz ausgeschlossen werden konnte (Ickrath et al. 2017).

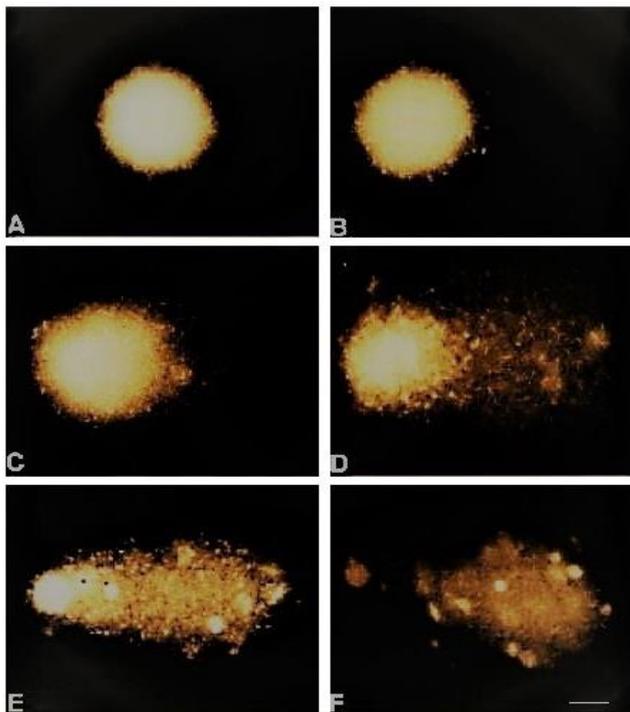
Auch wenn die Studienlage bezüglich einer zytotoxischen Schwellenkonzentration sowie den tatsächlich ablaufenden Mechanismen nach Singh kontrovers ist, so ist sie jedoch mit den zytotoxischen Eigenschaften bzw.

Potential von ZnO-NP konform (Singh 2019). Dies hebt die Wichtigkeit sowie Notwendigkeit weiterer Studien der Mechanismen und Auswirkungen von ZnO-NP auf den menschlichen Organismus hervor. Spannende Ansätze bieten dabei Arbeiten, die gerade in der Zytotoxizität von ZnO-NP durch gezielte Apoptose ein mögliches Potential der Krebstherapie sehen (Akhtar et al. 2012). Die große Herausforderung für zukünftige nanotoxikologische Studien ist dabei die Entwicklung von neuen standardisierten *in vitro*-Methoden, die nicht durch die Eigenschaften von Nanopartikel beeinflusst werden können (Kroll et al. 2009). Aber auch der Ausschluss von methodenbedingter Beeinflussung muss gegeben sein. Eine prolongierte Inkubation mit Trypanblau oder eine „Übertrypsinierung“ erhöht z. B. die Wahrscheinlichkeit einer falsch positiven Färbung (Stepanenko et Dmitrenko 2015). Darüber hinaus könnte in zukünftigen Arbeiten der MTT-Test mit anderen Testverfahren wie z. B. dem Neutralrot-Test kombiniert werden, um die jeweiligen zytotoxischen Effekte zu verifizieren.

#### 4.6.2 Fallstricke des Comet Assay

Eine mögliche Interaktion zwischen Makromolekülen wie DNA oder RNA mit NP auf zellulärer Ebene wird aufgrund der nanoskaligen Größe der Partikel angenommen (Sharma et al. 2009). Hierin liegt der Verdacht begründet, dass ZnO-NP eine Schädigung des zellulären Erbgutes verursachen könnten und somit ein genotoxisches Potential besitzen. Zur Detektion möglicher Genotoxizität nach ZnO-NP-Exposition fand der Comet Assay Verwendung. Ursprünglich als Einzelzellmikrogelelektrophorese bezeichnet, hat sich seit den 1990er Jahren das Synonym Comet Assay, welches die Migration der DNA in dem Agarosegel beschreibt, durchgesetzt (Collins 2004; Møller 2018; Tice et al. 2000). Es zeigen sich dabei typische an Kometen erinnernde elektrophoretische DNA-Fragmente (Kleinsasser 2004). Nach Magdolenova und Kollegen gilt der Comet Assay als die frequentierteste Nachweismethode von Genotoxizität noch vor dem Mikrokerntest und dem Chromosomen-Aberrationstest (Magdolenova et al. 2014).

Das von unserer Arbeitsgruppe verwendete Untersuchungsprotokoll entspricht den im Jahr 2000 publizierten Modifikationen und Richtlinien von Tice und Kollegen (Tice et al. 2000). Dabei ist der Untersuchungsaufbau einfach, kostengünstig und die Durchführung sowie Auswertung kann theoretisch innerhalb eines Tages erfolgen (McKelvey-Martin et al. 1993). Wie von Kleinsasser zusammengefasst, ermöglicht der Comet Assay als Kurzzeittestverfahren die Darstellung von DNA-Schädigungen, die durch biologische, physikalische oder chemische Noxen an humanen Einzelzellen induziert werden (Kleinsasser 2004). Durch Aktivierung des elektrischen Feldes wandern die DNA-Fragmente vom Nucleus entsprechend ihrer Größe zur Anode (McKelvey-Martin et al. 1993). Je höher die Fragmentierung, desto höher ist der Anteil, der sich am Schluss der Elektrophorese im Schweif des Kometen befindlichen DNA (Abb. 24) in Relation zur ungeschädigten DNA im Kopf (Kleinsasser 2004). Weitgehend unfragmentierte Zellen imponieren als intakte Nuklei ohne Schweif (McKelvey-Martin et al. 1993).



**Abbildung 24:** Zell-Nuklei im Comet Assay nach DNA-Schadigungsgraden (*Silva et al. 2000*):

- A - geringe Fragmentierung
- B - Klasse 1
- C - Klasse 2
- D - Klasse 3
- E - Klasse 4
- F - apoptotische Zelle

Durch die Publikation durch Singh et al. 1988, welche die alkalische Versuchsdurchführung (pH 13) beschreibt, ist

es möglich, neben Doppelstrangbrüchen auch Einzelstrangbrüche, Basenschäden sowie alkalilabile Stellen nachzuweisen (McKelvey-Martin et al. 1993; Singh et al. 1988).

Der Comet Assay eignete sich somit hervorragend für unsere Fragestellung. In der Literatur werden jedoch auch mögliche Interaktionen mit Nanopartikeln diskutiert (Karlsson et al. 2015). Insbesondere TiO<sub>2</sub>-NP sind für ihre photokatalytische Aktivität unter UV-Licht bekannt (Xiong et al. 2013). So konnten DNA-Strangbrüche durch eine kurzzeitige Exposition der Comet-Slides unter normalen Laborlicht induziert werden (Di Bucchianico et al. 2017). Um zusätzliche DNA-Schäden bzw. falsch positiven Ergebnissen zu vermeiden, ist der Comet Assay somit unter Ausschluss von Tages- und Laborlicht durchzuführen. Dies konnte unsererseits gewährleistet werden, da auch für ZnO-NP photozytotoxische und photogenotoxische Effekte angenommen werden (Wang et al. 2013).

Die Arbeitsgruppe um George konnte im Vergleich mit dem Mikrokern- und Chromosomenaberrationstest beim Comet Assay falsch positive Ergebnisse aufzeigen. Vermutet wurde, dass im Rahmen der Versuchsdurchführung intrazellulär verbliebene Gold-Nanopartikel in direkten Kontakt mit der Nukleoid-DNA kommen und zusätzliche DNA-Schäden verursachen (George et al. 2017). Eine sogenannte überschätzte Genotoxizität war auch für CeO<sub>2</sub>-, SiO<sub>2</sub>- und Polystyrol-NP nachweisbar (Ferraro et al. 2016). Diese Annahme können wir bezogen auf die Ergebnisse der repetitiven ZnO-NP-Exposition nicht bestätigen. Aufgrund der intrazellulären Akkumulation von ZnO-NP wäre dann eine signifikante DNA-Schädigung durch den vermehrten direkten Nukleoid-NP-Kontakt zu erwarten gewesen. Auch auf eine Störung der DNA-Migration durch Nanopartikel gibt es keine Hinweise (Karlsson et al. 2015). Um falsch positive Ergebnisse zukünftig zu vermeiden, wird nach der Lyse eine Entfernung der intrazellulären Nanopartikel empfohlen. Eine Bestimmung der tatsächlich durch die Inkubation mit Nanopartikeln verursachten Genotoxizität ist so möglich (Ferraro et al. 2016). Karlsson und Kollegen konnten eine erhebliche Genotoxizität bei CuO-NP, die während des Comet Assays hinzugefügt wurden, nachweisen. Jedoch zeigten Versuche mit gewaschenen Zellen keine verminderte Genotoxizität, sodass unter normalen Versuchsbedingungen ein zusätzlicher Schaden, der durch das Vorhandensein von NP im Gel verursacht wird, wahrscheinlich nicht signifikant ist (Karlsson et al. 2015). Auch Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und DNA-Färbungen wie

Ethidiumbromid sind als unwahrscheinlich anzusehen. Es würde nur zu einem sehr lokalisierten Effekt im Sinne eines gebleichten Flecks an der Position des NP im Kometenkopf kommen (Karlsson et al. 2015).

Die Erholungsphase in der repetitiven Versuchsreihe betrachtend, stellt sich die Frage nach in diesem Intervall ablaufenden intrazellulären Reparaturvorgängen. Führen niedrigdosierte ZnO-NP wirklich zu irreparablen Schädigungen am zellulären Erbgut? In diesem Zusammenhang ist der Comet Assay als Instrument zur Beurteilung der Genotoxizität kritisch zu betrachten. Messungen von DNA-Strangbrüchen geben nur begrenzte Informationen wieder. Sie repräsentieren zwar den direkten schädigenden Effekt eines Agens, jedoch werden diese in der Regel wieder schnell verbunden (Collins 2004). Auch ist ein Großteil der mit dem Comet Assay gemessene DNA-Schäden reversibel (Tice et al. 2000). Somit bestünde zumindest die Möglichkeit einer Art von langfristigem Integritätserhalt des Erbgutes bis zu einem gewissen Ausmaß über enzymatische Reparaturvorgänge. Mismatch-Reparaturproteine, Basen- und Nukleotid-Exzision sowie die homologe Rekombination sind gut beschriebene Mechanismen von DNA-Reparatur (Friedberg 2003). Eine Messung dieser DNA-Reparatur-Aktivität ist auch durch den Comet Assay möglich (Møller 2018). Darüber hinaus vergrößert der Einsatz von Reparaturmechanismen die Reichweite der mit dem Comet Assay detektierbaren DNA-Schäden (Møller 2018). Dies wäre ein vielversprechender Ansatz für kommende Forschungsprojekte.

