

Aus der Abteilung für Experimentelle Pneumologie und Allergologie

Universitätsklinikum des Saarlandes

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Quoc Thai Dinh

**Systemische Aufnahme von unterschiedlich beschichteten
Gold-Nanopartikeln im Ovalbumin-Asthma-Modell unter
Berücksichtigung ihrer lokalen Wirkung auf die Atemwegs-
entzündung**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von:

Albert Joachim Omlor

geb. am: 10. April 1991 in Neunkirchen

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract.....	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Literaturübersicht.....	3
2.1.1	Bedeutung der Nanotechnologie.....	3
2.1.2	Naturwissenschaftliche Grundlagen	3
2.1.3	Bedeutung und Chancen der Nanotechnologie für die Pneumologie	5
2.1.4	Besonderheiten von Gold-Nanopartikeln	16
2.2	Ziele und Fragestellung	17
2.2.1	Intention der Arbeit.....	17
2.2.2	Studiendesign.....	18
3	MATERIAL UND METHODE	19
3.1	Nanopartikel-Zubereitung.....	19
3.1.1	Charakterisierung der verwendeten Gold-Nanopartikel	19
3.1.2	Zubereitung der unterschiedlichen Gold-Nanopartikelsuspensionen	19
3.1.3	Qualitätssicherung der hergestellten Nanopartikelsuspensionen.....	20
3.2	Versuchstiere	20
3.3	Versuchsaufbau.....	21
3.4	Lungenfunktionsmessung	24
3.5	Gewebepräparation	24
3.6	Lichtmikroskopie.....	25

3.6.1	Silanisierung der Objektträger für die lichtmikroskopische Auswertung....	25
3.6.2	Herstellung von Lungen-Kryoschnitten:.....	25
3.7	Histologische Färbungen	26
3.7.1	HE-Färbung:	26
3.7.2	PAS-Färbung:	26
3.7.3	Immunfluoreszenz.....	26
3.8	Bronchoalveolare Lavage	27
3.9	Elisa	27
3.10	Statistische Auswertung und verwendete Software.....	29
4	ERGEBNISSE	30
4.1	Nanopartikel-Zubereitung und -Applikation:	30
4.2	Das OVA-Asthma-Modell.....	33
4.3	BAL-Gesamtzellzahl	36
4.4	Messung der Atemwegsreaktivität	38
4.5	Histologischer Nachweis von Gold-Nanopartikeln.....	40
4.6	Aufnahme von Gold-Nanopartikeln in extrapulmonale Organe	42
5	DISKUSSION	45
5.1	Kritische Betrachtung dieser Arbeit im Vergleich mit bisherigen Publikationen ...	45
5.2	Ausblick.....	55
6	LITERATURVERZEICHNIS	56
7	PUBLIKATION	67
8	DANKSAGUNG.....	69

9	LEBENS LAUF	70
10	ANHANG	73

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Nanotechnologie eröffnet im klinischen Alltag neue Chancen, insbesondere auf den Gebieten der Drug Delivery und Hyperthermie. In die Atemwege applizierte Nanopartikel lösen lokale Reaktionen aus. Weil viele Nanopartikel auch die Blut-Luft-Schranke überwinden können, eröffnen sich hier neue Möglichkeiten in der systemischen Anwendung. Andererseits birgt dies auch die Gefahr potentieller Toxizität im Gesamtorganismus. Bislang gibt es noch wenig Erkenntnis darüber, wie die Nanopartikelaufnahme von vorbestehenden Lungenerkrankungen wie Asthma beeinflusst wird. In der hier vorgelegten Studie wurde bei BALB/c-Mäusen nach dem Ovalbumin-(OVA)-Asthma-Modell eine allergische Atemwegsentzündung hervorgerufen. Mit Polyethylenglykol(PEG)- sowie mit Zitronensäure/Tanninsäure(Zitrat)-beschichtete Gold-Nanopartikel mit 5 nm Durchmesser wurden intranasal bei Asthma- und Kontrollgruppen verabreicht. Als primäre Endpunkte der Studie wurden (i) Atemwegswiderstand und (ii) lokale Gewebsreaktionen bestimmt. Darüber hinaus wurde über Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma die Aufnahme der Gold-Nanopartikel in extrapulmonale Organe quantifiziert. Als Ergebnis konnte gezeigt werden, dass bei Asthma-Vorerkrankung die Nanopartikelaufnahme insgesamt steigt, und dass PEG-beschichtete Gold-Nanopartikel im Vergleich zu Zitrat-beschichteten Gold-Nanopartikeln in höherem Maße systemisch aufgenommen werden. Außerdem konnte demonstriert werden, dass die Nanopartikel, insbesondere die Zitrat-beschichteten, eine Reduktion von Entzündung und Atemwegshyperreagibilität bewirken. Obwohl Gold-Nanopartikel eine für die Asthmatherapie interessante antiinflammatorische Wirkung zu besitzen scheinen, müssen mögliche Nebenwirkungen durch systemische Aufnahme sorgfältig im Auge behalten werden.

1.2 Abstract

Nanotechnology is showing promise in many medical applications such as drug delivery and hyperthermia. Nanoparticles administered to the respiratory tract cause local reactions and cross the blood-air barrier, thereby providing a means for easy systemic administration but also a potential source of toxicity. Little is known about how these effects are influenced by pre-existing airway diseases such as asthma. Here, BALB/c mice are treated according to the OVA asthma protocol to promote allergic airway inflammation. Dispersions of PEGylated (polyethylene-glycol-coated) (PEGylated) and citrated (citrate/tannic-acid-coated) 5 nm gold nanoparticles are applied intranasally to asthma and control groups and (i) airway resistance and (ii) local tissue effects measured as primary endpoints. Further, nanoparticle uptake into extrapulmonary organs is quantified by inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The asthmatic precondition increases nanoparticle uptake. Moreover, systemic uptake is higher for PEGylated gold nanoparticles compared to citrated nanoparticles. Nanoparticles inhibit both inflammatory infiltrates and airway hyperreactivity, especially citrated gold nanoparticles. Although the anti-inflammatory effects of gold nanoparticles might be of therapeutic benefit, systemic uptake and consequent adverse effects must be considered when designing and testing nanoparticle-based asthma therapies. (Omlor et al., 2017)

2 Einleitung

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Bedeutung der Nanotechnologie

Nanotechnologie begegnet uns in immer mehr Bereichen des Alltags. Neben der technisch-industriellen Anwendung nimmt ihre Verwendung in Konsumprodukten wie beispielsweise in Kosmetika, Zahnpasta oder Sonnencreme immer mehr zu. Darüber hinaus gewinnt Nanotechnologie auch in der Medizin an Bedeutung. Man spricht von der sogenannten Nanomedizin.

Mit diesem Einzug der Nanotechnologie in die Medizin zeichnen sich auch Anwendungsmöglichkeiten in der Pneumologie ab. Klinisch werden Nanopartikel bisher schon therapeutisch bei onkologischen Patienten angewendet. Allerdings gibt es durchaus auch vielversprechende Ansätze zur Entwicklung von Therapeutika bei Tuberkulose, Lungenfibrose und Mukoviszidose. Auch in der Bildgebung der Atemorgane könnte Nanotechnologie zu Fortschritten führen (Omlor et al., 2015).

2.1.2 Naturwissenschaftliche Grundlagen

Man spricht von „Nano“, wenn eine Struktur in der Größe zwischen 1 nm und 100 nm liegt. Nanoobjekte müssen allerdings nicht in jeder Abmessung in diesem Bereich liegen, sondern nur in mindestens einer Dimension eine Nanostruktur aufweisen, die dann zu charakteristischen Eigenschaften führt. Anhand der Anzahl äußerer Dimensionen im Nanobereich (Abbildung 1) kann man zwischen Nanopartikeln, Nanofasern und Nanoschichten unterscheiden (Oberdorster et al., 2005).

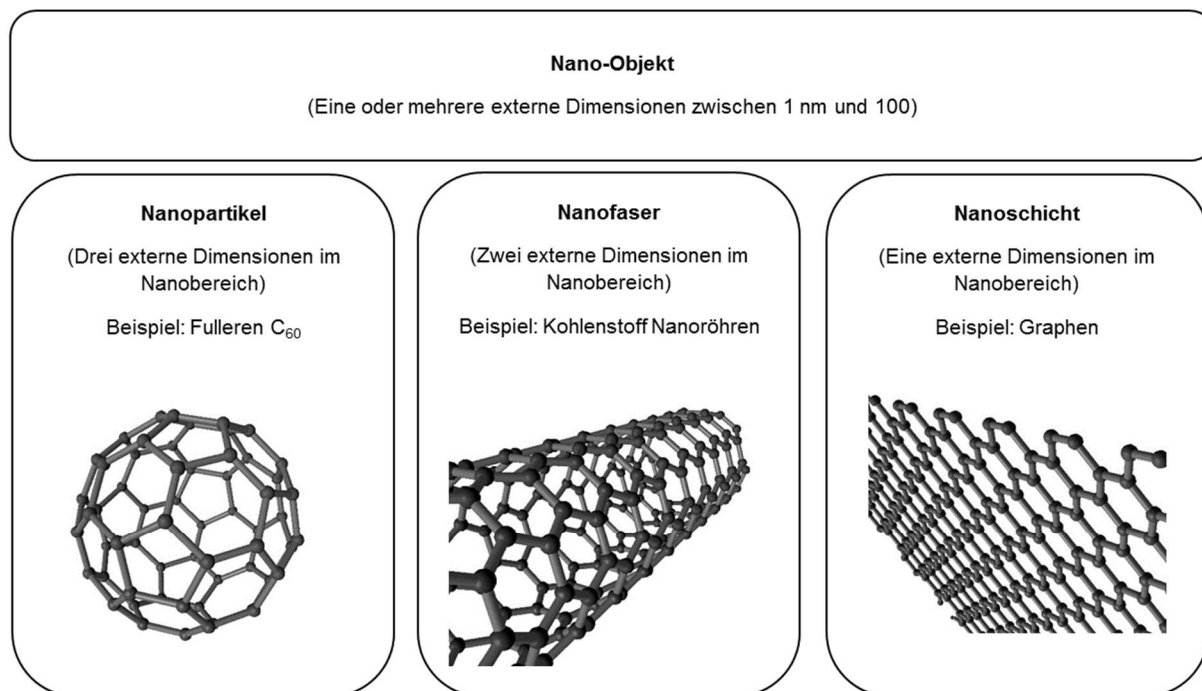


Abbildung 1: Unterscheidung von Nanoobjekten in Nanopartikel, Nanofasern und Nanoschichten anhand der Anzahl der äußeren Dimensionen im Bereich zwischen 1 nm und 100 nm (modifiziert nach Omlor et al., 2015, Respiratory Research).

Nanomaterialien unterscheiden sich in mehreren Aspekten grundlegend von herkömmlicher makroskopischer Materie.

Zum einen weisen Nanomaterialien eine außerordentlich hohe Oberfläche bezogen auf ihr Volumen auf. Dies führt zu einer hohen Reaktivität und ermöglicht nicht selten auch katalytische Eigenschaften (Burlaka et al., 2004; Haruta, 2003; Hutton et al., 2017; Raimondi et al., 2005).

Außerdem treten im Nanokosmos bestimmte Effekte auf, die bei vergleichbaren Stoffen mit makroskopischen Dimensionen nicht zu beobachten wären (Brown et al., 2008). Die Ursache für diese Größenabhängigkeit von physikalischen und chemischen Eigenschaften liegt darin begründet, dass mit abnehmender Größe die Gesetze der Quantenphysik zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass vor allem für toxikologische Untersuchungen mit Nanomaterialien nicht mehr nur Zusammensetzung und Dosis, sondern auch Struktur und Größe beachtet und quantifiziert werden müssen.

Eine weitere Eigenschaft, die man bei Nanomaterialien findet, ist die Fähigkeit, sich ähnlich wie biologische Systeme selbstorganisierend zu komplexeren Strukturen zusammenzufügen, eine Eigenschaft, die in Zukunft für die medizinische Anwendung genutzt werden könnte (Burkhard and Karch, 2017; Chen et al., 2011; Grzelczak et al., 2010).