Zusammenfassend darf der Comet Assay als etablierter Routinetest, nicht als Beweis für persistierende Veränderungen des Erbguts dienen. Er nimmt eher die Rolle eines Indikators ein, da er lediglich die Initiationsphase der Genotoxizität wiedergibt und ein positives Ergebnis nur als Hinweis auf Genotoxizität gewertet werden kann. Beim Vorliegen eines negativen Ergebnisses sind genotoxische Effekte nahezu ausgeschlossen bzw. sehr unwahrscheinlich. Im Gegensatz dazu muss ein positives Ergebnis immer eine Reihe weiterer Testverfahren bezüglich Genotoxizität nach sich ziehen. Nach der Übersichtsarbeit von Karlsson und Kollegen ist der Mikrokerntest hierbei zusammen mit dem Comet Assay geeignet,

die genotoxischen Wirkungen von Nanopartikeln zu bewerten (Karlsson et al. 2015). Von einer perfekten Übereinstimmung der Ergebnisse kann jedoch nicht ausgegangen werden. Unterschiede in den mit dem Mikronukleus- und dem Comet Assay erzielten Ergebnissen können auf bestimmte Mechanismen zurückzuführen sein. Diesen liegen die genotoxischen Effekte sowie die unterschiedlichen Endpunkten, die durch die beiden Tests dargestellt werden, zugrunde (Kazimirova et al. 2019). Auch dies sind spannende Anknüpfungspunkte für weitere Versuche.

### **4.7 Nanotechnologie und der Endverbraucher**

Die Nanotechnologie findet sich in alltäglichen Konsumprodukten wie Kosmetika oder Lebensmittel, aber auch in technischen und medizinischen Produkten. Letztere versprechen vor allem bahnbrechende Neuerungen in Diagnostik und Therapie. Mit der enormen, stetig wachsenden Anzahl an Nanoprodukten kommt ein jeder in der heutigen industrialisierten Gesellschaft in Kontakt mit Nanomaterialien unterschiedlicher Art und Weise. Allen voran sind Silbernanopartikel die am meisten kommerziell verwendeten und verarbeiteten Nanopartikel (Hackenberg et al. 2011b). In Diskussion stehen hierbei nach wie vor die jeweiligen Vor- und Nachteile, insbesondere mögliche gesundheitliche sowie ökologische Risiken von Nanotechnologie und Nanomedizin, denn Langzeitstudien sind rar.

Als Verbraucher kommt man meist unbemerkt mit Nanomaterialien in Kontakt. Hierzu zählt auch der alltägliche Kontakt mit ultrafeinen Partikeln, vor allem in urbanen Gebieten, denen man sich als Individuum ausgesetzt sieht. Die in deutschen Großstädten eingeführten Umweltzonen sind bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit umstritten (Cyrus et al. 2018; Wichmann 2008).

Unterschiedliche international geführte digitale Datenbanken versuchen die Transparenz in dem weiten Feld der kommerziellen Nanotechnologie und Nanomedizin zu erhöhen. Prinzipiell ist es den Verbrauchern und Interessierten so möglich, sich über den Einsatz von verschiedenen Nanomaterialien in Konsumprodukten zu informieren. Unter anderem werden neben

produktspezifischen Risikoprofilen, mit Angaben zur möglichen Exposition und Gefährdung von Menschen und Umwelt, auch die Zusammensetzung, der Hersteller und der Produktionsstandort gelistet (DTU Environ. et al. 2021).

Eine solche Transparenz ist mehr als wünschenswert. Jedoch lösen von unterschiedlichen internationalen Instituten geführten Datenbanken nicht das Problem, dass für Nanotechnologie weder eine einheitliche Definition noch international gültige Richtlinien existieren. So existieren diverse unvollständige, nationale Datenbanken parallel zueinander, deren Zusammenführung erstrebenswert wäre. Auch die deutsche Nanodatenbank „Nanowatch“ listet mit mehr als 1000 Produkten nur einen Bruchteil der erhältlichen Nanomaterialien. Beispielsweise werden für ZnO-NP lediglich 7 Produkte genannt (Stand August 2021). Obwohl in der Datenbank gelistet, sind bei vielen Produkten die enthaltenden Nanomaterialien nicht genannt bzw. bekannt (BUND e.V. 2021b).

Auf der vom Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland e.V. (BUND) geführten Internetpräsenz ist die Gesetzeslage in Deutschland wiedergegeben. Die Wissenslücke bezüglich gesundheitlicher und ökologischer Risiken zu schließen ist Aufgabe der europäischen Chemikaliengesetzgebung. Doch die meisten Gesetze, die Chemikalien und Produkte regulieren, enthalten bisher keine oder nur eingeschränkte Vorgaben zum Umgang mit Nanomaterialien (BUND e.V. 2009). Mit Ausnahme von Kosmetika und Bioziden sowie Lebensmitteln ist eine entsprechende Deklaration von Nanoprodukten abhängig vom Willen des Herstellers. Auch werden viele Produkte mit dem Präfix „Nano“ beworben, obwohl keine Nanomaterialien enthalten sind (Kiel 2020).

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte eine Schädigung von Zelle und Erbgut durch ZnO-NP im Rahmen eines experimentellen Aufbaus nachgewiesen werden. Andere Studien, auch unserer Arbeitsgruppe, stützen diese Ergebnisse und weisen auf ähnliche zyto- und genotoxischen Effekte bei anderen Nanomaterialien hin. Stellvertretend konnte nach Bartłomiejczyk und Kollegen bei Ag-NP neben ihrer viel postulierten antimikrobiellen Wirkung auch ein zyto- sowie genotoxisches Potential gegenüber menschlichen Zellen nachgewiesen werden (Bartłomiejczyk et al. 2013).

Zusammenfassend wird hier ein entsprechender politischer Handlungsbedarf gesehen. Die Übernahme der bereits 2011 von der EU-Kommission vorgeschlagenen, bisher aber unverbindlichen Definition für Nanomaterialien in alle relevanten Gesetze steht sowohl in Deutschland, als auch in anderen EU-Ländern, weiterhin aus (BUND e.V. 2021a). Mit Hinblick auf den Verbraucherschutz besteht diesbezüglich ein nicht zu ignorierender Handlungsbedarf.

### **4.8 Ausblick**

Glaukt man der Literatur, so stehen uns Dank der Nanomaterialien als Schlüsseltechnologie glänzende Zeiten bevor. Von verjüngenden Kosmetika über neuartige Textilbeschichtungen bis hin zu nanoskaligen Robotern in der Krebstherapie scheinen keine Grenzen zu bestehen. In der ganzen Euphorie und Glorifizierung geht der Aufruf der Kritiker zur Mäßigung unter. Trotz zunehmender, nanotoxikologischer Studienlage droht ein Kontrollverlust.

#### **4.8.1 Standardisierte Versuchsabläufe**

In dieser Arbeit konnten wir sowohl das zytotoxische als auch genotoxische Potential von ZnO-NP in Abhängigkeit von Dosis und Expositionsdauer aufzeigen. Eine umfassende nanotoxikologische Bewertung von ZnO-NP gelang jedoch nicht, sodass weitere Studien notwendig sind. Hierbei gilt es auch die zum Teil deutliche Diskrepanz unterschiedlicher Studien zu hinterfragen. Eine Definition von standardisierten Untersuchungsaufbauten und -abläufen durch die Arbeitsgruppen würde die Vergleichbarkeit der Studien erhöhen und diese in einem gesamten Kontext einordnen. Hierfür ist auch einer Steigerung des Patientenkollektivs in den einzelnen Studien erforderlich.

#### **4.8.2 Partikelgröße, NP-Konzentrationen und Langzeitversuche**

Auch die Partikelgröße als Faktor für Zyto- aber insbesondere Genotoxizität muss weitere Beachtung finden. Vor allem Untersuchungen mit dem als optimalen Radius von NP beschriebenen 25 bis 30 nm großen NP sollten sich anschließen. Darüber hinaus sollten elektronenmikroskopische Analysen für NP mit maximal

9 bis 10 nm Größe bezüglich einer möglichen Penetration des Nucleus über die Kernporen erfolgen.

Mit Blick auf die Literatur erscheint der Konzentrationsbereich von 0,01 bis 50 µg/l ZnO-NP gut gewählt. Lediglich der Bereich zwischen 10 und 50 µg/l sollte in zukünftigen Arbeiten mehrschrittig wiedergegeben werden. Die Expositionsdauer jedoch ist in der Studienlage bezüglich der repetitiven Anwendung aber auch über 24 Stunden hinaus nur unzureichend dargestellt. Auf eine mögliche zeitliche Komponente der Zyto- aber auch Genotoxizität wurde in dieser Arbeit bei einer einheitlichen Inkubationsdauer von 24 Stunden nicht eingegangen. Daher bildet ein Versuchsaufbau mit mehreren Inkubationsintervallen gerade in den von uns als nicht zyto- und nicht-genotoxisch deklarierten Konzentrationsbereichen ein konkretes Anschlussprojekt zu dieser Arbeit. Mittels Langzeitversuchen mit unterschiedlich langen Regenerationsphasen wäre ferner eine Beurteilung der Erholung bzw. der Reparaturfähigkeit von Zellen und Erbgut möglich. Zur genauen Beurteilung der genotoxische Effekte und Darstellung der Reparaturmechanismen sollten sich generell dem Comet Assay als Indikator für Genotoxizität weitere Testverfahren wie z. B. der Mikrokerntest anschließen. Ferner muss geklärt werden, ob NP auch ein kanzerogenes Potential besitzen indem DNA-Schäden durch mitotische Teilung weitergegeben werden.

#### **4.8.3 Stammzellen und Andifferenzierung**

Aufgrund der überwiegend transdermalen Exposition von ZnO-NP *in vivo* wäre der Einsatz von hMSC, die aus Haut gewonnen wurden, erstrebenswert. Dem sollten sich elektronenmikroskopische Untersuchungen insbesondere von vorgeschädigter Haut anschließen. Die in dieser Arbeit verwendeten hMSC wurden ausschließlich aus Fettgewebe isoliert und waren so nur repräsentativ für das Stratum basale. Die Fragestellung bezüglich einer Protektivität durch Andifferenzierung der gewonnen Stammzellen gegenüber NP konnten wir im Rahmen unserer exemplarischen Darstellung nicht klären, sodass hier weitere Studien ansetzen sollten. Auch auf einer Gegenüberstellung von multipotenten

Stammzellen, adipogen und osteogen andifferenzierten sowie ausdifferenzierten Zellen könnten weitere Studien aufbauen.

#### **4.8.4 Intrazelluläre Mechanismen**

Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Analyse sollte ein weiterer Schwerpunkt auf die genauen intrazellulären Abläufe gelegt werden. Der zellulären Aufnahme, aber auch einer möglichen Elimination, kommen hierbei Schlüsselfunktionen zu. Das Ziel zukünftiger Arbeiten sollte es sein, die Endozytose sowie die intrazelluläre Distribution der NP umfassend darzustellen. Etwaige Mechanismen, die die endozytotische Aufnahme regulieren, sollten entschlüsselt werden. Denkbar wäre es dann, NP mit Markern zu versehen und so eine intrazelluläre Aufnahme z. B. im Sinne des Drug Targetings gezielt zu steuern oder zu verhindern.

#### **4.8.5 Verbraucherschutz**

Allgemein gesehen muss im Sinne des Verbraucherschutzes die Transparenz möglicher Nanomaterialien in Konsumprodukten erhöht werden. Die nationalen Datenregister müssten hierfür zu einem globalen - oder zumindest europäischen - Nano-Register zusammengefasst werden. Eine generelle Meldepflicht für alle Nanomaterialien und -produkte und eine Kennzeichnung von Nanomaterialien auf Produkten im Verzeichnis der Inhaltsstoffe muss international eingeführt werden. Darüber hinaus sollten dringend diesbezügliche Lücken in der europäischen Chemikalienverordnung REACH geschlossen werden. Ebenfalls ist ein Monitoring-Programm zur Bewertung der Belastung von Arbeitnehmer/innen mit Nanomaterialien anzustreben.

Die Effekte auf den menschlichen Organismus sind jedoch nur ein Teil des Ganzen, mit dem wir uns beim Einsatz von Nanotechnologie auseinandersetzen müssen. Als ein weiteres Gedankenspiel ergibt sich die Frage, inwieweit Nanopartikel oder Nanomaterialien nach ihrem Konsum langfristig die Umwelt belasten und z. B. Ökosysteme beeinflussen. Nach Plastik-Flut und Mikroplastik ist auch eine Verschmutzung durch Nanomaterialien denkbar. Diesbezüglich nochmals ein Verweis auf die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen

Analyse an dieser Stelle. Eine Eliminierung oder Ausscheidung der Nanopartikel konnte nicht beobachtet werden. Sollten durch den Produktkreislauf NP in die Umwelt wie z. B. in das Grund- und damit Trinkwasser gelangen, so könnten Nanopartikel fortlaufend unkontrolliert aufgenommen werden und intrazellulär akkumulieren. Dies dürfte dann letztendlich ähnlich wie bei Mikroplastik oder Antibiotika zu einem Nachweis von NP in Nahrungsmittel wie z. B. Fleisch führen.

Zusammenfassend soll diese Arbeit einen gewissen Beitrag zur nanotoxikologischen Beurteilung von ZnO-NP leisten und damit eine Basis für weitere Studien mit zunehmend spezifischeren Fragestellungen darstellen.

## 5 Zusammenfassung

Im industriellen Zeitalter kommen Nanopartikeln aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften eine enorme Bedeutung zu. Nanomaterialien finden sich als Schlüsseltechnologie in zahlreichen Produkten des alltäglichen Bedarfs. Eine Deklarationspflicht besteht diesbezüglich bisher nicht. Studien, die *in vitro* sowie *in vivo* zyto- und genotoxische Effekte aufzeigen konnten, widersprechen der postulierten Unbedenklichkeit von Nanomaterialien in Konsumprodukten. Auch bei Zinkoxid-Nanopartikel (ZnO-NP) ist die Datenlage widersprüchlich. Ziel der Arbeit war es anhand repetitiver Expositionen mit nicht zytotoxischen Konzentrationen von ZnO-NP induzierte zyto- und genotoxische Effekte in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) nachzuweisen. Ferner wurde eine abweichende Vulnerabilität adipogen oder osteogen andifferenzierter hMSC gegenüber ZnO-NP untersucht. Mittels einer elektronenmikroskopischen Analyse sollte zudem die zelluläre Aufnahme, die intrazelluläre Distribution sowie eine Akkumulation der ZnO-NP im Zytoplasma beschrieben werden.

Pluripotente hMSC wurden ZnO-NP-Konzentrationen von 0,01; 0,1; 1; 10 und 50 µg/ml für 24 Stunden (h) und repetitiv ausgesetzt. Mittels MTT-Test erfolgte der Nachweis von Zyto- und mittels Comet Assay der Nachweis von Genotoxizität. Nach adipogener und osteogener Andifferenzierung über eine Woche erfolgte eine Inkubation mit bis zu 10 µg/ml ZnO-NP über 24 h mit folgendem MTT- und Comet Assay. Native hMSC wurden mit 10 µg/ml ZnO-NP über Zeiträume von 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 1 Woche, 3 und 6 Wochen exponiert und kultiviert. Folgend wurden die Zellproben elektronenmikroskopisch nach NP untersucht.

Im Friedman-Test konnten jeweils bis auf dem Comet Assay nach repetitiver Exposition unterschiedliche Tendenzen gegenüber der Negativkontrolle und den einzelnen ZnO-NP-Konzentrationen ermittelt werden. In der weiteren Analyse mit dem Man-Whitney-U-Test konnte Zytotoxizität ab 50 µg/ml und Genotoxizität ab 1 µg/ml ZnO-NP nach 24 stündiger Exposition nachgewiesen werden. Im Rahmen der repetitiven Exposition mit ZnO-NP war Zytotoxizität ab 1 µg/ml nachweisbar, jedoch keine Genotoxizität. Es gelang kein Nachweis von

Zytotoxizität an der adipogen oder osteogen andifferenzierten Zellreihe. Elektronenmikroskopisch wurden die ZnO-NP vereinzelt endozytotisch solitär oder als Konglomerat aufgenommen. Intrazellulär lagen die NP einzeln oder als Konglomerat vor, eine Penetration des Zellkerns oder Zellorganelle zeigte sich lediglich vereinzelt. Eine Ausschleusung oder Eliminierung der NP konnte nicht beobachtet werden. Von einer intrazellulären Persistenz der NP ist auszugehen.

In der Literatur wird eine Zytotoxizität um 25 µg/ml bei verschiedenen Zelllinien beschrieben. Auch in dieser Arbeit konnte der zytotoxische Bereich zwischen 10 und 50 µg/ml definiert werden. Die genotoxischen Effekte traten gegenüber den zytotoxischen Effekten bereits bei niedrigeren Dosierungen auf, sodass die hMSC bezüglich Genotoxizität vulnerabler erscheinen. Neben Konzentration dürfen auch Expositionsdauer sowie die Partikelgröße als beeinflussende Faktoren bezüglich Zyto- und Genotoxizität gelten. So konnten andere Arbeitsgruppen bei Inkubationen von > 24 h Zytotoxizität bereits ab Konzentrationen von < 10 µg/ml beschreiben. Als optimaler Radius für Endozytose sind 25 bis 30 nm anzunehmen, für die Passage der Kernporen sind Radien von < 9 nm erforderlich.

Eine intrazelluläre Akkumulation und Partikelpersistenz sind kritisch zu bewerten. Durch eine offene Mitose könnten die NP und deren zyto- sowie genotoxisches Potential an Tochterzellen weitergegeben werden. Bei rezidivierenden Expositionen sind weitere Akkumulationen denkbar. Dies bekräftigt das Ergebnis des MTT-Tests nach repetitiver Exposition. Das Ergebnis des dazugehörigen Comet Assays widerspricht unserer Annahme. Unterschiedliche Toleranzen der einzelnen Zelllinien, aber auch Reparaturmechanismen sind denkbar. Eine Protektivität der Andifferenzierung aufgrund des Verlustes der Multipotenz kann nur angenommen werden, ein Nachweis gelang diesbezüglich nicht.

Da Langzeitstudien ausstehen, sind gesundheitliche aber auch ökologische Folgen von Nanotechnologie nur schwer abzuschätzen. Gesetzliche Regelungen können mit dem Einsatz auf einen enorm wachsenden Markt kaum schritthalten. Daher bleibt die gegenwärtige Unsicherheit über das zyto- und genotoxische Potential von Nanopartikeln zunächst weiterhin bestehen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akhtar M J; Ahamed M; Kumar S; Khan M M; Ahmad J; Alrokayan S A** 2012: Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. In: *Int. J. nanomed.* 7, 845–57.
- Alarifi S; Ali D; Alkahtani S; Verma A; Ahamed M; Ahmed M; Alhadlaq H A** 2013: Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. In: *Int. J. nanomed.* 8, 983–93.
- Al-Nbaheen M; Vishnubalaji R; Ali D; Bouslimi A; Al-Jassir F; Megges M et al.** 2013: Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. In: *Stem Cell Rev. Rep.* 9, 32–43.
- Anselmo A C et Mitragotri S** 2019: Nanoparticles in the clinic: An update. In: *Bioeng. Translat. Med.* 4, 1-16.
- Anu M E S et Saravanakumar M P** 2017: A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In: *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 263, 1–15.
- AshaRani P V; Low Kah Mun G; Hande M P; Valiyaveetil S** 2009: Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. In: *ACS nano* 3, 279–90.
- Baksh D; Song L; Tuan R S** 2004: Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. In: *J. Cell. Mol. Med.* 8, 301–16.
- Barabadi H; Najafi M; Samadian H; Azarnezhad A; Vahidi H; Mahjoub M A et al.** 2019: A Systematic Review of the Genotoxicity and Antigenotoxicity of Biologically Synthesized Metallic Nanomaterials: Are Green Nanoparticles Safe Enough for Clinical Marketing? In: *Medicina* 55, 439.
- Bari C; Dell'Accio F; Tylzanowski P; Luyten F P** 2001: Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. In: *Arthritis Rheum.* 44, 1928–42.
- Baroni A; Buommino E; Gregorio V; Ruocco E; Ruocco V; Wolf R** 2012: Structure and function of the epidermis related to barrier properties. In: *Clin. Dermatol.* 30, 257–62.
- Bartłomiejczyk T; Lankoff A; Kruszewski M; Szumiel I** 2013: Silver nanoparticles - allies or adversaries? In: *Ann. Agric. Environ. Med.* 20, 48–54.
- Becheri A; Dürr M; Lo Nostro P; Baglioni P** 2008: Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers. In: *J. Nanopart. Res.* 10, 679–89.
- Beth-Hübner M** 2009: Nanotechnologie. Gesundheitsrisiken und Toxikologie. In: *DGUV forum* 09, 16–19.