Für die Eigenschaften von Nanopartikeln spielt die Oberflächenbeschichtung eine entscheidende Rolle. Viele Nanopartikel benötigen eine Beschichtung, die durch elektrostatische oder sterische Abstoßung einer Zusammenlagerung der Nanopartikel entgegenwirkt. Diese Beschichtung kann aus polyvalenten Ionen wie Zitrat aber auch aus größeren Polymeren wie PEG bestehen. Polymerbeschichtungen sind in der Regel stärker an die Nanopartikel gebunden und können diese besser stabilisieren (Romer et al., 2011; Tejamaya et al., 2012; Tolaymat et al., 2010). Die Oberflächenbeschichtung der Nanopartikel hat aber nicht nur eine große Bedeutung für das Agglomerationsverhalten. Auch die Bildung einer Proteincorona bei Kontakt der Nanopartikel mit Serumproteinen wird von der Oberflächenbeschaffenheit und Ladung beeinflusst (Braun et al., 2016; Nel et al., 2009; Walkey et al., 2012). Einiges deutet darauf hin, dass die so an die Nanopartikel gebundenen Proteine Interaktionen mit dem Organismus wie Verteilung, zelluläre Aufnahme und Ausscheidung maßgeblich bestimmen (Bewersdorff et al., 2017; Mazzolini et al., 2016; Ortega et al., 2017; Walkey et al., 2014). Auch in Bronchialsekret und Surfactant gibt es Proteine, welche an viele Nanopartikel mit hoher Affinität binden. Insbesondere bei Aufnahme von Nanopartikeln über den Atemtrakt könnte dies entscheidend für die weitere Interaktion der Nanopartikel im Körper sein (Whitwell et al., 2016).

2.1.3 Bedeutung und Chancen der Nanotechnologie für die Pneumologie

Klinische Anwendung von Nanotechnologie

Drug Delivery

Nano-basierte Ansätze bieten neue erfolgversprechende Optionen. Insbesondere bei der Behandlung von Tumoren sind diese auch in der klinischen Anwendung schon angekommen. So spielt Drug Delivery in der Tumorthherapie eine zunehmende Rolle (Wang et al., 2017).

Der große Vorteil von Nanopartikeln beim Transport von Wirkstoffen ist die sogenannte „Targeted Therapy“, also der gezielte Transport an den gewünschten Zielort. Man unterscheidet zwischen aktivem und passivem Targeting. Bei Tumoren können die aufgrund des schnellen Wachstums undichten und unreifen Gefäße ausgenutzt werden, um ein passives Targeting zu erreichen. So kommt es zur passiven Anreicherung von mit Zytostatika-beladenden Nano-

partikeln im Tumorgewebe, was man als EPR-Effekt (enhanced permeability and retention) bezeichnet (Hobbs et al., 1998). Ein Beispiel hierfür ist Genoxol-PM, eine Polymilchsäure-Block-Polyethylenglycol-Mizellenformulierung, welche mit Paclitaxel beladen ist (Sanna et al., 2014). Dieser Nanocarrier der ersten Generation wurde in einer Phase-II-Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) eingesetzt. 43 Patienten erhielten vier dreiwöchige Zyklen mit Genoxol-PM (230 mg/m^2) an Tag 1 kombiniert mit Gemcitabine (1000 mg/m^2) an Tag 1 und Tag 8. Mit einer Response-Rate von 46,5% zeigte die Therapie eine gute Antitumor-Aktivität bei gleichzeitig geringer Übelkeitsentwicklung. Allerdings kam es unter der Therapie häufig zu Neutropenien und Pneumonien (Ahn et al., 2014).

Die zweite Generation von Nanocarriern besitzt Liganden für aktives Targeting. Bei diesen Liganden handelt es sich zum Beispiel um Antikörper, Aptamere, small molecules oder Proteine, welche mit den Nanopartikeln verknüpft sind und an spezifischen Strukturen am Zielort binden (Abbildung 2). Aptamere sind synthetische Oligonucleotide, welche mit ähnlich hohen Bindungskonstanten wie Antikörper an bestimmte Epitope binden können (Tang et al., 2017). Small molecules sind niedermolekulare organische Verbindungen (Leeson and Springthorpe, 2007) wie zum Beispiel Folsäure, für welche die Zielzelle eine erhöhte Rezeptordichte aufweist. Das gleiche Prinzip trifft auch für Proteine wie Transferrin zu, für welche manche Tumore vermehrt Rezeptoren exprimieren (Yu et al., 2010).

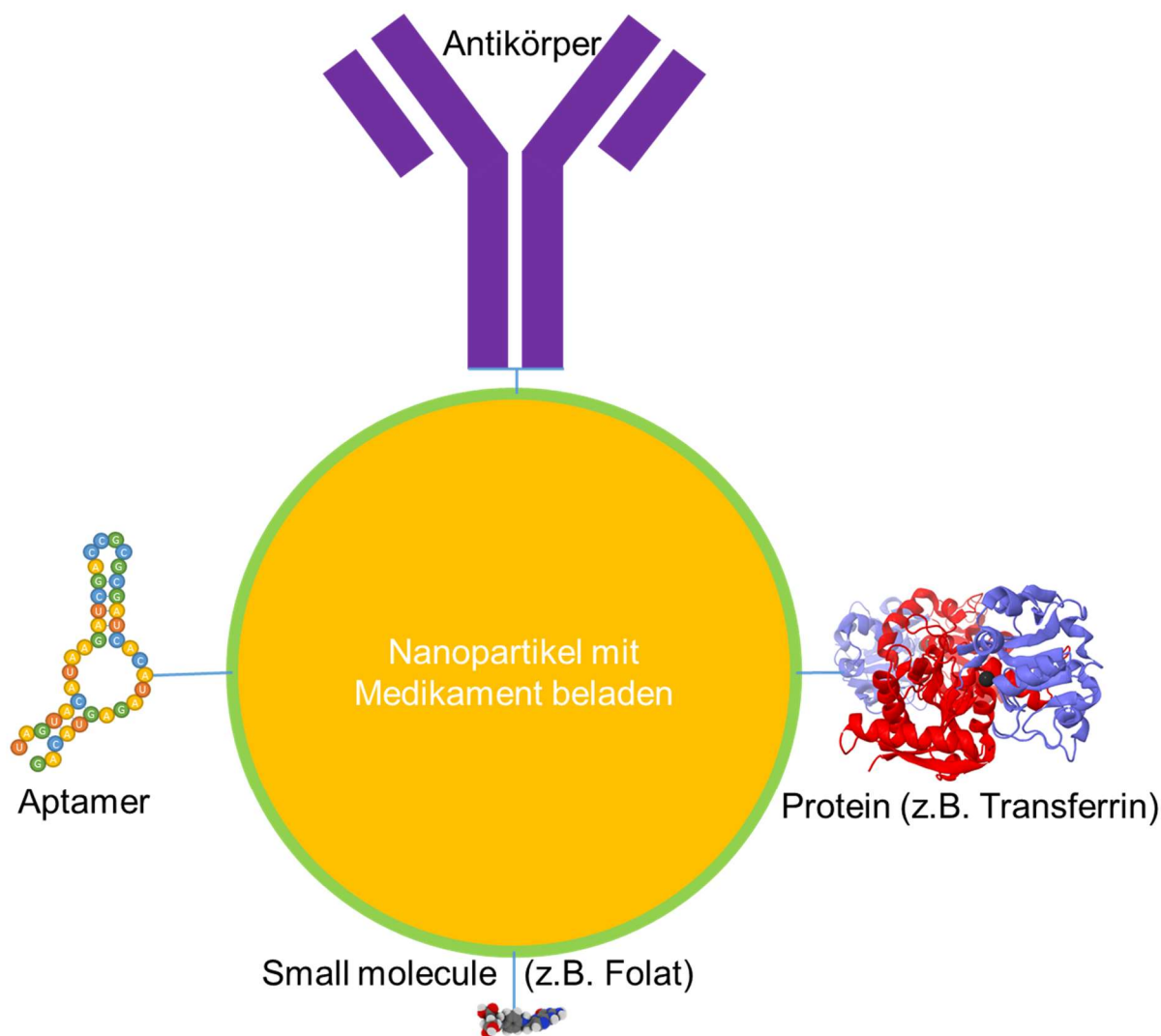


Abbildung 2: Verschiedene Strategien des aktiven Targetings bei Nanocarriern der zweiten Generation über Konjugation mit bestimmten Liganden (Antikörper, Aptamere, Proteine oder small molecules), welche spezifisch an Tumorzellen binden können (modifiziert nach Omlor et al., 2015, Respiratory Research).

In all diesen Fällen bewirkt eine spezifische Bindung des Liganden eine aktive Anreicherung der Ligand-Nanopartikel-Konjugate im Tumorgewebe. Viele in der Krebstherapie häufig eingesetzte Antikörper gegen oberflächliche Rezeptoren auf Tumorzellen können mit Nanopartikeln verknüpft werden. So wurden im Tiermodell Polyglycolsäure-Nanopartikel mit Cetuximab konjugiert und mit Paclitaxelpalmitat beladen. Nach intravenöser Applikation bei Mäusen mit A549-luc-C8-Lungenkarzinom konnte eine signifikante Reduktion der Gesamt mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Karra et al., 2013).

Auch klinisch werden Nanocarrier der zweiten Generation schon eingesetzt. Aurimmune Cyt-6091 wurde in einer Phase-I-Studie bei Patienten mit Adenokarzinom der Lunge verwendet. Es handelt sich um PEG-beschichtete Gold-Nanopartikel mit TNF- α -Beladung. Das mit den Nanopartikeln verbundene TNF- α führt hierbei sowohl zur aktiven Anreicherung im Tumorgewebe als auch zu einem therapeutischen Effekt auf die Tumorgefäße. Der Vorteil im Ver-

gleich zur Applikation von nicht-Nanopartikel-gebundenem TNF- α liegt in der deutlich besseren Verträglichkeit sowie in der Möglichkeit höherer Dosierungen (Libutti et al., 2010). Ein weiteres klinisch eingesetztes Drug-Delivery-System der zweiten Generation ist Bind-014, welches in einer Phase-II Studie bei NSCLC getestet wurde. Bind-014 Nanopartikel bestehen aus einem Kern aus Polymilchsäure, in welchem das Zytostatikum Docetaxel eingeschlossen ist. Die Oberfläche der Partikel ist mit PEG beschichtet und besitzt Liganden gegen PMSA (prostate-specific membrane antigen), welches in Prostatakarzinomen aber auch in den Tumorgefäßen anderer solider Tumore wie NSCLC exprimiert wird (Hrkach et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Bind-014 klinisch aktiv und gut verträglich ist. Nebenwirkungen wie Anämie, Neutropenie und Neuropathie waren im Vergleich zur herkömmlichen Docetaxeltherapie signifikant reduziert. Auch bei Patienten mit KRAS-Mutationen, bei denen herkömmliche Therapieansätze oft scheitern, zeigte Bind-014 positive Effekte (Natale et al.).

Gentherapie:

Vielversprechende Behandlungsansätze zeichnen sich auch im Bereich der Gentherapie von Lungenerkrankungen ab. Streng genommen handelt es sich hierbei auch um eine besondere Form der drug delivery. Jedoch liegt hier der Fokus nicht auf der Optimierung der Verteilung im Körper, sondern auf der Verbesserung des Transports von Stoffen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle. So haben Nanopartikel als DNA-Vektoren im Vergleich zu Viren einige Vorteile. Sie sind weniger immunogen und haben eine höhere Transportkapazität (Bishop et al., 2015; Mar Encabo-Berzosa et al., 2017).

So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass DNA-beladene Polyethylenimin-Nanopartikel zur Therapie eines mit Lipopolysaccharid ausgelösten akuten Lungenversagens verwendet werden können. Nach intravenöser Injektion der Nanopartikel führten die darin enthaltenen Beta2-Rezeptorgene zu einer vorübergehenden Transgenexpression in den Alveolarepithelzellen. Dies führte zu einer signifikanten Verbesserung der Symptome, was sich in der Lungenhistologie, der BAL und den Zytokinen widerspiegelte (Lin et al., 2013).

In einer weiteren Studie konnte die inhalative Behandlung mit DNA-beladenen Poly(lactid-co-glycolid)-Nanopartikeln eine Hochregulierung des Erythropoetin-Rezeptors auf den Lungenepithelien bewirken. Dadurch kam es zu einer Reduktion von Hypoxie-induzierten Apoptosen bei Lungenschädigungen (Ravikumar et al., 2016).

Auch bei der Behandlung von Mukoviszidose sind DNA-beladene Nanopartikel vielversprechende Kandidaten für zukünftige Therapien. So konnte in einer klinischen Studie gezeigt

werden, dass die nasale Nanopartikelgabe sicher und effektiv ist und auch zum gewünschten Gentransfer führt (Konstan et al., 2004). Ein großes Problem solcher Nanopartikelbehandlungen ist die Überwindung der Schleimbarrieren. Es konnte jedoch in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass PEG-beschichtete DNA-Nanopartikel Atemwegs-Mukus schnell durchwandern können. Dabei verbesserte die PEG-Beschichtung auch den Gentransfer im Vergleich zu anderen Carriern (Suk et al., 2014).

Hyperthermiebehandlung:

Ein weiteres vielversprechendes Anwendungsgebiet von Nanopartikeln in der Pneumologie ist die Hyperthermiebehandlung. Ziel ist die lokale Zerstörung von Tumorzellen durch Hitze. Im Tumorgewebe akkumulierte Nanopartikel dienen der Hitzeerzeugung. Hierbei gibt es zwei Strategien (Abbildung 3):

In der magnetischen Hyperthermie erzeugt eine in der Nähe des Körpers gelegene Spule ein alternierendes Magnetfeld, welches zur Erwärmung von magnetischen Nanopartikeln im Tumor führt (Datta et al., 2016; Dutz and Hergt, 2014; Hergt et al., 1998; Pankhurst et al., 2009). Wie bei der drug delivery spielt auch hier das Targeting eine entscheidende Rolle. So konnte in einem NSCLC-Mausmodell gezeigt werden, dass magnetische Nanopartikel, welche mit einem EGFR-Liganden (epidermal growth factor receptor) gekoppelt sind, nach Hyperthermiebehandlung eine deutlich bessere Tumorschrumpfung bewirkten als entsprechende Nanopartikel ohne aktives Targeting. In diesem Modell wurden die Tumormäuse inhalativ mit supraparamagnetischen Eisennanopartikeln behandelt und anschließend einer magnetischen Hyperthermiebehandlung ausgesetzt (Sadhukha et al., 2013).

Die zweite Möglichkeit, über Nanopartikel eine lokale Hyperthermie zu induzieren, ist die fothermische Therapie. Hierbei wird sichtbare oder infrarote Laserstrahlung von fotoaktiven Nanopartikeln wie Graphen oder Gold-Nanopartikeln in Hitze umgewandelt (Hirsch et al., 2003; Huang et al., 2006a; Huang et al., 2006b; Loo et al., 2004; Perez-Hernandez et al., 2015; Tran et al., 2017). Inzwischen steht zur Tumorbehandlung ein kommerzielles Produkt namens Auroshell zur Verfügung. Dieses Medikament besteht aus Silikat-Nanopartikeln, die von einer dünnen Schicht aus Gold umgeben sind (Morton et al., 2010; Stern et al., 2015).

Im Rahmen klinischer Studien wurde Auroshell intravenös bei Patienten mit primären oder metastatischen Neoplasien der Lunge eingesetzt. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit einem Infrarotlaser über Bronchoskopie. Hierbei soll das Tumorgewebe, in dem sich die Gold-Nanopartikel angereichert haben, thermisch zerstört werden, ohne dass es zu relevanter

Schädigung des umliegenden gesunden Lungengewebes kommt. Die endgültigen Ergebnisse der Studie stehen derzeit noch aus.

Viele Tumore weisen in ihrem Zentrum nekrotische Areale ohne Tumorgefäße auf. Da diese hypoxischen Areale für die meisten Zytostatika sowie Nanopartikel unzugänglich sind, können einzelne Tumorzellen hier persistieren und später ein Rezidiv auslösen. Ein möglicher Therapieansatz hierfür wäre die extrakorporale Beladung von nichtmalignen Immunzellen mit Gold-Nanoshells. Die beladenen Makrophagen können über Chemotaxis aktiv in die Nekroseareale vordringen und dort über Hyperthermie ihre Wirkung entfalten (Choi et al., 2007).

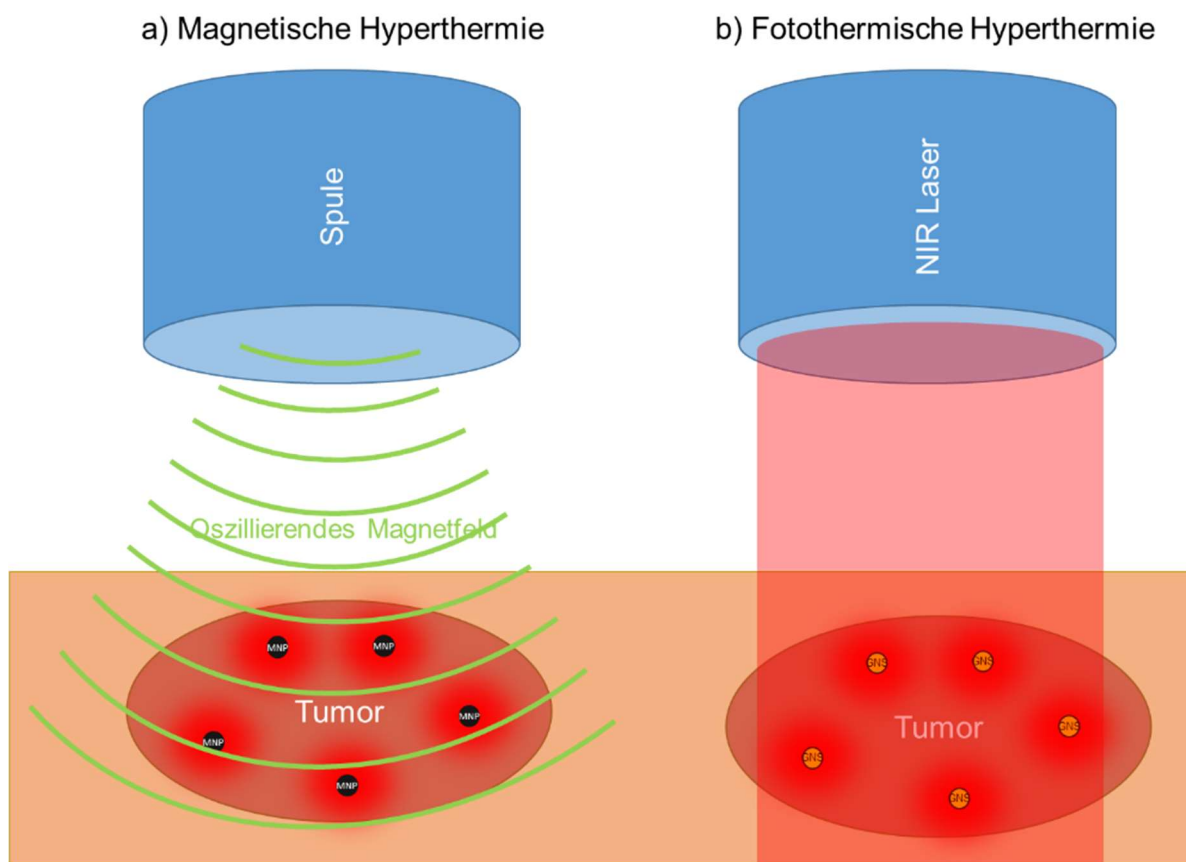


Abbildung 3: Magnetische und fotothermische Hyperthermie im Vergleich. Bei der magnetischen Hyperthermie a) kommt es zur Anreicherung von magnetischen Nanopartikeln im Tumorgewebe. Das Anlegen eines oszillierenden Magnetfelds führt zur Hitzebildung im Tumor. Bei der fotothermischen Hyperthermie b) kommt es zur Akkumulation von Gold-Nanoshells oder vergleichbaren fotosensibilisierenden Nanopartikeln im Tumorgewebe. Bei Bestrahlung des Gewebes mit NIR-Laserstrahlung kommt es hauptsächlich im Bereich des Tumors zur Umwandlung von Energie in Hitze durch die Nanopartikel (modifiziert nach Omlor et al., 2015, Respiratory Research).

Entwicklung nanopartikelbasierter Kontrastmittel in der Bildgebung

Neuartige Nanopartikel-basierte Kontrastmittel bieten deutliche Fortschritte bei der Bildgebung von Tumoren. Gold weist sowohl bei der Ordnungszahl als auch bei der Dichte einen deutlich höheren Wert auf als das in herkömmlichen Kontrastmitteln verwendete Iod. Mit Gold-Nanopartikeln als Kontrastmittel können daher deutlich höhere Abschwächungskoeffizienten und damit eine bessere Bildqualität erzielt werden (Bao et al., 2014). Es konnte in einem Tiermodell gezeigt werden, dass mit Folsäure verknüpfte und mit Dendrimeren verkapselte Goldnanopartikel zur CT-Darstellung von pulmonalen Adenokarzinomen verwendet werden können. Bei *in-vivo*- und *in-vitro*-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass sich die Nanopartikel in den Lysosomen der Folsäurerezeptor-exprimierenden Krebszellen anreicherten. Nach Aufnahme in die Krebszellen konnten die Nanopartikel im Micro-CT dargestellt werden. Die Studie zeigte auch, dass die verwendeten Nanopartikel eine gute Biokompatibilität besaßen und dass es zu keiner Beeinflussung von Zellmorphologie, Zellzyklus und Apoptose kam (Wang et al., 2013). Auch noch kleinere Nanopartikel, sogenannte Gold-Nanocluster, wurden im Tumor-Tiermodell erfolgreich als CT-Kontrastmittel eingesetzt (Zhou et al., 2013).

Es gibt auch in der MRT-Diagnostik interessante Ansätze mit auf Nanotechnologie basierenden „intelligenten“ Kontrastmitteln bei Lungenkrebs. So konnten in einem *in-vitro*-Modell mit A549 Lungenkrebszellen Nanopartikel auf Basis von mesoporösem Siliciumdioxid und Gold eingesetzt werden. Erst nach Phagozytose in die Krebszellen wurde durch die pH-Änderung ein in den Nanopartikeln eingeschlossenes MRT-Kontrastmittel freigesetzt. Da das Kontrastmittel somit nur lokal aktiv wird, handelt sich hierbei somit mehr um einen Biosensor als um ein Kontrastmittel im klassischen Sinne (Chen et al., 2014).

Toxikologische Effekte auf das Atemsystem

Nanotechnologie in der Pneumologie bietet jedoch nicht nur neue Chancen, sondern birgt leider auch noch nicht genau abschätzbare Gefahren und Risiken. Die Nanotoxikologie wird mit zunehmend häufigerer Exposition von technischen Nanopartikeln in Konsumprodukten aber auch durch die weltweit zunehmende Inhalation von Feinstäuben im Rahmen von Luftverschmutzung immer besorgniserregender. Deshalb sind Untersuchungen bezüglich der Toxizität von Nanopartikeln auf Atemwege und Lunge wichtiger denn je.

Die Toxikologie von Nanomaterialien ist komplexer als die klassische Toxikologie. Neben Zusammensetzung und Dosis spielen hier auch Aspekte wie Partikelgröße und Größenverteilung eine entscheidende Rolle (Oberdorster et al., 2005).

Es konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass wenig giftige, schlecht löslichen Feststoffe wie Titandioxid, Kohlenstoff und Polystyrol in Nanopartikelform toxischer und inflammatorischer sind als das gleiche Material in größerer Körnung. Dieser Zusammenhang konnte sowohl für synthetische Nanopartikel, als auch für natürliche Feinstäube gezeigt werden (Stone et al., 2007).

Im Atemtrakt entfalten Nanopartikel ihre toxische Wirkung vor allem über drei Mechanismen: Dies sind die Beeinflussung des Immunsystems, die Induktion von oxidativem Stress sowie die Beeinflussung des Genoms.