- Brines M; Dall'Osto M; Beddows D C S; Harrison R M; Gómez-Moreno F; Núñez L et al.** 2015: Traffic and nucleation events as main sources of ultrafine particles in high-insolation developed world cities. In: *Atmos. Chem. Phys.* 15, 5929–45.
- BUND e.V.** (Hg.) 2009: Für einen verantwortungsvollen Umgang mit der Nanotechnologie. Eine erste Diskussionsgrundlage am Beispiel der Nanopartikel. *Positionspapier* 2009.
- BUND e.V.** (Hg.) 2021a: Höchste Zeit, Nanomaterialien zu regulieren! Ob in Lebensmitteln, Verpackungen, Textilien, Düngemitteln, Autozubehör oder Kosmetika - Nanomaterialien werden bereits in zahlreichen Produkten des alltäglichen Gebrauchs eingesetzt. Dabei sind die Risiken noch nicht hinreichend erforscht. Online: <https://www.bund.net>.
- BUND e.V.** (Hg.) 2021b: Nanoprodukt Datenbank nanowatch: Wer sucht, der findet. Online: <https://www.bund.net>.
- Bundesinstitut für Risikobewertung** (Hg.) 2012: Fragen und Antworten zur Nanotechnologie. Aktualisierte FAQ vom 28. August 2012.
- Burnett M E et Wang S Q** 2011: Current sunscreen controversies: a critical review. In: *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 27, 58–67.
- Butler K S; Peeler D J; Casey B J; Dair B J; Elespuru R K** 2015: Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. In: *Mutagenesis* 30, 577–91.
- Butz T; Reinert T; Pinheiro T; Moretto P; Pallon J; Arpad et al.** 2007: Quality of Skin as a Barrier to ultra-fine Particles. Final Report. Hg. v. NANODERM Project.
- Chen T; Yan J; Li Y** 2014: Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. In: *J. Food Drug Anal.* 22, 95–104.
- Christophers E; Ständer M; Wüste K** 2003: Haut- und Geschlechtskrankheiten. 7. Aufl. Urban & Fischer, München.
- Collins A R** 2004: The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. In: *Mol. Biotechnol.* 26, 249–61.
- Cross S E; Innes B; Roberts M S; Tsuzuki T; Robertson T A; McCormick P** 2007: Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. In: *Skin Pharmacol. Physiol.* 20, 148–54.
- Cyrys J; Wichmann H-E; Ruckerl R; Peters A** 2018: Umweltzonen in Deutschland. Probates Mittel zur Einhaltung geltender Luftqualitätsstandards? In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 61, 645–55.
- De Souza; Colin P C; Osmani S A** 2007: Mitosis, not just open or closed. In: *Eukaryot. Cell* 6, 1521–27.

- Di Bucchianico S; Cappellini F; Le Bihanic F; Zhang Y; Dreij K; Karlsson H L** 2017: Genotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. In: *Mutagenesis* 32, 127–37.
- Dizaj S M; Lotfipour F; Barzegar-Jalali M; Zarrintan M H; Adibkia K** 2014: Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. In: *Mater. Sci. Eng. C*. 44, 278–84.
- Donaldson K; Stone V; Tran C L; Kreyling W; Borm P J A** 2004: Nanotoxicology. In: *Occup. Environ. Med.* 61, 727–28.
- Drexler K E** 1981: Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5275–78.
- DTU Environ.; Dan. Ecol. Counc.; Dan. ConsR. Counc.** (Hg.) 2021: The Nano-Database. Inventory for products that contain Nanomaterials. Your inventory for products that contain Nanomaterials. Online: <https://nanodb.dk>
- Erhardt D** 2003: Materials conservation: Not-so-new technology. In: *Nat. Mat.* 2, 509–10.
- Europäisches Parlament; Europäischer Rat** (Hg.) 2009: Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel, Brüssel/Straßburg (Amtsblatt der Europäischen Union).
- Europäisches Parlament; Europäischer Rat** (Hg.) 2011: Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission, Brüssel/Straßburg (Amtsblatt der Europäischen Union).
- Ferraro D; Anselmi-Tamburini U; Tredici I G; Ricci V; Sommi P** 2016: Overestimation of nanoparticles-induced DNA damage determined by the comet assay. In: *Nanotoxicology* 10, 861–70.
- Feynman R P** 1960: There´s Plenty of Room at the Bottom. An Invitation to enter a new field of physics. In: *Engr. Sci. Mag.* 23, 890–905.
- Filipe P; Silva J N; Silva R; Cirne de Castro J L; Marques Gomes M; Alves L C et al.** 2009: Stratum corneum is an effective barrier to TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. In: *Skin Pharmacol. Physiol.* 22, 266–75.

- Freestone I; Meeks N; Sax M; Higgitt C** 2007: The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. In: *Gold Bull* 40 (4), 270–77.
- Friedberg E C** 2003: DNA damage and repair. In: *Nature; Int. J. Sci.* 421, 436–40.
- Fujii M; Yamanouchi S; Hori N; Iwanaga N; Kawaguchi N; Matsumoto M** 1997: Evaluation of Yucatan micropig skin for use as an in vitro model for skin permeation study. In: *Biol. Pharm. Bull.* 20, 249–54.
- Gao H; Shi W; Freund L B** 2005: Mechanics of receptor-mediated endocytosis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 9469–74.
- Ge W; Zhao Y; Lai F-N; Liu J-C; Sun Y-C; Wang J-J et al.** 2017: Cutaneous applied nano-ZnO reduce the ability of hair follicle stem cells to differentiate. In: *Nanotoxicology* 11, 465–74.
- Generalov R; Kuan W B; Chen W; Kristensen S; Juzenas P** 2015: Radiosensitizing effect of zinc oxide and silica nanocomposites on cancer cells. In: *Colloids Surf. B, Biointerfaces* 129, 79–86.
- George J M; Magogotya M; Vetten M A; Buys A V; Gulumian M** 2017: From the Cover: An Investigation of the Genotoxicity and Interference of Gold Nanoparticles in Commonly Used In Vitro Mutagenicity and Genotoxicity Assays. In: *Toxicol. Sci.* 156, 149–66.
- Greßler S; Gazso A; Simkó M; Fiedeler U; Nentwich M**: Nanotechnologie in Kosmetika. In: *NanoTrust Dossier* 008, 1–5.
- Greulich C; Diendorf J; Simon T; Eggeler G; Epple M; Köller M** 2011: Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. In: *Acta Biomater.* 7, 347–54.
- 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). In: *Langenbeck's Arch. Surg.* 394, 495–502.
- Grimes B R; Steiner C M; Merfeld-Clauss S; Traktuev D O; Smith D; Reese A et al.** 2009: Interphase FISH demonstrates that human adipose stromal cells maintain a high level of genomic stability in long-term culture. In: *Stem Cells Dev.* 18, 717–24.
- Hackenberg S** 2010a: Zinc oxide nanoparticles induce photocatalytic cell death in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines in vitro. In: *Int. J. Oncol.* 37, 1583–90.
- Hackenberg S** 2014a: Risikobewertung von Nanopartikeln in Konsumgütern. In: *HNO* 62, 432–38.
- Hackenberg S; Friehs G; Froelich K; Ginzkey C; Koehler C; Scherzed A et al.** 2010b: Intracellular distribution, geno- and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. In: *Toxicol. Lett.* 195, 9–14.

- Hackenberg S; Friehs G; Kessler M; Froelich K; Ginzkey C; Koehler C et al.** 2011a: Nanosized titanium dioxide particles do not induce DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 264–68.
- Hackenberg S; Scherzed A; Gohla A; Technau A; Froelich K; Ginzkey C et al.** 2014b: Nanoparticle-induced photocatalytic head and neck squamous cell carcinoma cell death is associated with autophagy. In: *Nanomedicine* 9, 21–33.
- Hackenberg S; Scherzed A; Kessler M; Hummel S; Technau A; Froelich K et al.** 2011b: Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. In: *Toxicol. Lett.* 201, 27–33.
- Hackenberg S; Scherzed A; Technau A; Froelich K; Hagen R; Kleinsasser N** 2013: Functional Responses of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells to Metal Oxide Nanoparticles *In Vitro*. In: *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 86–95.
- Hackenberg S; Scherzed A; Technau A; Kessler M; Froelich K; Ginzkey C et al.** 2011c: Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. In: *Toxicol. In Vitro* 25, 657–63.
- Hackenberg S; Scherzed A; Zapp A; Radeloff K; Ginzkey C; Gehrke T et al.** 2017: Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in nasal mucosa cells are antagonized by titanium dioxide nanoparticles. In: *Mutat. Res.* 816-817, 32–37.
- Hackenberg S; Zimmermann F-Z; Scherzed A; Friehs G; Froelich K; Ginzkey C et al.** 2011d: Repetitive exposure to zinc oxide nanoparticles induces dna damage in human nasal mucosa mini organ cultures. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 582–89.
- Holder A L; Goth-Goldstein R; Lucas D; Koshland C P** 2012: Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. In: *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1885–92.
- Hong H; Wang F; Zhang Y; Graves S A; Eddine, Savo Bou Zein; Yang Y et al.** 2015: Red fluorescent zinc oxide nanoparticle: a novel platform for cancer targeting. In: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 3373–81.
- Hoshyar N; Gray S; Han H; Bao G** 2016: The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. In: *Nanomedicine* 11, 673–92.
- Ickrath P; Wagner M; Scherzad A; Gehrke T; Burghartz M; Hagen R et al.** 2017: Time-Dependent Toxic and Genotoxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticles after Long-Term and Repetitive Exposure to Human Mesenchymal Stem Cells. In: *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 1–13.

- Jadoul A; Bouwstra J; Pr at V** 1999: Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35, 89–105.
- Jensen U B; Lowell S; Watt F M** 1999: The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. In: *Development* 126, 2409–18.
- Jin S-E et Jin H-E** 2021: Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nano/Microparticles and Their Combinations against Pathogenic Microorganisms for Biomedical Applications: From Physicochemical Characteristics to Pharmacological Aspects. In: *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 11, 263.
- Jud C; Clift M JD; Petri-Fink A; Rothen-Rutishauser B** 2013: Nanomaterials and the human lung. What is known and what must be deciphered to realise their potential advantages? In: *Swiss. Med. Wkly.* 143, 1–20.
- Karlsson H L; Di Bucchianico S; Collins A R; Dusinska M** 2015: Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? In: *Environ. Mol. Mutagen.* 56, 82–96.
- Kazimirova A; Baranokova M; Staruchova M; Drlickova M; Volkovova K; Dusinska M** 2019: Titanium dioxide nanoparticles tested for genotoxicity with the comet and micronucleus assays in vitro, ex vivo and in vivo. In: *Mutat. Res.* 843, 57–65.
- Khan S T; Ahamed M; Al-Khedhairi A; Musarrat J** 2013: Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. In: *Mater. Lett.* 97, 67–70.
- Kiel J** 2020: Nanomaterialien und Nanotechnologie. Gesetzliche Regelungen. Hg. v. Kinderumwelt gemeinnutzige GmbH. Online: [www.allum.de](http://www.allum.de).
- Kleinsasser N** 2004: Toxikologische Bewertung von Inhalationsnoxen: Testmethoden, Einschätzung der toxischen Wirksamkeit und des Gefahrenpotenzials, Grenzwerte. In: *Laryngorhinootologie* 83, 53.
- Klingshirn C; Grundmann M; Hoffmann A; Meyer B; Waag A** 2006: Zinkoxid—ein neuer, alter Halbleiter. Neue Wachstumsmethoden für Nanostrukturen und Hoffnung auf Anwendungen in der Elektronik haben zu einer stürmischen Renaissance geführt. In: *Phys. J.* 5, 33–39.
- Kołodziejczak-Radzimska A et Jesionowski T** 2014: Zinc Oxide—From Synthesis to Application. A Review. In: *Materials* 7, 2833–81.
- Kouchesfehani H M; Kiani S; Rostami A A; Fakheri R** 2013: Cytotoxic Effect of Iron Oxide Nanoparticles on Mouse Embryonic Stem Cells by MTT Assay. In: *Iran. J. Toxicol.* 7, 849–53.
- Kroll A; Dierker C; Rommel C; Hahn D; Wohlleben W; Schulze-Isfort C et al.** 2011: Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. In: *Part. Fibre Toxicol.* 8, 1–19.

- Kroll A; Pillukat M H; Hahn D; Schnekenburger J** 2009: Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 370–77.
- Kroll A; Pillukat M H; Hahn D; Schnekenburger J** 2012: Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. In: *Arch. Toxicol.* 86, 1123–36.
- Krug H F; Groteklaes M; Weber-Mußmann A** 2016: Zinkoxid. Hg. v. F. Böckler, B. Dill, U. Dingerdissen, G. Eisenbrand, F. Faupel, B. Fugmann, et al. Thieme Gruppe. Online: <https://roempp.thieme.de>.
- Kumar P; Morawska L; Birmili W; Paasonen P; Hu M; Kulmala M et al.** 2014: Ultrafine particles in cities. In: *Environ. Int.* 66, 1–10.
- Kumar P; Nagarajan A; Uchil P D** 2018: Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. In: *Cold Spring Harb. Prot.* 6, 469–72.
- Kumaravel T S; Vilhar B; Faux S P; Jha A N** 2009: Comet Assay measurements: a perspective. In: *Cell Biol. Toxicol.* 25, 53–64.
- Kwon J Y; Koedrith P; Seo Y R** 2014: Current investigations into the genotoxicity of zinc oxide and silica nanoparticles in mammalian models in vitro and in vivo: carcinogenic/genotoxic potential, relevant mechanisms and biomarkers, artifacts, and limitations. In: *Int. J. nanomed.* 9, 271–86.
- Larese F F; D'Agostin F; Crosera M; Adami G; Renzi N; Bovenzi M; Maina G** 2009: Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. In: *Toxicology* 255, 33–37.
- Lauterwasser C** 2005: Small sizes that matters: Opportunities and risks of nanotechnologies. Report in Co-operation with the OECD International Futures Programme. Unter Mitarbeit von Allianz AG; OECD. Hg. v. Allianz Center for Technology, Ismaning, Deutschland.
- Lavker R M et Sun T T** 1983: Epidermal stem cells. In: *J. Investig. Dermatol.* 81, 121–27.
- Lillie R D** 2009: Various Oil Soluble Dyes as Pat Stains in the Supersaturated Isopropanol Technic. In: *Stain Technol.* 19, 55–58.
- Lin Z; Monteiro-Riviere N A; Riviere J E** 2015: Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. In: *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 7, 189–217.
- Liu J; Feng X; Wei L; Chen L; Song B; Shao L** 2016: The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles. In: *Crit. Rev Toxicol.* 46, 348–84.
- Lupu A R et Popescu T** 2013: The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO<sub>2</sub> nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. In: *Toxicol. In Vitro* 27, 1445–50.
- Magdolenova Z; Collins A; Kumar A; Dhawan A; Stone V; Dusinska M** 2014: Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. In: *Nanotoxicology* 8, 233–78.

- McKelvey-Martin V J; Green MHL; Schmezer P; Pool-Zobel B L; Meo M P de; Collins A** 1993: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. In: *Mut. Res.* 288, 47–63.
- McNeil S E** 2011: Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. *Methods in Molecular Biology. Challenges for nanoparticle characterization* Humana Press 697.
- Melnik A V et Shagalina O V** 2011: History of nanotechnology. Siberian Federal University. Online: <http://elib.sfu-kras.ru>, zuletzt geprüft am 22.03.2021.
- Mika et al.** 2009: Study on penetration of titanium dioxid (TiO) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. In: *J. Toxicol. Sci.* 35, 107–13.
- Miyazaki K et Islam N** 2007: Nanotechnology systems of innovation—An analysis of industry and academia research activities. In: *Technovation* 27, 661–75.
- Mohammed Y; Barkauskas D; Holmes A; Grice J; Roberts M** 2020: Noninvasive in vivo human multiphoton microscopy: a key method in proving nanoparticulate zinc oxide sunscreen safety. In: *J. Biomed. Opt.* 25, 1–19.
- Møller P** 2018: The comet assay: ready for 30 more years. In: *Mutagenesis*.
- Moratin H; Scherzad A; Gehrke T; Ickrath P; Radeloff K; Kleinsasser N; Hackenberg S** 2018: Toxicological characterization of ZnO nanoparticles in malignant and non-malignant cells. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 59, 247–59.
- Mosmann T** 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mozaffarieh M; Schoetzau A; Sauter M; Grieshaber M; Orgül S; Golubnitschaja O; Flammer J** 2008: Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. In: *Mol. Vis.* 14, 1584–88.
- National Science and Technology Council; Committee on Technology; Subcommittee on Nanoscale Science, Engineering and Technology** (Hg.) 2014: National Nanotechnology Initiative. Strategic Plan. Unter Mitarbeit von Kalil T; Paris R; Carim A H; Whitman L J; Fadel T R. National Science and Technology Center Washington, USA.
- Nohynek G J; Lademann J; Ribaud C; Roberts M S** 2007: Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. In: *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 251–77.
- Nowack B; Krug H F; Height M** 2011: 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. In: *Environ. Sci. Technol.* 45, 1177–83.
- Oberdörster G; Oberdörster E; Oberdörster J** 2005: Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. In: *Environ. Health Perspect.* 113, 823–39.

- Oberdörster G; Stone V; Donaldson K** 2009: Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. In: *Nanotoxicology* 1, 2–25.
- Ochekpe N A; Olorunfemi P O; Ngwuluka N C** 2009: Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. In: *Trop. J. Pharm Res* 8 (3).
- Ochepke N; Olorunfemi P; Ngwulunka N** 2009: Nanotechnology and Drug Delivery. Part 1: Background and Applications. In: *Trop. J. Pharm. Res.* 8, 265–74.
- Olive P L** 1989: Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. In: *Radiat. Res.* 117, 79–92.
- Olive P L; Durand R E; Le Riche J; Olivotto I A; Jackson S M** 1993: Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. In: *Cancer Res.* 53, 733–36.
- Omni Life Sciences** (Hg.) 2018: Meet the Legend in cell-based research. *Broschüre CASY.*
- Orazizadeh M; Khodadadi A; Bayati V; Saremy S; Farasat M; Khorsandi L** 2015: In Vitro Toxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Rat Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. In: *Cell J.* 17, 412–21.
- Pan K et Zhong Q** 2016: Organic Nanoparticles in Foods: Fabrication, Characterization, and Utilization. In: *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 7, 245–66.
- Pan L; He Q; Liu J; Chen Y; Ma M; Zhang L; Shi J** 2012: Nuclear-targeted drug delivery of TAT peptide-conjugated monodisperse mesoporous silica nanoparticles. In: *J. Am. Chem. Soc.* 134, 5722–25.
- Pan L; Liu J; He Q; Wang L; Shi J** 2013: Overcoming multidrug resistance of cancer cells by direct intranuclear drug delivery using TAT-conjugated mesoporous silica nanoparticles. In: *Biomaterials* 34, 2719–30.
- Piccinno F; Gottschalk F; Seeger S; Nowack B** 2012: Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. In: *J. Nanopart. Res.* 14, 1–11.
- Qin H; Zhu C; An Z; Jiang Y; Zhao Y; Wang J et al.** 2014: Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human urine-derived stem cells at noncytotoxic concentrations. In: *Int. J. nanomed.* 9, 2469–78.
- Raab C; Simkó M; Fiedeler U.; Nentwich M; Gzásó A** 2008: Herstellungsverfahren von Nanopartikeln und Nanomaterialien. In: *NanoTrust Dossier* 006, 1–4.
- Reger R L et Wolfe M R** 2008: Freezing harvested hMSCs and recovery of hMSCs from frozen vials for subsequent expansion, analysis, and experimentation. In: *Meth. Mol. Biol.* 449, 109–16.
- Reinosa J J; Leret P; Álvarez-Docio C M; del Campo A; Fernández J F** 2016: Enhancement of UV absorption behavior in ZnO–TiO<sub>2</sub> composites. In: *Bol. Soc. Esp. Cerám.* V 55, 55–62.