Beeinflussung des Immunsystems:

Die Interaktion mit dem Immunsystem ist nanopartikelspezifisch und sehr unterschiedlich. So wurde beschrieben, dass Nanopartikel Zellbarrieren überwinden, der Phagozytose entgehen, als Haptene fungieren und das Th1/Th2-Verhältnis verändern können (Dwivedi et al., 2011).

Eine aktuelle Studie untersuchte den Einfluss von inhalativer Applikation von carbon-black-Nanopartikeln auf Mäuse mit Bleomycin-induzierter Lungenfibrose. Sowohl in der Histologie als auch in den Zytokinen zeigte sich eine Exacerbation der Lungenerkrankung unter der Nanopartikelgabe. Der Autor schlussfolgerte, dass vor allem bei Patienten mit Lungenvorerkrankungen die Exposition mit Nanopartikeln zu gravierenden Gesundheitsproblemen führen kann (Saputra et al., 2014).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass PEG-beschichtete shell-cross-linked-knedel-like (cSCK)-Nanopartikel signifikant weniger Atemwegsentzündung auslösen als unbeschichtete cSCK-Nanopartikel. Als Erklärung wurde ein unterschiedlicher Endozytosemechanismus angenommen. Im Gegensatz zur Clathrin-abhängigen Endozytose der unbeschichteten cSCK-Nanopartikel werden die PEG-beschichteten cSCK-Nanopartikel über einen Clathrin-unabhängigen Mechanismus aufgenommen (Ibricevic et al., 2013).

Allerdings wurden auch Fälle von vorteilhafter Immunmodulation beschrieben. So zeigten Nanopartikel des Fulleren-Derivats $[\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ (Abbildung 4) eine Anti-Tumor-Aktivität ohne zytotoxisch zu sein. *In-vitro* führte $[\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ zu einer Aktivierung von dendritischen Zellen und bewirkte darüber hinaus sogar eine Reifung dieser Zellen. Allogene T-Zellen konnten mit $[\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ in eine Th1-Reaktion gelenkt werden. Insgesamt

zeigte $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ eine vergleichbar starke Immunwirkung wie Lipopolysaccharid (LPS). Dabei konnte eine LPS-Kontamination der Nanopartikel ausgeschlossen werden (Chen et al., 2005; Kang et al., 2012; Liu et al., 2009; Yang et al., 2010).

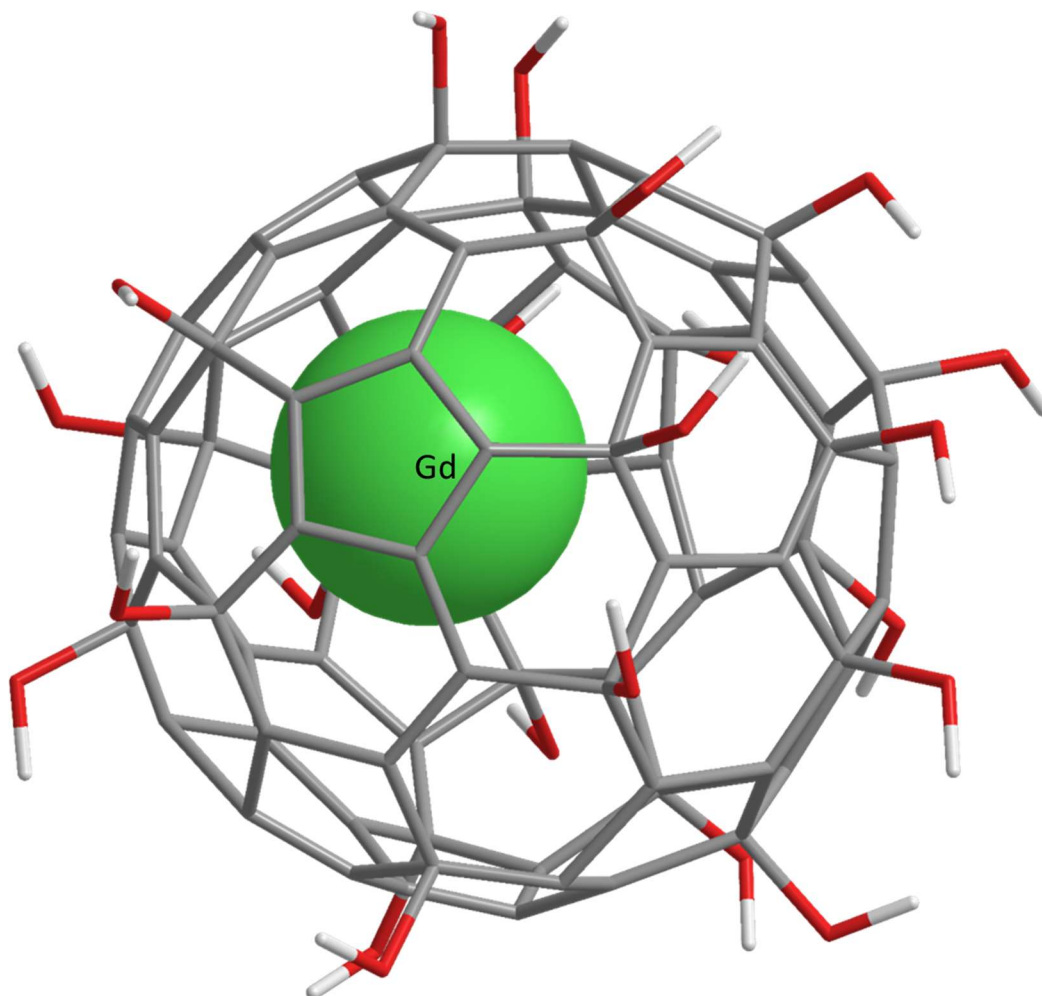


Abbildung 4: Struktur von $\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}$, welches aus einem Gadolinium-Atom (grün) in einem Fulleren-Käfig besteht. Auf der Oberfläche befinden sich Hydroxylgruppen (rot). In Wasser bildet das Molekül Aggregate $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ mit einem mittleren Durchmesser von 25 nm (modifiziert nach Omlor et al., 2015, Respiratory Research).

Oxidativer Stress:

Die Entstehung von oxidativem Stress durch Nanopartikel ist ein weiterer wichtiger Mechanismus der Nanotoxikologie. Hier kommt die enorme Oberfläche von Nanomaterialien und die damit nicht selten verbundene Fähigkeit zu katalytischen Reaktionen zum Tragen.

Oxidativer Stress kann direkt über ein Dichlorofluorescein-Assay oder indirekt über die Hochregulierung von Enzymen zur Eliminierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie zum Beispiel der Superoxiddismutase nachgewiesen werden. Auch die Untersuchung des Ein-

flusses von Antioxidantien liefert Rückschlüsse auf die durch Nanopartikel induzierte Toxizität (Wang and Joseph, 1999).

In einer Tierstudie mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass die tägliche nasale Instillation einer Suspension aus 294 nm großen Titandioxid-Nanopartikeln über 90 Tage zu einem Lungenschaden führte. Dabei stieg die Menge an gebildeten ROS mit zunehmender TiO₂-Dosierung an (Li et al., 2013a).

In einem weiteren Tiermodell mit Ratten konnte eine Größenabhängigkeit der ROS-Bildung durch Bleisulfid-Nanopartikel gezeigt werden. Bleisulfid-Nanopartikel mit 30nm bewirkten mehr oxidativen Stress als die gleiche Dosis an 60 nm großen Bleisulfid-Nanopartikeln (Li et al., 2013b).

Auch mit 63 nm großen ZnO-Nanopartikeln konnte bei *in-vitro*-Untersuchungen mit BEAS-2B- und A549-Zellen oxidativer Stress ausgelöst werden, welcher zu Zell-Zyklus-Arrest, Apoptose und mitochondrialer Dysfunktion sowie Störungen des Glucosemetabolismus führte. In der gleichen Untersuchung zeigten 39 nm große Fe₂O₃-Nanopartikel keine dieser Wirkungen, was die große Inhomogenität der Nanopartikel in Bezug auf oxidativen Stress unterstreicht (Lai et al., 2015).

Beeinflussung des Genoms:

Der dritte wichtige Faktor bei der Nanotoxizität liegt in der Genotoxizität von bestimmten Nanopartikeln begründet. Allerdings ist auch hier ein sehr differentes und widersprüchliches Verhalten einzelner Nanopartikel zu beobachten.

Zur Quantifizierung von Genomschäden wird häufig das Comet Assay verwendet, welches mittels Elektrophorese DNA-Strangbrüche identifiziert.

In einer Studie mit Printex 90-carbon-black-Nanopartikeln bei Mäusen konnte selbst bei niedrigen Dosen eine Zunahme der DNA-Strangbrüche festgestellt werden. Da es zu keiner Entzündung, Zellschädigung oder Akut-Phase-Reaktion kam, wurde die Genschädigung auf eine direkte Interaktion mit den Nanopartikeln zurückgeführt (Kyjovska et al., 2014).

In einem weiteren Tiermodell mit Ratten wurde bei intratrachealer Injektion von Fulleren-C60-Nanopartikeln, welche ebenfalls eine besondere Form von Kohlenstoff-Nanopartikeln sind, ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Hier bewirkten die Nanopartikel keine messbaren DNA-Schäden, obwohl Entzündungsreaktionen und pulmonale Hämorrhagien festgestellt wurden (Ema et al., 2012).

Andererseits wurde für bestimmte Nanopartikel auch eine DNA-protektive Wirkung beschrieben. So konnten CeO₂-Nanopartikel durch ihre antioxidative Wirkung die Bildung von DNA-Schäden in BEAS-2B-Zellen verhindern. Die Nanopartikel-behandelten Zellen zeigten weniger Genschäden nach Exposition mit oxidativem Stress-auslösendem KBrO₃ (Rubio et al., 2015).

Respiratorische Aufnahme von Nanopartikeln und Verteilung auf Nichtatemwegsorgane

Die Lunge stellt das wichtigste Einfallstor für Nanopartikel in den Organismus dar. Aufgrund ihrer geringen Größe können Nanopartikel die Luft-Blutshranke zum Teil überwinden und sich anschließend in extrapulmonalen Organen ablagern. Der Großteil der Literatur zur Verteilung von Nanopartikeln bezieht sich auf die intravenöse Applikation (De Jong et al., 2008; Kramer et al., 2017; Leu et al., 1984; Singer et al., 1972; Wojnicki et al., 2013). Gerade bei umweltmedizinischen und arbeitsmedizinischen Fragestellungen spielt jedoch die respiratorische Aufnahme von Nanopartikeln eine immer größere Rolle.

In den bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel-Aufnahme über die Atemorgane vor allem von der Größe und der Oberflächenladung der Nanopartikel abhängt. In einer Studie mit radioaktiv markierten negativ geladenen Gold-Nanopartikeln der Durchmesser 1,4 nm, 2,8 nm, 5 nm, 18 nm, 80 nm, 200 nm wurde ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem Durchmesser der Partikel und der Durchgängigkeit durch die Luft-Blut-Schranke bei Ratten gezeigt. Es zeigte sich auch eine signifikant höhere Durchgängigkeit für negativ geladene 2,8 nm Gold-Nanopartikeln im Vergleich zu positiv geladenen 2,8nm-Gold-Nanopartikeln (Kreyling et al., 2014).

In einem weiteren Tierversuch mit Ratten wurde gezeigt, dass intratracheal applizierte 18nm-Gold-Nanopartikel fast ausschließlich in der Lunge verblieben, während die 1,4nm-Gold-Nanopartikel 24h nach Instillation in relevanten Mengen in Blut, Leber, Haut und Exkrementen gefunden werden konnten (Semmler-Behnke et al., 2008).

In einer weiteren Studie mit fluoreszenzmarkierten Kunststoffnanopartikeln bei Mäusen zeigten nur Partikel mit negativer Oberflächenladung und einem hydrodynamischen Durchmesser kleiner als 34 nm eine hohe Aufnahme in die mediastinalen Lymphknoten (Abbildung 5) (Choi et al., 2010; L.L. Yu, 2010).