- Roco M C** 1999: Towards a US National Nanotechnology Initiative. In: *J. Nanopar. Res.* 1, 435–38.
- Royal Society London; Royal Academy of Engineering** (Hg.) 2004: Nanoscience and nanotechnologies. Opportunities and uncertainties. Unter Mitarbeit von Clyvedon Press, Cardiff, UK; Latimer Trend Ltd, Plymouth, UK. Royal Society London.
- Sahoo S K; Parveen S; Panda J J** 2007: The present and future of nanotechnology in human health care. In: *Nanomed.-Nanotechnol.* 3, 20–31.
- Sahu D; Kannan G M; Vijayaraghavan R; Anand T; Khanum F** 2013: Nanosized zinc oxide induces toxicity in human lung cells. In: *ISRN Toxicol.*, 1–8.
- Sattler K D** 2010: Handbook of Nanophysics. Functional Nanomaterials CRC Press by Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Scherzad A; Meyer T; Kleinsasser N; Hackenberg S** 2017: Molecular Mechanisms of Zinc Oxide Nanoparticle-Induced Genotoxicity Short Running Title: Genotoxicity of ZnO NPs. In: *Mater.* 10.
- Sharma V; Anderson D; Dhawan A** 2012: Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). In: *Apoptosis* 17, 852–70.
- Sharma V; Shukla R K; Saxena N; Parmar D; Das M; Dhawan A** 2009: DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. In: *Toxicol. Lett.* 185, 211–18.
- Sharma V; Singh S K; Anderson D; Tobin D J; Dhawan A** 2011: Zinc oxide nanoparticle induced genotoxicity in primary human epidermal keratinocytes. In: *J. Nanosci. Nanotech.* 11, 3782–88.
- Singh N P; McCoy M T; Tice R R; Schneider E L** 1988: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. In: *Exp. Cell Res.* 175, 184–91.
- Singh S** 2019: Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. In: *Toxicol. Mech. Methods* 29, 300–11.
- Smith A** 2006: Nanotechnology: Lessons from Mother Nature. In: *Chem. Int.* 28, 10–11.
- Stepanenko A A et Dmitrenko V V** 2015: Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. In: *Gene* 574, 193–203.
- Tabari K; Hosseinpour S; Parashos P; Kardouni Khozestani P; Rahimi H M** 2017: Cytotoxicity of Selected Nanoparticles on Human Dental Pulp Stem Cells. In: *Iran. Endod. J.* 12, 137–42.

- Taccola L; Raffa V; Riggio C; Vittorio O; Iorio M C; Vanacore R et al.** 2011: Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells. In: *Int. J. Nanomedicine* 6, 1129–40.
- Tammam S N; Azzazy H M E; Lamprecht A** 2016: How successful is nuclear targeting by nanocarriers? In: *J. Control. Release* 229, 140–53.
- Tammam S N; Azzazy H M E; Lamprecht A** 2017: The effect of nanoparticle size and NLS density on nuclear targeting in cancer and normal cells; impaired nuclear import and aberrant nanoparticle intracellular trafficking in glioma. In: *J. Control. Release* 253, 30–36.
- Taniguchi N; Arakawa C; Kobayashi T** 1974: On the Basic Concept of Nanotechnology. Proceedings of the International Conference on Production Engineering. Japan Society of Precision Engineering (JSPE), Tokio, Japan, 26. August.
- Tice R R; Agurell E; Anderson D; Burlinson B; Hartmann A; Kobayashi H et al.** 2000: Single cell gel/comet assay. Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–21.
- Vance M E; Kuiken T; Vejerano E P; McGinnis S P; Hochella M F; Rejeski D; Hull M S** 2015: Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. In: *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–80.
- Vandebriel R J et Jong W H d** 2012: A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. In: *Nanotechnol. Sci. Appl.* 5, 61–71.
- Vilas-Boas V et Vinken M** 2021: Hepatotoxicity induced by nanomaterials: mechanisms and in vitro models. In: *Arch. Toxicol.* 95, 27–52.
- Von Kossa J** 1901: Ueber die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. Pharmakol. Institut der Budapester königl. ung. thierärzt. Hochschule.
- Wang C-C; Wang S; Xia Q; He W; Yin J-J; Fu P P; Li J-H** 2013: Phototoxicity of zinc oxide nanoparticles in HaCaT keratinocytes-generation of oxidative DNA damage during UVA and visible light irradiation. In: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13, 3880–88.
- Warheit D B; Webb T R; Sayes C M; Colvin V L; Reed K L** 2006: Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO<sub>2</sub> rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. In: *Toxicol. Sci.* 91, 227–36.
- Weyermann J; Lochmann D; Zimmer A** 2005: A practical note on the use of cytotoxicity assays. In: *Int. J. Pharm.* 288, 369–76.
- Wichmann H-E** 2008: Schützen Umweltzonen unsere Gesundheit oder sind sie unwirksam? Statusbericht. Helmholtz Zentrum München. Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Institut für Epidemiologie, Neuherberg.
- Wiesmann N; Tremel W; Brieger J** 2020: Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine. In: *J. Mater. Chem. B.* 8, 4973–89.

- Williams D** 2008: The relationship between biomaterials and nanotechnology. In: *Biomaterials* 29, 1737–38.
- Wölk H-J; Hagemeyer A; Großmann F** 2010: Zinkoxid-Kristallpartikel und Verfahren zu der Herstellung. Angemeldet durch Süd-Chemie AG, 80333 München. Veröffentlichungsnr: 10 2009 009 182.3.
- Xia Q; Huang J; Feng Q; Chen X; Liu X; Li X et al.** 2019: Size- and cell type-dependent cellular uptake, cytotoxicity and in vivo distribution of gold nanoparticles. In: *Int. J. nanomed.* 14, 6957–70.
- Xiong S; Tang Y; Ng H S; Zhao X; Jiang Z; Chen Z et al.** 2013: Specific surface area of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) particles influences cyto- and photo-toxicity. In: *Toxicology* 304, 132–40.
- Yadav A; Prasad V; Kathe A A; Raj S; Yadav D; Sundaramoorthy C; Vigneshwaran N** 2006: Functional finishing in cotton fabrics using zinc oxide nanoparticles. In: *Bull. Mater. Sci.* 29, 641–45.
- Yi C; Liu D; Fong C-C; Zhang J; Yang M** 2010: Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. In: *ACS nano* 4, 6439–48.
- Zhang S; Li J; Lykotrafitis G; Bao G; Suresh S** 2009: Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. In: *Adv. Mater.* 21, 419–24.
- Zhu W; Bartos P J M; Porro A** 2004: Application of nanotechnology in construction. In: *Mat. Struct.* 37, 649–58.
- Østling O et Johanson K J** 1984: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291–98.

## Appendix

## I. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen, Symbole und chemische Formeln

Abkürzung	Bedeutung
%TD	Prozentuale Tail-DNA
*	signifikant
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
Ag-NP	Silber-Nanopartikel
ASC	Adipogen-abgeleitete Stammzellen
ATP	Adenosintriphosphat
AuNP	Goldnanopartikel
BMSC	Primäre humanen aus dem Knochenmark entnommene mesenchymale Stammzellen
BSA	Bovines Serum Albumin
CeO <sub>2</sub>	Cerdioxid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoCr-NP	Kobalt-Chromium-Nanopartikel
CuO-NP	Kupferoxid-Nanopartikel
DMEM	Dulbecco modified Eagle's minimal essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMX	Dexamethason
DNA	Desoxyribonucleinacid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Expansionsmedium
EtOH	Ethanol
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
FA	Formaldehyd
FaDu	Plattenepithelkarzinom-Zellen
FCS	Fetal Calf Serum
HCl	Salzsäure
HFSC	Haarfollikel-Stammzellen
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IQR	Interquartile range (Interquartilabstand)
mA	Milliampere
MG	Molargewicht
mM	Millimolar
MMS	Methylmethansulfonat
MTT	Thiazolylblau (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NaPP	Natrium-Phosphatpuffer

## Appendix

Abkürzung	Bedeutung
Na-Thiosulfat	Natriumthiosulfat
NP	Nanopartikel
OTM	Olive-Tail-Moment
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
SiO <sub>2</sub>	Siliciumdioxid
tbHP	tert-Butylhydrogenperoxid
TD	Tail DANN
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
TiO <sub>2</sub> -NP	Titandioxid-Nanopartikel
TL	Tail Length
TRIS	Trishydroxymethyl-Aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
X	Mal
ZnO-NP	Zinkoxid-Nanopartikel
%TD	Prozentuale Tail-DNA

## II. Abbildungsverzeichnis

Für die Graphiken nicht eigener Anfertigungen liegen Druckerlaubnisse vom jeweiligen Verlag vor.

- Abb. 1:** Der Lykurgos-Becher, ein römisches Trink- gefäß, stammt aus dem 4. Jahr-hundert n. Chr. Durch die in das Glas eingebettete Nanopartikel wechselt der Becher bei Durch-leuchtung die Farbe. The British Museum, 1958, CC BY-NC-SA 4.0.
- Abb. 2:** Überblick über die Produktverteilung von Nanopartikeln, ZnO-NP rot markiert (*Piccinno et al. 2012*).
- Abb. 3:** Potenzielle Expositionswege bei dem zu erwartenden Gebrauch von Konsumprodukten, gruppiert anhand den führenden Nanomaterialien-Zusammensetzungen (*Vance et al. 2015*).
- Abb. 4:** Zinkoxid bildet diverse mehrdimensionale Strukturvariationen. In diesen liegen die vielfältigen physikalischen und chemischen Eigenschaften begründet: **(a)** blumenartig; **(b)** stangenförmig; **(c)** drahtartig (*Bitenc et al. 2010; Kołodziejczak-Radzimska et Jesionowski 2014; Xie et al. 2005*).
- Abb. 5:** In Sonnenschutzprodukten werden vor allem TiO<sub>2</sub>-NP und ZnO-NP als anorganische UV-Blocker verwendet (*eigene Abbildung*).
- Abb. 6:** Schematische Darstellung der industriellen Anwendung von ZnO-NP (*nach Kołodziejczak-Radzimska et Jesionowski 2014*).
- Abb. 7:** Die Epidermis gliedert sich in vier Schichten und wird durch die Basalmembran von der Dermis getrennt. Im Stratum basale sind die Stammzellen lokalisiert (*nach Baroni et al.*).
- Abb. 8:** Versuchsaufbau der zyto- und genotoxikologischen Analyse: Die hMSC wurden nativ sowie nach einwöchiger Andifferenzierung über 24 Stunden und repetitiv ZnO-NP ausgesetzt. Anschließend wurde der MTT-Test zum Nachweis von Zytotoxizität und der Comet Assay zum Nachweis von Genotoxizität durchgeführt (*eigene Abbildung*).
- Abb. 9:** Versuchsaufbau der elektronenmikroskopischen Analyse. Die hMSC wurden nach einer 24-stündigen Inkubation mit ZnO-NP über verschiedene Zeitintervalle von bis zu 6 Wochen kultiviert. Anschließend wurden von den Zellkulturen Gefrierschnitte angefertigt und diese durch Elektronenmikroskopie bezüglich einer zellulären Aufnahme und intrazellulären Distribution ausgewertet (*eigene Abbildung*).
- Abb. 10:** Versuchsaufbau MTT-Test, 96-Wellplatte nach Aussaat der hMSC mit den NP-Konzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10; 50 µg/ml sowie der Negativ- (neg.) und Positiv-Kontrolle (pos.) mit Parafilm (karierte Fläche) (*eigene Abbildung*).

- Abb. 11:** 6-Wellplatte des Comet Assay nach Aussaat der hMSC mit den nicht-zytotoxischen NP-Konzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10 µg/ml sowie der Negativ- und Positiv-Kontrolle mit Parafilm (karierte Fläche) (*eigene Abbildung*).
- Abb. 12:** Oil-Red-O-Färbung von adipogen andifferenzierten hMSC: Darstellung der Fettvakuolen rot bis orange (*eigene Abbildung*).
- Abb. 13:** Von-Kossa-Färbung der osteogen andifferenzierten hMSC: Darstellung der Kalzium-Ablagerungen innerhalb der Zellen zunächst schwarz und nach der Gegenfärbung mit Kernechtrot orange-rot (*eigene Abbildung*).
- Abb. 14:** Aufbau eines Boxplots nach Tukey (*eigene Abbildung*).
- Abb. 15:** Aufbau eines Punktdiagramms. Die einzelnen Werte einer ZnO-NP-Konzentration (x-Achse) werden jeweils leicht versetzt als Punkte (blau) und der Median als vertikale Linie (orange) dargestellt. Die y-Achse entspricht der Zellvitalität in % (*eigene Abbildung*).
- Abb. 16:** Vitalität der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) in Prozent nach 24 h Exposition mit Zinkoxid-Nanopartikeln. n = 8. Als Marker der Zellvitalität wurde der Negativ-Kontrolle der Referenzwert 100 % zugeordnet. 200 µM Tert-Butylhydroperoxid (tbHP) diente als Positiv-Kontrolle. Eine signifikante Abnahme der hMSC-Vitalität (%) konnte bei einer Konzentration von 50 µg/ml ZnO-NP beobachtet werden. \* = signifikant.
- Abb. 17:** Vitalität der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) in Prozent nach repetitiver Exposition mit Zinkoxid-Nanopartikeln. n = 8. Als Marker der Zellvitalität wurde der Negativ-Kontrolle der Referenzwert 100 % zugeordnet. 200 µM Tert-Butylhydroperoxid (tbHP) diente als Positiv-Kontrolle. Eine signifikante Abnahme der hMSC-Vitalität (%) konnte bei einer Konzentration von 1 und 10 µg/ml ZnO-NP beobachtet werden. \* = signifikant.
- Abb. 18:** Vitalität der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) nach **A)** osteogener und **B)** adipogener Andifferenzierung für eine Woche und 24 stündiger ZnO-NP-Exposition. n = 8. Bei der Negativ-Kontrolle wurde als Zellvitalität der Referenzwert 100 % festgelegt. 200 µM Tert-Butylhydroperoxid (tbHP) diente als Positiv-Kontrolle. Die Punkte im Diagramm spiegeln die einzelnen Werte der Zellvitalität wider. Der Median ist als schwarzer Balken dargestellt. Im Mann-Whitney-U-Test konnte keine signifikante Abnahme der Zellvitalität im Sinne von zytotoxischen Effekten nach einer Exposition von 0,01; 0,1; 1 und 10 µg/ml ZnO-NP nachgewiesen werden. \* = signifikant.
- Abb. 19:** OTM der hMSC nach 24-stündiger ZnO-NP-Exposition. 300 mM Methylmethansulfonat (MMS) diente als Positiv-Kontrolle. n=8. Ein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung zeigte sich bei den Konzentrationen 1 und 10 µg/ml ZnO-NP. \* = signifikant.

- Abb. 20:** OTM der hMSC nach repetitiver ZnO-NP-Exposition. 300 mM Methylmethansulfonat (MMS) diente als Positiv-Kontrolle. n=8. Die statistische Signifikanz wurde an einem p-Wert von < 0,05 in Abhängigkeit zur Kontrollgruppe gemessen. Es konnte kein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung nachgewiesen werden.
- Abb. 21:** TEM-Fotografie humaner mesenchymaler Stammzellen nach **(A)** 60-minütiger und **(B)** 180 min Exposition gegenüber 10 µg/ml ZnO-NP. **A:** Im Zytoplasma sind einzelne, aber auch zu kleineren Konglomeraten akkumulierte NP (Pfeile) nachweisbar. **B:** Es bilden sich zunehmend größere, frei im Zytoplasma liegende Konglomerate von Nanopartikeln (Pfeil). Solitäre Nanopartikel finden sich seltener. Jeweils 30.000-fache Vergrößerung.
- Abb. 22:** EM-Fotografie humaner mesenchymaler Stammzellen **(A)** eine Woche und **(B)** drei Wochen nach 24 stündiger Exposition gegenüber 10 µg/ml ZnO-NP. **A:** Vereinzelt konnte eine Penetration des Zellkerns durch solitäre aber auch kleiner Agglomerate vermutlich über die Kernporen in das Nukleoplasma beobachtet werden (Pfeil). **B:** Fortbestehende intrazelluläre Akkumulation in größeren Konglomeraten sowie Penetration der Zellorganelle wie Mitochondrien durch solitäre Nanopartikel oder kleinerer Konglomerate (Pfeil). Jeweils 30.000-fache Vergrößerung.
- Abb. 23:** Die größenabhängige zelluläre Aufnahme von NP (*Zhang et al. 2009*).
- Abb. 24:** Zell-Nuklei im Comet Assay nach DNA-Schadigungsgraden (*Silva et al. 2000*):

### III. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Verwendete Abkürzungen, Symbole und chemische Formeln

**Tabelle 2:** Verwendete Geräte und Bezugsfirma

**Tabelle 3:** Verwendete Materialien und Bezugsfirma

**Tabelle 4:** Verwendete Chemikalien und Bezugsfirma

**Tabelle 5:** Angesetzte Lösungen und Puffer

**Tabelle 6:** Angesetztes Nährmedium

**Tabelle 7:** Zusätze der adipogenen Andifferenzierung

**Tabelle 8:** Zusätze der osteogenen Andifferenzierung

**Tabelle 9:** Verwendete Software und Bezugsfirma

#### IV. Versuchsspezifische Labormaterialien

##### IV.I Laborgeräte

**Tabelle 2:** Verwendete Geräte und Bezugsfirma

Geräte	Firma und Ort
Accu- Jet <sup>R</sup> pro Pipettierhelfer	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland
Brutschrank (CO <sub>2</sub> Inkubator mit Heißluftsterilisation) CB210	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
CASY Cell Counter & Analyzer Systems TT	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator NU5500E	NuAire Inc., Plymouth, MA, USA
Edelstahl-Block	eigene Herstellung
Elektrophoresekammer 220 V-50 H	Renner, Dannstadt, Deutschland
Elektrophoresenetzgerät, EV 202	Consort, Turnhout, Belgien
Elisa Microplate Reader ELx800	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
Fluoreszenzlampen, ebq 100 ISOLATED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DM 4000B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop SFL 7000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Heizplatte, M6	CAT / M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Inkubationsschüttler New Brunswick E24R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Isopropanoltopf Cryo 1 % Freezing Container	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kryostat Leica GM 1510 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank (+4 °C)	Bosch, Stuttgart, Deutschland

Laborwasserbad HAAKE P10 mit Einhängethermostat	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Lichtmikroskop, Typ 473028	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle	Bauknecht, Schorndorf, Deutschland
MiniSpin Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Olympus MT 2 Lichtmikroskop	Olympus Optical Co.LTD, Shinjuku, Japan
pH-Meter	Wissenschaftliche-Technische Werkstätte, Weilheim in Oberbayern, Deutschland
Präzisionswaage H 110	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schüttelwasserbad HAAKE SWB25	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sterilwerkbank HERAsafe KS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Transmissionselektronenmikroskop JEM-2100	JOEL GmbH, Freising, Deutschland)
Ultra-Low Temperature Freezer (-80°C) New Brunswick	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator, Sonopuls HD 60	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
UV-Lampe	Desaga Uvis, Heidelberg, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein GmbH, Zürich, Schweiz
Zentrifuge 5415R Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## IV.II Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3:** Verwendete Materialien und Bezugsfirma

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Firma und Ort</b>
6-Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Alufolie	Cofresco Frischhalteprodukte, Minden, Deutschland
CASY Cups Messgefäße	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland

Cell Culture dishes, PS, 100 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CellStar Gewebekulturflasche, 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Mediscan GmbH & Co.KG, Kremsmünster, Österreich
Combitips plus 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cryomolds 4728 Durchmesser 23 mm	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Deckgläser (24 x 32 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einmalpipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated, NY, USA
Eppendorf-Tube 3810X 1,5 ml transparent	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tube, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kryoröhrchen Nalgene™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Küvette Typ Hellendahl, 16 Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Labor-Glasflasche 250 ml	Teqler®, Wecker, Luxemburg
Objektträger, geschnitten mit doppelseitigen Mattrand (26 x 76 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging Inc., Menasha, WI, USA
Pasteurpipetten (Glas) 5 ml, 10 ml, 20 ml	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen 0,5 ml- 10 µl	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG &Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml (braun/transparent)	Greiner Bio- One, Frickenhausen, Deutschland
Sensicare Ice Powderfree Nitrile Exam Gloves	Medline International France SAS, Chateaubriant, Frankreich
Tissue-Tek Cryomold 10 x 10 x 5 mm	Sakura Finetek Germany GmbH, Umkirch, Deutschland

### IV.III Reagenzien

**Tabelle 4:** Verwendete Chemikalien und Bezugsfirma

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma und Ort</b>
1,2-Propylenglycol (1,2-Propandiol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Agarose Typ I, normal melting point, medium elektroendosmotisch (MEEO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose Type II, low melting point (LMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aluminiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua bidestillata	eigene Herstellung
Aqua destillata	eigene Herstellung