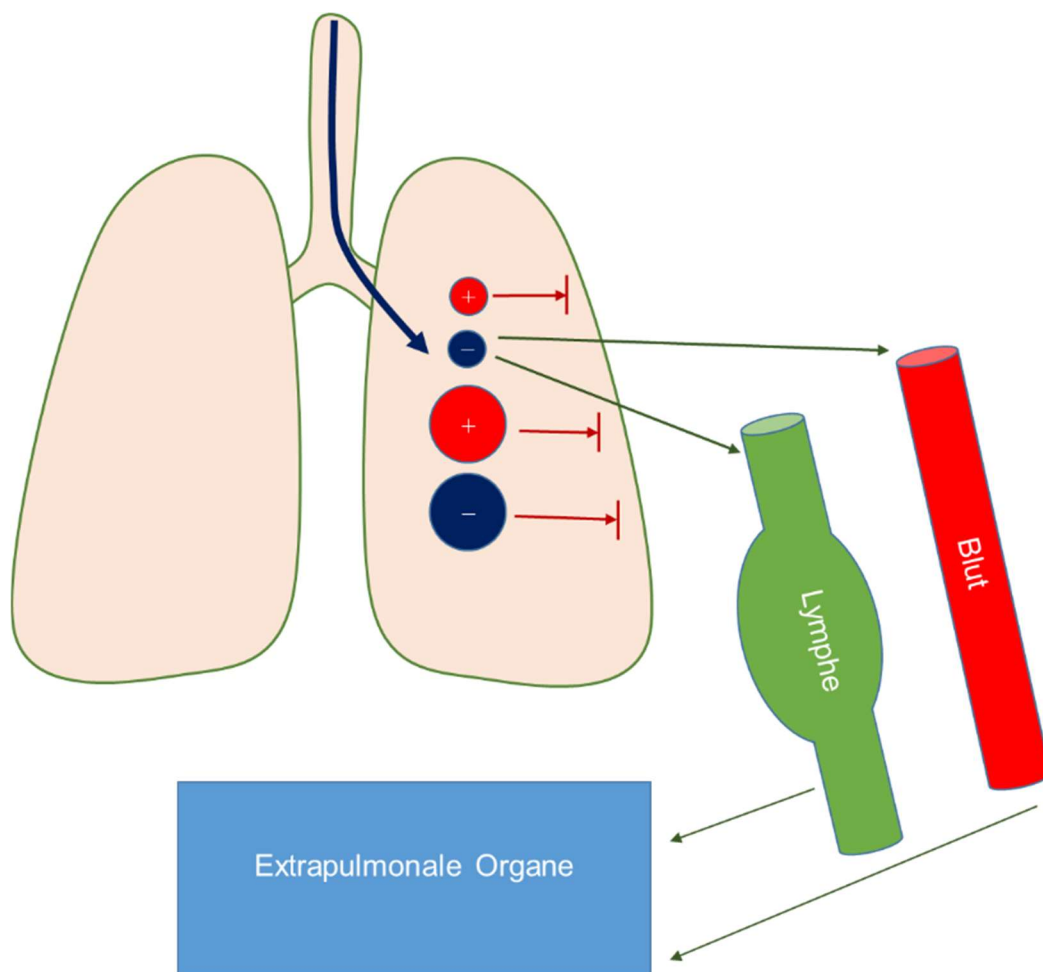


Abbildung 5: Schematische Darstellung, wie die Aufnahme von Nanopartikeln in die extrapulmonalen Organe durch Durchmesser und Oberflächenladung beeinflusst wird. Nur kleine und negativ geladene Nanopartikel zeigen eine relevante Aufnahme (modifiziert nach Omlor et al., 2015, Respiratory Research).

2.1.4 Besonderheiten von Gold-Nanopartikeln

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Gold-Nanopartikeln im Zusammenhang mit allergischer Atemwegsreaktion bei BALB/c-Mäusen. Für die Entscheidung, Nanopartikel auf Goldbasis einzusetzen, gab es mehrere Gründe:

Bereits bestehende Erfahrungen mit Gold-Nanopartikeln:

Gold-Nanopartikel wurden aufgrund ihrer besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften aber auch ihrer guten Verfügbarkeit schon recht früh für Nanoanwendungen in der Medizin verwendet und bleiben weiterhin im Fokus aktueller Forschung (Dreaden et al., 2012; Golchin et al., 2017; Kim and Jeong, 2017; Sperling et al., 2008). Von den bisher noch zahlenmäßig wenigen klinischen Anwendungen von Nanopartikeln basieren mehrere auf Gold-Nanopartikeln (Khlebtsov and Dykman, 2011). Unter anderem der oben genannte Na-

nocarrier Aurimmune Cyt-6091 (CytImmune Sciences) sowie die Hyperthermiebehandlung von Tumoren mit AuroShell (Nanospectra Biosciences, Inc.) stehen gegenwertig im Fokus des wissenschaftlichen Interesses.

Empfehlung des National Institute of Standards and Technology, Gold-Nanopartikel als Modell zu etablieren:

Ein weiterer Grund, weshalb für diese Studie Gold-Nanopartikel verwendet wurden, war die Empfehlung des National Institute of Standards and Technology (NIST), Gold-Nanopartikel als Modellsystem für nanotoxikologische Studien zu verwenden (L.L. Yu, 2010).

Fehlendes Vorkommen von Gold in biologischen Systemen:

Ein zusätzlicher Vorteil von Gold Nanopartikel für Untersuchungen bezüglich der Verteilung in Organismen ist die Tatsache, dass Gold in biologischen Systemen praktisch nicht vorkommt. Die Nanopartikel lassen sich somit indirekt elementanalytisch durch die Messung von Goldatomen nachweisen.

2.2 Ziele und Fragestellung

2.2.1 Intention der Arbeit

In der Literatur finden sich bereits Vorarbeiten zur Applikation von Gold-Nanopartikeln in die Atemorgane. In den meisten dieser Studien wurde entweder die lokale Wirkung auf die Atemorgane (Gosens et al., 2010; Jacobsen et al., 2009; Seydoux et al., 2016; Sung et al., 2011) oder aber die Aufnahme der Partikel durch die Atemorgane in extrapulmonale Organsysteme untersucht (Hussain et al., 2013; Kreyling et al., 2014; Lipka et al., 2010; Semmler-Behnke et al., 2008; Takenaka et al., 2012).

Darüber, wie diese beiden Effekte von einer vorbestehenden allergischen Atemwegserkrankung beeinflusst werden, gibt es bisher nur wenige und widersprüchliche Daten. Diese Fragestellung ist aber wichtig zur Abschätzung der Sicherheit von Nanoprodukten für Menschen mit Atemwegsvorerkrankungen.

Zum andern erhoffen wir uns aus den von uns erhobenen Daten auch ein besseres Verständnis darüber zu erlangen, wie ungewollte Nanopartikel im Zuge von Luftverschmutzung oder am Arbeitsplatz im Atemtrakt wirken.

In dieser Arbeit wurden sowohl lokale Zell-Effekte der Gold-Nanopartikel als auch ihre Verteilung in unterschiedlichen Organen nach systemischer Aufnahme sowohl bei gesunden als

auch bei Mäusen mit einer allergischen Atemwegserkrankung im Zuge des OVA-Asthma-Modells untersucht.

Es wurden zwei unterschiedliche Arten von Gold-Nanopartikeln verwendet. Zum einen zitratschichtete Gold-Nanopartikel und zum anderen Polyethylenglykol(PEG)-beschichtete Nanopartikel. Der Grund für dieses zweigleisige Vorgehen war zum einen die Vergleichbarkeit mit vorausgegangenen Studien, welche überwiegend Zitrats-Gold-Nanopartikel verwendet hatten (Barreto et al., 2015; Hussain et al., 2013; Hussain et al., 2011; Sumbayev et al., 2013), zum anderen aber auch die Anwendbarkeit der Ergebnisse auf potentielle Nanomedikamente, welche meist auf PEG-Nanopartikeln basieren (Ibricevic et al., 2013; Libutti et al., 2010; Suk et al., 2014).

2.2.2 Studiendesign

Speziell wurde der in der Literatur noch nicht ausreichend untersuchten Frage nachgegangen, wie die Gold-Nanopartikel lokal in den Atemwegen wirken und ob dadurch asthmaähnliche Atemwegserkrankung verstärkt oder gelindert werden können.

Zum anderen wollten wir zeigen, inwiefern die systemische Aufnahme der Nanopartikel durch eine vorbestehende Atemwegsentzündung beeinflusst wird.

Um diese Ziele zu erreichen, wurden folgende Teilaspekte untersucht:

- a) Bestimmung des Einflusses der Gold-Nanopartikel auf die Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage bei Kontroll- und Asthmamäusen.
- b) Bestimmung des Einflusses der Gold-Nanopartikel auf die Methacholinreaktivität in der Lungenfunktionsmessung bei Kontroll- und Asthmamäusen.
- c) Histologische Untersuchung, welche Zellpopulationen hauptsächlich für die Phagozytose von Gold-Nanopartikeln und deren Agglomeraten verantwortlich sind.
- d) Bestimmung der Goldkonzentration in den Lysaten wichtiger Organe (Lunge, Herz, Leber, Milz, Niere und Gehirn) und damit Rückschluss auf die Verteilung der Gold-Nanopartikel im Gesamtorganismus bei Kontroll- und Asthmamäusen
- e) Außerdem galt es zu untersuchen, ob es bei den Punkten a) bis d) signifikante Unterschiede zwischen Zitrats-Gold-Nanopartikeln und PEG-Gold-Nanopartikeln gibt.

3 Material und Methode

3.1 Nanopartikel-Zubereitung

3.1.1 Charakterisierung der verwendeten Gold-Nanopartikel

Die wässrigen Suspensionen von PEG-3000-beschichteten und Carboxylgruppenfunktionalisierten Gold-Nanopartikeln sowie die Suspensionen von Zitrat- und Tanninsäure-beschichteten Gold-Nanopartikeln in 0,1 mM PBS-Lösung wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Nach Angaben des Herstellers wiesen beide Nanopartikel einen Kerndurchmesser von 5 nm auf.

Die Nanopartikel wurden mit einem Zeta Sizer Nano ZSP (Malvern Instruments) bei einer Wellenlänge von 633 nm und einem Streuwinkel von 172° charakterisiert. Für das Zeta-Potential wurde die Smoluchowski-Approximation zugrunde gelegt und bei der dynamischen Lichtstreuung eine häufigkeitsgewichtete Größenverteilung bestimmt. (Messung dankenswerterweise durchgeführt von Sarah Schmidt der Arbeitsgruppe Kraegeloh des INM in Saarbrücken.)

Zusätzlich zu der Größenbestimmung über dynamische Lichtstreuung wurden die Größe und Morphologie der Nanopartikel auch über Transmissionselektronenmikroskopie charakterisiert. Hierzu wurde eine kleine Menge Nanopartikel-Suspension auf einem Pioloform-Grid im Vakuum zur Trocknung gebracht und anschließend mit einem FEI Tecnai 12 Biotwin-Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

3.1.2 Zubereitung der unterschiedlichen Gold-Nanopartikelsuspensionen

Bevor die Nanopartikel an den jeweiligen Versuchstagen (Abbildung 6) den Tieren verabreicht werden konnten, mussten beide Nanopartikelsuspensionen auf die gleiche Konzentration gebracht werden. Die PEG-Nanopartikel wurden hierzu um den Faktor 8,33 mit 0,6 mM PBS-Lösung verdünnt. Die Zitrat-Nanopartikel wurden um den Faktor 6 durch Verdunstung im Vakuum aufkonzentriert. In beiden Fällen erhielten wir so eine Konzentration von ca. 0,4 mg Gold pro ml.

Da die aufkonzentrierten Zitratpartikel nur wenige Tage haltbar sind, wurden die Partikel immer frisch vor der Applikation angesetzt.

3.1.3 Qualitätssicherung der hergestellten Nanopartikelsuspensionen

Um sicherzustellen, dass Konzentration und Qualität der Nanopartikel immer gleich waren, wurde vor jeder Applikation ein Teil der Nanopartikelsuspension mit UV-Vis-Spektroskopie untersucht. Es wurde auch ein Teil der Nanopartikelsuspensionen für eine nachträgliche Untersuchung auf eine mögliche LPS-Kontamination eingefroren.

Für die Untersuchung auf LPS wurden die Proben aufgetaut und um den Faktor 10 verdünnt. Die Messung wurde mit einem etablierten endpoint chromogenic LAL assay (QCL-1000 kit, Lonza, Verviers, Belgium) durchgeführt.

Die Analyse erfolgte in verschließbaren Reagenzgläsern, welche durch Erhitzen auf 250°C für 1h von möglichen Endotoxinrückständen befreit wurden. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 0,1 EU/mL bis 1 EU/mL angesetzt. Im 37 °C-temperierten Wasserbad wurden jeweils 50 µL der Proben bzw. der Standards mit 50 µL Limulus-Amöben-Lysat (LAL) vermischt und nach 10 Minuten mit 100 µL Substrat-Lösung versetzt. Nach weiteren 6 Minuten wurde die Reaktion mit 100 µL 25% (v/v) Essigsäure gestoppt und die Lösungen in Kunststoffeinküvetten überführt. Die Messung erfolgte bei 407 nm.

3.2 Versuchstiere

Wir verwendeten insgesamt 63 6 bis 8 Wochen alte weibliche Wildtyp-BALB/c-Mäuse, die von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) bezogen wurden. Die Versuchstiere wurden in regulärem 12h-Hell/Dunkel-Rhythmus bei Wasser und Nahrung *ad libitum* bei 22 ° C Raumtemperatur gehalten. Vor Versuchsbeginn erfolgte eine zweiwöchige Akklimatisierung der Mäuse an die neue Umgebung. Die Mäuse zeigten keine Krankheitszeichen.

Alle Versuche sind in strenger Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt worden. Es liegt eine Genehmigung vom Saarländischen Landesamt für Verbraucherschutz vor (TV-Nr. AZ:C-1 2.4.2.2/01-2014).

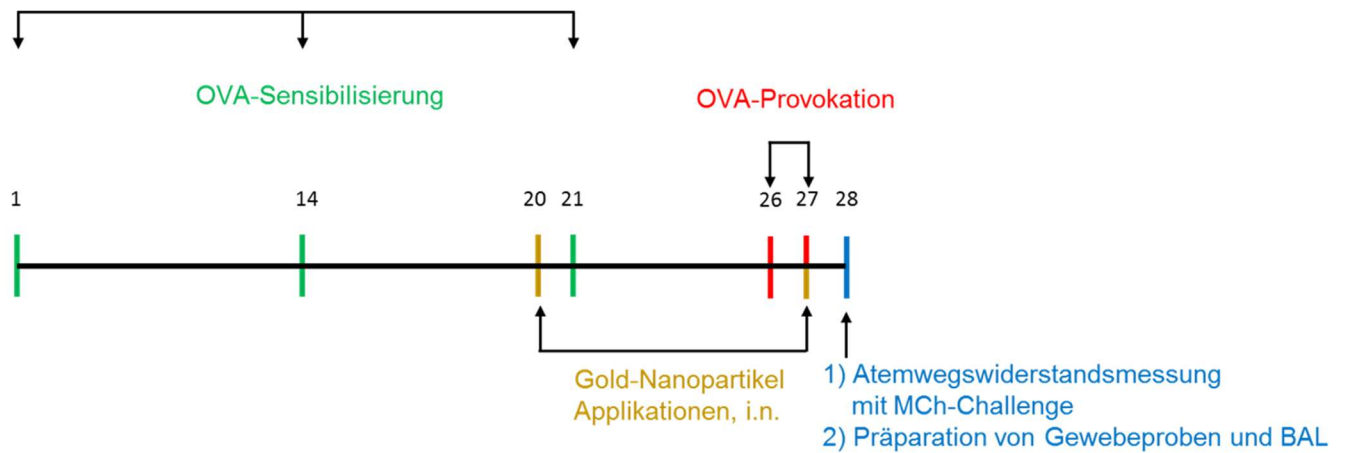


Abbildung 6: Versuchsaufbau: Sensibilisierung der Versuchstiere an Tag 1, 14 und 21 mit intraperitonealer Injektion von Ovalbumin mit Aluminiumhydroxid in den Interventionsgruppen und PBS in den Kontrollgruppen. Inhalative Provokation an den Tagen 26 und 27 mit vernebelter Ovalbuminlösung in den Interventionsgruppen oder PBS-Lösung in den Kontrollgruppen. An Tag 20 und 27 intranasale Gabe von Zitrat- oder PEG-beschichteten Gold-Nanopartikeln in 0,6 mM pbs-Lösung oder nanopartikelfreier 0,6 mM pbs-Lösung bei den Kontrollgruppen. Am Endpunkt der Studie an Tag 28 Atemwegswiderstandsmessungen unter Methacholinprovokation sowie nach Tötung der Tiere BAL- und Gewebeatnahme (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

3.3 Versuchsaufbau

Wir arbeiteten mit insgesamt 9 unterschiedlichen Versuchsgruppen (Abbildung 7) zu je 5 bis 8 Tieren: PBS/PBS/pbs, OVA/PBS/pbs, OVA/OVA/pbs, PBS/PBS/cit, OVA/PBS/cit, OVA/OVA/cit, PBS/PBS/peg, OVA/PBS/peg und OVA/OVA/peg.

Diese Gruppen sind systematisch (

Tabelle 1) mithilfe eines dreistelligen Codes benannt (x/y/z): Die ersten beiden Codestellen (x und y) beschreiben die Behandlung im Rahmen des OVA-Modells. Dabei gibt die erste Stelle (x) an, ob an den Versuchstagen (Tag 1, 14 und 21) 0,1 M PBS-Lösung (PBS) oder eine Lösung aus 20 µg Ovalbumin und 2 mg AlOH₃ (OVA) intraperitoneal injiziert wurde.

Die zweite Stelle des Codes (y) beschreibt die OVA-Challenge an Tag 26 und 27. Hierbei wurden die Mäuse 20 Minuten lang entweder mit vernebelter 0,1 M PBS-Lösung (PBS) oder mit vernebelter 1%iger (w/w) OVA-Lösung (OVA) behandelt.

Tabelle 1: Systematische Nomenklatur der Versuchstiere mit einem dreistelligen Code

Erste Codestelle (x): Behandlung an den Versuchstagen 1, 14, 21		Zweite Codestelle (y): Challenge an Tag 26 und 27		Dritte Codestelle (z): Nanopartikel-Verabreichung an Tag 20 und 27	
PBS	intraperitoneale Injektion einer 0,1 M PBS- Lösung	PBS	20 Minuten mit vernebelter 0,1 M PBS- Lösung	pbs	Narkose mit Isofluran + 50 µL 0,6 mM PBS-Lösung (transnasal)
OVA	intraperitoneale Injektion einer Lösung aus 20 µg Oval- bumin und 2 mg ALOH3 (OVA)	OVA	20 Minuten mit vernebelter 1%iger (w/w) OVA-Lösung	cit	Narkose mit Isofluran + 50 µL Zitrat- Nanopartikel in 0,6 mM PBS- Lösung (trans- nasal)
				peg	Narkose mit Isofluran + 50 µL PEG- Nanopartikel in 0,6 mM PBS- Lösung (trans- nasal)

Von den 9 Gruppen sind nur die 3 OVA/OVA-Gruppen Asthma-Gruppen. Sowohl die OVA/PBS als auch die PBS/PBS Gruppen dienten als Kontrolle.

Die dritte Stelle (z) in Kleinbuchstaben beschreibt die Nanopartikel-Verabreichung an Tag 20 und 27. Hierfür wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und es wurde ihnen anschließend 50 µL 0,6 mM PBS-Lösung (pbs) oder 50 µL Zitrat-Nanopartikel in 0,6 mM PBS-Lösung (cit) oder 50 µL PEG-Nanopartikel in 0,6 mM PBS-Lösung (peg) intranasal instilliert.

Anzahl der Tiere:

In den 3 Nanopartikel-Kontrollgruppen (PBS/PBS/pbs, OVA/PBS/pbs und OVA/OVA/pbs) wurden je 5 Tiere pro Gruppe eingesetzt. In den Nanopartikelgruppen (PBS/PBS/cit, OVA/PBS/cit, OVA/OVA/cit, PBS/PBS/peg, OVA/PBS/peg und OVA/OVA/peg) wurden jeweils 8 Tiere pro Gruppe verwendet. In der PBS/PBS/cit, OVA/PBS/cit und OVA/OVA/cit hat je ein Tier den Endpunkt der Studie nicht erreicht, sodass sich die Anzahl auf jeweils 7 Tiere reduziert hat. Am Endpunkt der Studie konnten somit 60 Tiere ausgewertet werden. Damit hebt sich unsere Studie in der Anzahl der Versuchstiere deutlich von den bislang veröffentlichten Vergleichsarbeiten ab.

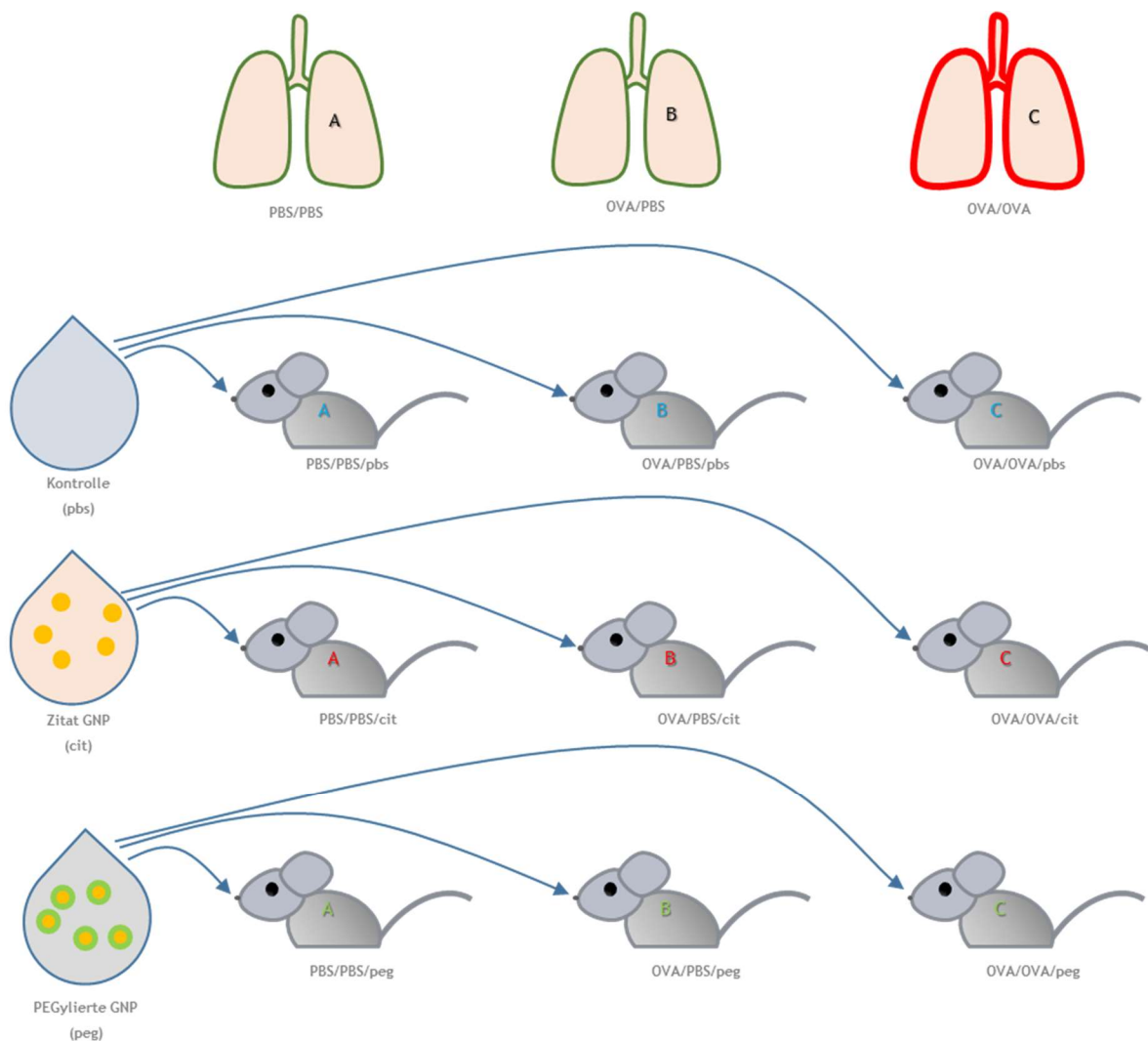


Abbildung 7: Studiendesign: Erstes Triplet: intraperitoneale Sensibilisierung (PBS oder OVA). Zweites Triplet: inhalative Provokation (PBS oder OVA). Drittes Triplet: intranasale Nanopartikelapplikation (pbs, cit oder peg). A Gruppen (PBS/PBS/pbs, PBS/PBS/cit und PBS/PBS/peg) und B Gruppen (OVA/PBS/pbs, OVA/PBS/cit und OVA/PBS/peg) sind Kontrollgruppen (keine (A) oder unvollständige (B) OVA Behandlung). Nur C Gruppen (OVA/OVA/pbs, OVA/OVA/cit und OVA/OVA/peg) sind Asthmagruppen (OVA-Sensibilisierung und inhalative Provozierung mit OVA) (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

3.4 Lungenfunktionsmessung

Am Tag 28, dem Endpunkt des Experiments, wurden die Mäuse mit einer Injektion aus Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg) und Xylazinhydrochlorid (8 mg/kg) narkotisiert. Anschließend wurde die Trachea freipräpariert, eine Tracheostomie durchgeführt und eine 18 Gauge-Kanüle in die Trachea vorgeschoben. Über diese zuvor kalibrierte Kanüle wurden die Mäuse anschließend an ein SCIREQ flexiVent Setup angeschlossen und mit einem Tidalvolumen von 10 ml/kg bei einer Beatmungsfrequenz von 150 /min ventiliert.