## Appendix

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Cacodylsäure 50 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
CASYclean Kapillar- und Systemreiniger	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
CASYton isotone Salzlösung	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Collagenase P vom Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dexamethason 1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid 99,5 % (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Entellan Eindeckmittel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Epon 812	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Erythrozytenlysepuffer 1 x	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Ethanol (EtOH) ≥99,5 % Ph.Eur., reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid 20 µg/ml	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälber Serum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Formaldehyd 2 % (FA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glutaraldehyd (GA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung nach Mayer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin) 500 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Indomethacin 100 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Konservierer für Wasserbäder	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat 50 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (5M NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (30 %)	Serva, Heidelberg, Deutschland

Nuclear Fast Red	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oil-Red-O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Osmiumtetroxid 2 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (1000 U/1000 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10fach	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Propylenglycol 100 %	Fauth GmbH + Co. KG, Mannheim, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCL) 1 M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCL) 5 M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
tert-Butylhydrogenperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Thiazolylblau (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Umkirch, Deutschland
Trishydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,25 % 1x	Life Technologies Corporation by Gibco, Carlsbad, CA, USA
Uranylacetat	Science Services GmbH, München, Deutschland
Zinc oxide nanopowder < 100 nm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

#### **IV.IV Versuchsspezifische Lösungen, Puffer und Medien**

**Tabelle 5:** Angesetzte Lösungen und Puffer

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IMBX) Stammlösung 500 mM	0,5555 g IMBX, MG 222,2 g/mol 5 ml DMSO
Agaroselösung für die Objektträger-Beschichtung	1,5 g Normal-Melting-Point-Agarose 1,5 % 100 ml PBS 1 x
Agaroselösung für die Zellkultur	50 mg Low-Melting-Point-Agarose 0,5% 10 ml PBS 1 x

## Appendix

Cacodylatpuffer 50 mM (pH 7,2)	50 mM Cacodylsäure mit Aqua bidestillata und NaOH auf pH 7,2 einstellen
Dexamethason (DMX)- Stammlösung 1 mM	0,00393 g DMX, MG von 392,5 g/mol 10 ml 100% EtOH
Elektrophoresepuffer	10 ml EDTA-0,2 M-Stammlösung 120 ml 5 M NaOH Aqua bidestillata (auf 2 l auffüllen)
Ethidiumbromidfärbung	10 mg Ethidiumbromid 50 ml Aqua bidestillata
Indomethacin-Stammlösung 100 mM	0,03278 g Indomethacin, MG 327,8 g/mol 1 ml DMSO
Insulin Stammlösung 5 mg/ml	1 ml Insulin Solution 5 mg/ml 4 ml Aqua bidestillata
Kernechtrot-Lösung	5 g Aluminiumsulfat 100 ml Aqua bidestillata 0,1 % Nuclear Fast Red
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat- Stammlösung 50 mg/ml	2,5 g L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, MG 289,5 g/mol 50 ml Aqua bidestillata
Lysepuffer	67 ml (20 g) N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz 292,8 g NaCl 2,4 g TRIS 74,4 g EDTA 1,8 l Aqua bidestillata 5 M NaOH (pH 10) Aqua bidestillata (auf 2 l auffüllen)
Na-Thiosulfat-Lösung 5 %	5 g Natriumthiosulfat 100 ml Aqua bidestillata
Natriumphosphat-Puffer 0,1 M	8 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 405 ml Aqua bidestillata 16,3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 190 ml Aqua bidestillata 5 ml NaOH 1,5 l Aqua demineralisata
Oil-Red-O-Färbelösung 0,5 %	0,5 g Oil-Red O 100 ml Propylenglycol

## Appendix

Paraformaldehyd-Lösung 4 %	20 mg Paraformaldehyd 500 ml PBS (pH 7,4)
Phosphatgepufferte Salzlösung 1 % (pH 7,4)	PBS 10 % Aqua bidestillata (auf 1 :10)
Propylenglycol-Lösung 85 %	85 ml 100 % Propylenglycol 15 ml Aqua bidestillata
Saccharose-Lösung 30 %	30 g Saccharose 100 ml Aqua bidestillata
Silbernitrat -Lösung 1 %	1 g AgNO <sub>3</sub> 100 ml Aqua bidestillata
β-Glycerolphosphat-Stammlösung 1 M	2,16 g β-Glycerolphosphat, MG von 216 g/mol 10 ml Aqua bidestillata
TRIS-Neutralisationspuffer 0,4 M	97 g TRIS Aqua bidestillata (auffüllen auf 1,95 l) 10 M HCl (pH 7,5) Aqua bidestillata (auffüllen auf 2 l)
Triton-X-Lyselösung	0,75 ml Triton X-100 7,5 ml DMSO 99,5 % 66,75 ml Lysepuffer

**Tabelle 6:** Angesetztes Nährmedium

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
DMEM-Expansionsmedium (DMEM-EM)	DMEM-Nährlösung 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin

**Tabelle 7:** Zusätze der adipogenen Andifferenzierung

Zusätze in 25 ml DMEM-EM	Volumen
Dexamethason-Stammlösung 1 mM	25 µl
IBMX-Stammlösung 500 mM	25 µl
Indometacin-Stammlösung 100 mM	25 µl
Insulin-Stammlösung 5 mg/ml	25 µl

**Tabelle 8:** Zusätze der osteogenen Andifferenzierung

Zusätze in 50 ml DMEM-EM	Volumen
Dexamethason-Stammlösung 1 mM	50 µl
L-Ascorbinsäure-2-phosphat-Stammlösung 50 mg/ml	50 µl
β-Glycerophosphat-Stammlösung 1 M	50 µl

#### IV.V Software

**Tabelle 9:** Verwendete Software und Bezugsfirma

Software	Firma und Ort
Adobe Photoshop 2010	Adobe Inc., San José, CA, USA.
Citavi 6,0 Pro	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz.
GraphPad PRISM 6.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Comet 5.5	Kinetic Imaging, Liverpool, UK
IBM SPSS Statistics 26.0.0	IBM Corporation, Armonk, NY, USA
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA

## V. Curriculum vitae

**Persönliche Daten**

Name: **Martin Benjamin Ralf Wagner**  
 Geburtsdatum/-ort: [REDACTED] in Bergisch Gladbach

**Ausbildung**

03/2018 bis dato	<p><b>Klinikum Würzburg Mitte gGmbH</b></p> <p>Klinik für Chirurgie-Orthopädie, Unfall-&amp; Wiederherstellungschirurgie /Sportmedizin &amp; Sportverletzungen</p> <p>Assistenzarzt im Fachbereich Unfallchirurgie/Orthopädie; Assistentensprecher seit 03/2020          Leitung: Prof. Dr. Beck/ Dr. Seidenspinner</p>										
09/2016 bis 02/2018	<p><b>Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg</b></p> <p>Assistenzarzt im Fachbereich Orthopädie          Leitung: Prof. Dr. Rudert</p>										
10/2011 bis 06/2016	<p><b>Julius-Maximilians-Universität Würzburg</b></p> <p><u>Studiengang:</u> Humanmedizin – Klinischer Abschnitt</p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;">05/2016</td> <td><b>Ablegen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung</b></td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">01/2016 - 04/2016</td> <td><b>PJ Tertial Fachbereich Chirurgie,</b> Kantonsspital Münsterlingen, Schweiz</td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">09/2015 - 12/2015</td> <td><b>PJ Tertial Fachbereich Orthopädie,</b> König-Ludwig-Haus Würzburg</td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">05/2015 - 09/2015</td> <td><b>PJ Tertial Fachbereich Innere Medizin,</b> Juliussspital Würzburg</td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">05/2015</td> <td><b>Ablegen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung</b></td> </tr> </table>	05/2016	<b>Ablegen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung</b>	01/2016 - 04/2016	<b>PJ Tertial Fachbereich Chirurgie,</b> Kantonsspital Münsterlingen, Schweiz	09/2015 - 12/2015	<b>PJ Tertial Fachbereich Orthopädie,</b> König-Ludwig-Haus Würzburg	05/2015 - 09/2015	<b>PJ Tertial Fachbereich Innere Medizin,</b> Juliussspital Würzburg	05/2015	<b>Ablegen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung</b>
05/2016	<b>Ablegen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung</b>										
01/2016 - 04/2016	<b>PJ Tertial Fachbereich Chirurgie,</b> Kantonsspital Münsterlingen, Schweiz										
09/2015 - 12/2015	<b>PJ Tertial Fachbereich Orthopädie,</b> König-Ludwig-Haus Würzburg										
05/2015 - 09/2015	<b>PJ Tertial Fachbereich Innere Medizin,</b> Juliussspital Würzburg										
05/2015	<b>Ablegen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung</b>										

06/2013 **Beginn der Med. Promotion:** Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Universität Würzburg,

AG Univ.-Prof. Dr. Norbert Kleinsasser  
MHBA, experimentelle Doktorarbeit

Thema:

**Toxizität von Zinkoxid-Nanopartikeln  
in humanen mesenchymalen  
Stammzellen nach repetitiver  
Exposition und im Langzeitversuch**

09/2009 bis 07/2011

**Universität Pécs, Ungarn**

Studiengang: Humanmedizin - Vorklinischer Abschnitt

07/2011 **Ablegen des Ersten Abschnitts  
der Ärztlichen Prüfung**

09/2001 bis 07/2009

**Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Rösrath**

09/1999 bis 07/2001

**Max-Planck-Realschule Bretten**

## VI. Kongressbeiträge und Publikation

### VI.I Kongressbeiträge

- ❖ **Wagner M, Hackenberg S, Kleinsasser N, Hagen R (2014):** Toxizität von Zinkoxid Nanopartikeln in mesenchymalen Stammzellen nach repetitiver Exposition und im Langzeitversuch. Auf der 85. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e. V., Dortmund.
- ❖ **Wagner M, Hackenberg S, Kleinsasser N, Hagen R (2014):** Toxizität von Zinkoxid Nanopartikeln in mesenchymalen Stammzellen nach repetitiver Exposition und im Langzeitversuch. Auf dem 58. Österreichischen HNO-Kongress, Gmunden.
- ❖ **Wagner M, Hackenberg S, Kleinsasser N, Hagen R (2015):** Dynamik der zellulären Aufnahme von Zinkoxid-Nanopartikeln in humanen mesenchymalen Stammzellen. Auf der 86. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e. V., Berlin.

### VI.II Publikation

- ❖ **Ickrath P, Wagner M, Scherzad A, Gehrke T, Burghartz M, Hagen R, Radeloff K, Kleinsasser N, Hackenberg S 2017:** Time-Dependent Toxic and Genotoxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticles after Long-Term and Repetitive Exposure to Human Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, DOI: 10.3390/ijerph14121590.