Mit der flexiWare Software wurde unter anderem der Gesamtemwegswiderstand bestimmt. Ein Ultraschallvernebler am Gerät konnte synchron zur Inspiration zugeschaltet werden.

Während der ersten Messung wurde hierüber 0,1 M PBS-Lösung vernebelt. Danach folgten 5 weitere Messungen mit Methacholin-Vernebelung in ansteigender Konzentration (0,625 mg/ml, 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml und 10 mg/ml).

3.5 Gewebepräparation

Nach der Lungenfunktion wurden die Mäuse durch Ausbluten getötet. Dann wurden ihre Organe vorsichtig entnommen. Zuerst die Lunge, dann Herz, Leber, Milz, Magen, Nieren und zuletzt Gehirn.

Hierbei wurde großer Wert darauf gelegt, dass Pinzette und Skalpell zwischen jedem Organ sorgfältig gespült wurden, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Verschleppung von Gold-Nanopartikeln zu verhindern.

Die entnommenen Organe bzw. Teile davon wurden zur Goldbestimmung in Falcon Röhrchen eingewogen, mit 5 ml ultrapurer HNO₃ versetzt und mehrmals kurz erwärmt und geschüttelt, bis nach einigen Tagen klare Lösungen entstanden.

Da erste Analysen mit Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) zeigten, dass die Salpetersäure alleine das Gold trotz seiner Nano-Form nicht homogen auflösen vermochte, wurde in Anlehnung an ein Protokoll des National Institute of Standards and Technology (NIST) zusätzlich noch ultrapure HCl zu den Proben zugesetzt (L.L. Yu, 2010).

Da diese allerdings schädlich für das ICP-MS-Gerät ist, musste in Testreihen die kleinstmögliche Dosis von zugegebenem HCl herausgearbeitet werden.

Wir fanden heraus, dass eine 4 %ige (v/v) HCl-Lösung für unsere Versuchsreihe am geeignetsten war. Es wurde jeweils 5 ml davon zu den Proben in den Falcon-Röhrchen zugesetzt.

Nach Zugabe von 10 µL Holmium 165 Standard-Lösung (10 µg/mL) als interner Standard sowie Erstellung einer Standardkurve mit 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb und 50 ppb Gold wurden die Proben mittels Autosampler nacheinander in einem Agilent 7500cx (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) ICP-MS-Gerät gemessen.

Aus Goldkonzentration in den Gewebelysaten konnte unter Berücksichtigung der zuvor bestimmten Organmassen der Gold-Nanopartikelgehalt in den Organen berechnet werden.

Neben den Gewebepräparationen zur Bestimmung des Goldgehalts wurde ein Teil des Lungengewebes und Nierengewebes auch für spätere Untersuchungen mit Licht- und Elektronenmikroskopie vorbereitet.

3.6 Lichtmikroskopie

Für die Lichtmikroskopie wurde das Lungengewebe für 24h in Zamboni-Lösung eingelegt. Es folgte ein Waschschrift in 0,1 M PBS über weitere 24h und ein weiterer Waschschrift in 30%iger Saccharose-Lösung. Danach wurde das Gewebe weitere 24h in 30%iger Saccharose-Lösung gelagert, um die Entstehung von Gefrierartefakten im nächsten Schritt zu verhindern. Anschließend wurde das Gewebe auf einem Stück Filterpapier in Tissue-Tek O.C.T Compound eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

3.6.1 Silanisierung der Objektträger für die lichtmikroskopische Auswertung

Hierzu wurden die Objektträger (Thermo Scientific, Menzel Gläser, Superfrost) nacheinander für jeweils 5 Minuten in ein Bad mit Aceton, in ein Bad mit einer 2%igen (v/v) APES((3-Aminopropyl)triethoxysilan)-Aceton-Lösung, in ein weiteres Bad mit Aceton und zuletzt in ein Bad mit bidest. Wasser gegeben und anschließend über Nacht im Trockenschrank (37 °C) getrocknet.

3.6.2 Herstellung von Lungen-Kryoschnitten:

Mit einem Leica-CM-1950-Kryostat bei -25 °C am Objektkopf und -20 °C in der Kammer wurden aus den Lungen-Tissue-Tek-Blöcken seriell 10 µm dicke Schnitte erzeugt und auf die vorbehandelten Objektträger überführt. Nach Lufttrocknung für ca. 1h wurden die Präparate bis zu den Färbungsschritten bei -80 °C gelagert.

Mit den Lungen-Kryoschnitten wurden HE-, PAS- und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

3.7 Histologische Färbungen

3.7.1 HE-Färbung:

Die Objektträger wurden aufgetaut und ca. 10 Minuten getrocknet. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Fixierung in -20 °C kaltem Aceton. Nach 10 Minuten Lufttrocknung wurde 5 Minuten in Leitungswasser rehydriert, gefolgt von weiteren 5 Minuten in einem Mayer's-Hämatoxylin-Bad. Anschließend wurde die sogenannte Bläuung, eine 5-minütige Warmwasserspülung der Proben, durchgeführt. Nach 30 Sekunden in bidest. Wasser folgten weitere 30 Sekunden im Eosin-Y-Bad. Nach Dehydrierung durch jeweils einminütiges Eintauchen in aufeinanderfolgenden Bädern abnehmenden Wassergehalts (96 % Ethanol, 99% Ethanol, Xylol) wurden die Präparate mit Entellan (Merk) und Deckgläschen eingedeckt.

3.7.2 PAS-Färbung:

Die aufgetauten Objektträger wurden 1h bei Raumtemperatur getrocknet und 10 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 5 Minuten mit 0,1%iger Periodsäure behandelt, gefolgt von einer 5-minütigen Spülung mit Leitungswasser und zwei weiteren jeweils 2-minütigen Behandlungen im bidest. Wasserbad. Es folgte eine 20-minütige Behandlung mit 4 °C kaltem Schiff-Reagenz (Merk) gefolgt von drei 2-minütigen Spülungen mit Sulfitwasser. Es wurde anschließend 5 Minuten mit Hämatoxylin (Merk) gefärbt und weitere 5 Minuten mit Ammoniakwasser gebläut. Danach wurden die Schnitte je eine Minute in aufeinanderfolgenden Bädern (70% Ethanol, 85% Ethanol, 99% Ethanol und Xylol) dehydriert und schließlich mit Entellan (Merk) und Deckgläschen eingedeckt.

3.7.3 Immunfluoreszenz

Die Schnitte wurden 15 min bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend 5 Minuten in 0,1 M PBS rehydriert und dann mit 5%igem Serum inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern.

Anschließend wurde 1h bei Raumtemperatur mit Primärantikörper (Tabelle 2) inkubiert und anschließend bei 4 °C über Nacht weiter inkubiert.

Die Schnitte wurden anschließend zweimal mit 0,1 M PBS-Lösung gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit den fluoreszenzfarbstoffkonjugierten Sekundärantikörpern (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörerkombinationen bei der Immunfluoreszenzfärbung der Lungenschnitte

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Armenian-Hamster-Anti-Maus CD11c (Biolegend)	1:200	Ziege-Anti-Armenian-Hamster-IgG + Alexa-Fluor-488	1:400
Ratte-Anti-Maus-F4/80 (eBioscience)	1:100	Esel-Anti-Ratte-IgG + cyanine-Cy3	1:400
Ratte-Anti-Maus-Siglec-F (eBioscience)	1:200	Esel-Anti-Ratte + Alexa-Fluor-488	1:400
Armenian-Hamster-Anti-Maus CD11c (Biolegend)	1:200	Ziege-Anti-Armenian-Hamster-IgG + dylight-649	1:400
Ratte-Anti-Maus-Ly6G [1A8] (Abcam)	1:400	Esel-Anti-Ratte + cyanine-Cy3	1:400
Armenian-Hamster-Anti-Maus-CD3ε (Biolegend)	1:100	Ziege-Anti-Armenian-Hamster + Alexa-Fluor-488	1:400
Ratte-Anti-Maus-CD45r (eBioscience)	1:100	Esel-Anti-Ratte + cyanine-Cy3	1:400

Anschließend erfolgte eine 15-minütige Behandlung mit 100 µl DAPI (0,5 µg/ml, Carl Roth, Karlsruhe) sowie zwei Waschschrte mit 0,1M PBS und ein Waschschrte mit bidest. Wasser. Anschließend wurde mit einem Silver-Enhancer-Kit (Sigma-Aldrich) eine Versilberung von Nanopartikelansammlungen bewirkt.

Hierzu wurden Lösung A und B im Verhältnis 1:1 zusammengegeben und kurz gevortext. Mit einer Pasteur-Pipette wurde dann so viel dieser Lösung auf die Objektträger getropft, dass die Schnitte komplett bedeckt waren. Die Versilberungslösung wurde 10 Minuten auf den Objektträgern belassen. Dann wurden die Objektträger mit bidest. Wasser gespült und für 5 Minuten in 2,5%iger (w/w) Natriumthiosulfatlösung entwickelt. Nach einem weiteren Waschschrte mit bidest. Wasser wurden die Schnitte in Floroshield eingebettet.

3.8 Bronchoalveolare Lavage

Die BAL-Gewinnung erfolgte wie in der Literatur beschrieben, indem 1 ml kaltes PBS mit einer 1 ml-Einmalspritze über die Trachea in die Lunge der Maus gedrückt und wieder aspiriert wurde (Herz et al., 1998; Joachim et al., 2006b). Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde nach Anfärben der abgestorbenen Zellen mit Trypanblau bei jeder Maus die Gesamtzahl der intakten Zellen bestimmt.

3.9 Elisa

Das Gesamt-IgE wurde aus am Endpunkt der Studie entnommenen und eingefrorenen Serumproben der Mäuse bestimmt. Hierzu wurde ein Mouse IgE ELISA Ready-SET-Go! von ThermoFisher verwendet. Gemäß der Anleitung wurde die Elisa Mikroplatte mit 100 µL Cap-

ture Antikörper je Well über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Wells abgesaugt und zweifach mit je 400 µL Wasch-Puffer gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 250 µL Block-Puffer über 2h. Mit der Standardlösung und Assay-Puffer wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt (Tabelle 3). 100 µL Assay Buffer als Blank, je 100 µL der Standardverdünnungen als Dupletts sowie je 100 µL der 1:100 verdünnten Serumproben wurden auf die Mikroplatte pipettiert und 2h bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte inkubiert. Anschließend wurde je viermal mit Waschpuffer gespült. Im nächsten Schritt wurden 100 µL eines mit Biotin konjugierten Detection-Antikörpers zu jedem Well hinzugegeben und 1h bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten wurde je 100 µL Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin zugesetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten wurde je 100 µL auf Raumtemperatur erwärmte TMB-Substratlösung in jedes Well zugesetzt und 15 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µL Stoppreagenz wurde mit dem Platereader Fluostar Omega bei 450 nm die Extinktion ausgelesen. Die Blank-korrigierten Werte wurden über eine 4-Parameter-Regression gefittet.

Analog wurde auch das OVA-spezifische IgE mit einem vorbeschichteten Anti-Ovalbumin IgE (mouse) ELISA Kit von Cayman Chemical in den Serumproben gemessen. Mit der Standardlösung und Assay-Puffer wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt (Tabelle 3). 100 µL Assay Buffer als Blank, je 100 µL der Standardverdünnungen als Dupletts sowie je 100 µL der 1:50 verdünnten Serumproben wurden auf die Mikroplatte pipettiert und 2h bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte inkubiert. Anschließend wurde je viermal mit Waschpuffer gespült. Danach wurden 100 µL Ovalbumin-Biotin-Konjugat-Lösung in jedes Well gegeben und 1h bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten wurde je 100 µL Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin zugesetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten wurde je 100 µL auf Raumtemperatur erwärmte TMB-Substratlösung in jedes Well zugesetzt und 30 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µL Stoppreagenz wurde mit dem Platereader Fluostar Omega bei 450 nm die Extinktion ausgelesen. Die Blank-korrigierten Werte wurden über eine 4-Parameter-Regression gefittet.

Tabelle 3: Standardverdünnungsreihen beim Gesamt-IgE Elisa und beim Elisa für OVA-spezifisches IgE

Konzentration [ng/mL]	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Gesamt-IgE	250	125	62,5	31,3	15,6	7,81	3,91
OVA-spezifisches IgE	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56

3.10 Statistische Auswertung und verwendete Software

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5.02 durchgeführt (Tabelle 4). Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM aufgeführt. Mithilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests wurde auf Normalverteilung untersucht. Die verschiedenen Gruppen wurden mit einem ungepaarten T-Test und ANOVA (mit Bonferonis Post Test) für die normalverteilten Gruppen und mit dem Mann-Whitney Test und dem Kruskal-Wallis Test (mit Dunn's Post-Test) für die nicht normalverteilten Gruppen auf Signifikanz untersucht. Mithilfe des Grubbs' Test ($p < 0,05$) wurden Ausreißer entdeckt und eliminiert. P-Werte $< 0,05$ (*) und $< 0,01$ (**) wurden als signifikant, p-Werte $< 0,001$ (***) als hoch signifikant angesehen.

Tabelle 4: Verwendete Software

Programm	Hersteller	Zweck
Excel 2016	Microsoft	Tabellenkalkulation
GraphPad Prism 5.02	GraphPad Software, Inc.	Statistik
AxioVision Imaging	Zeiss	Bildaufnahme
Powerpoint 2016	Microsoft	Abbildungen
Ninithi	Open source	chemische Abbildungen
Chemdraw 14	Cambridgesoft	chemische Strukturen
Omega	BMG Labtech	Elisa
Mars	BMG Labtech	Elisa
flexiWare Software	Scireq	Lungenfunktion

4 Ergebnisse

4.1 Nanopartikel-Zubereitung und -Applikation:

Für nanotoxikologische und nanopharmakologische Studien ist es essenziell, dass die verwendeten Nanopartikel präzise charakterisiert werden.

Gold-Nanopartikel besitzen in dieser Hinsicht den Vorteil, dass sie sehr gut charakterisiert werden können. Aufgrund der hohen Ordnungszahl lassen sie sich elektronenmikroskopisch gut morphologisch darstellen. Mit REM-EDX-Aufnahmen (Abbildung 8) konnte bestätigt werden, dass der Nanopartikeldurchmesser sowohl bei den Zitrat-Gold-Nanopartikeln, als auch bei den PEG-Gold-Nanopartikeln bei ca. 5 nm liegt.

Stabilität der Nanopartikeldispersionen:

Zusätzlich zeigten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Nanopartikel auch die deutlich höhere Stabilität der PEG-Partikel gegen Agglomeration. Für die Erstellung der Aufnahmen musste das Lösungsmittel langsam verdunstet werden, bis nur noch die Partikel auf dem TEM-Grid blieben. Bei diesem Prozess erhöhte sich kontinuierlich die Nanopartikel- und Salzkonzentration, wodurch sich die Stabilität der Nanopartikelsuspension reduzierte. Bei den Zitrat-Partikeln kam es dabei ab einem bestimmten Punkt zur Agglomeration und in Folge zur irreversiblen Bildung von Ketten und Aggregaten auf dem Grid. Im Gegensatz hierzu blieben die Suspension der PEG-Nanopartikel bis zuletzt stabil, was sich in dem entstandenen lockeren Gefüge widerspiegelt, in dem alle Nanopartikel einen gewissen Abstand zueinander aufweisen.

Dieses Ergebnis spiegelte sich auch darin, dass die getrockneten PEG-Gold-Nanopartikel im Ultraschallbad resuspendiert werden konnten, während dies für die Zitrat-Nanopartikel aufgrund der irreversiblen Agglomeration nicht möglich war.

Auch in anderen Zusammenhängen zeigten die PEG-Gold-Nanopartikel deutlich höhere Stabilitäten. So führte das Vermischen mit 0,1M PBS oder muriner bronchoalveolarer Lavage bei Zitrat-Gold-Nanopartikeln innerhalb weniger Sekunden zur Agglomeration, während die PEG-Gold-Nanopartikel beiden Flüssigkeiten mehrere Tage unverändert standhalten konnten.

Extinktionsmessungen zur Konzentrationsbestimmung der verwendeten Zitrat- sowie PEG-Gold-Nanopartikel:

Um die Konzentration und Qualität der jeweils an den Applikationstagen aus den Stocklösungen frisch angesetzten Applikationsdosen zu überprüfen, wurden jeweils UV-Vis-Spektren angefertigt (Abbildung 9).

In unserem Fall waren die Abweichung der Kurven untereinander gering und auch die Extinktionsmaxima nahe am vom Hersteller angegeben Intervall zwischen 515 nm und 520 nm.

Ausschluss einer LPS-Kontamination der Nanopartikel:

Zum Ausschluss einer LPS-Kontamination der Nanopartikel wurde ein kolorimetrisches LAL-Assay verwendet. In unserer Messung kam erschwerend hinzu, dass die Gold-Nanopartikel im Messbereich des Assays zwischen 405 nm und 410 nm ebenfalls eine Absorption aufweisen. Diese musste daher als Baseline vom Messergebnis subtrahiert werden. Allerdings war dies nur für die PEG-Gold-Nanopartikel von Bedeutung. Bei den Zitrat-Gold-Nanopartikeln kam es nämlich im Zuge des Einfrierens und Auftauens zu einer Agglomeration der Nanopartikel und damit zu einem Verlust der Absorptionseigenschaften.

Letztendlich wurde sowohl bei Zitrat- als auch bei den PEG-Gold-Nanopartikeln LPS-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Assays gefunden.

Tabelle 5: Ergebnisse des LAL-Assays.

Probe	LPS Konz.	Extinktion	Extinktion korrigiert
Standard 0,1 + Reagenzien	0,1 EU/mL	0,007	-
Standard 0,25 + Reagenzien	0,25 EU/mL	0,058	-
Standard 0,5 + Reagenzien	0,5 EU/mL	0,143	-
Standard 1 + Reagenzien	1 EU/mL	0,343	-
Probe cit + Reagenzien	x	0,001	0,000
Probe peg + Reagenzien	y	0,018	0,001
Blank cit + Wasser	-	0,001	-
Blank peg + Wasser	-	0,017	-

Die um die Nanopartikel-Blank-Absorption korrigierte Extinktion der beiden Proben der Zitrat-(cit) und PEG-beschichteten (peg) Gold-Nanopartikel liegt unterhalb der Standardkurve. Damit sind die gesuchten LPS-Konzentrationen x und y der beiden Proben unterhalb der Nachweisgrenze des Tests.

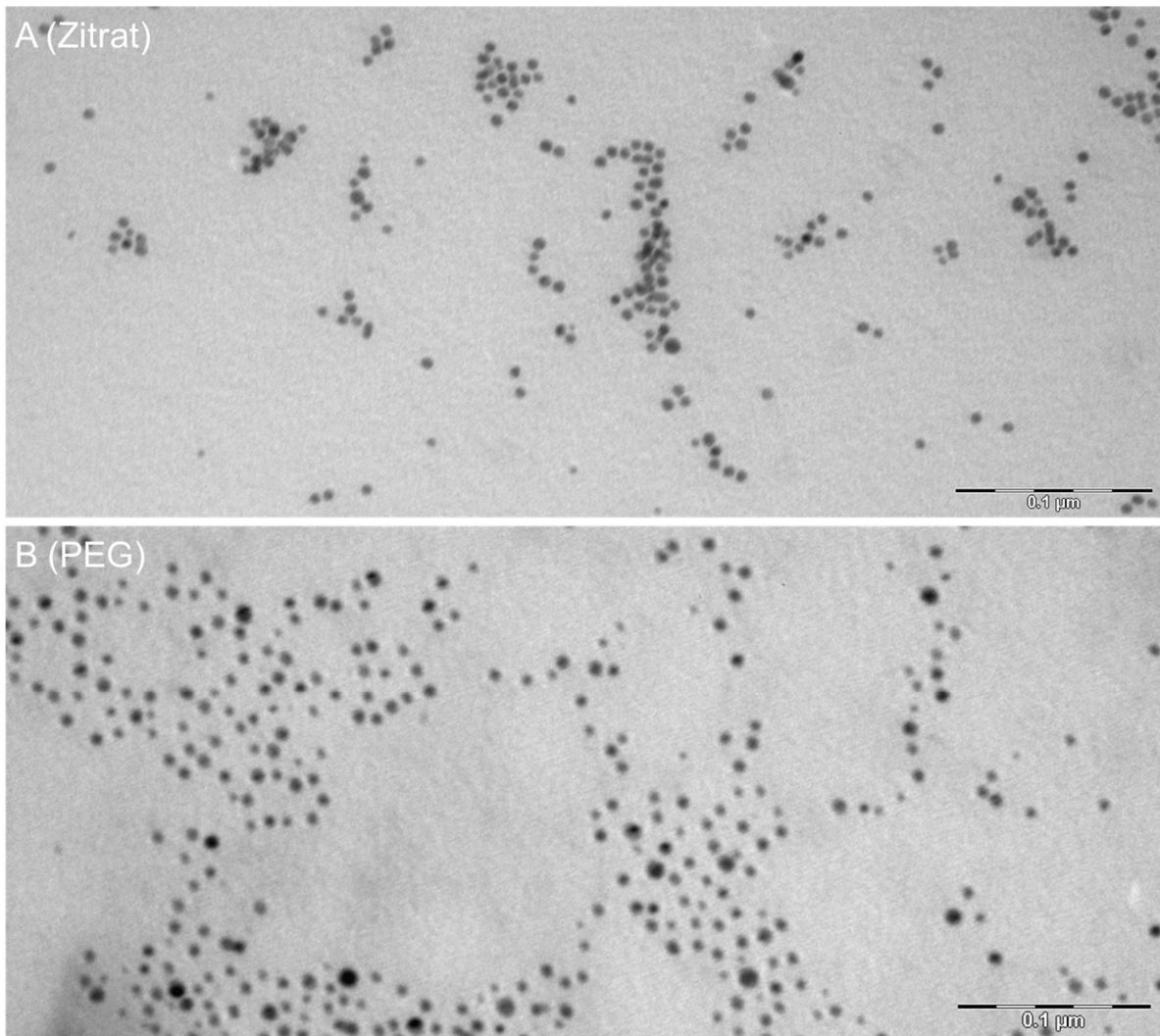


Abbildung 8: TEM Aufnahmen von Zitrat- (A) und PEG- (B) 5 nm-Gold-Nanopartikeln. Beide Nanopartikeltypen mit Kerndurchmesser von ca. 5 nm. Aus der Anordnung der Nanopartikel auf dem Grid sind Rückschlüsse auf unterschiedliche Eigenschaften von Zitrat- und PEG-Gold-Nanopartikeln ableitbar. A: Zitrat-Gold-Nanopartikel: Neigung zu Agglomeration und irreversibler Bildung von Ketten und Aggregaten bei osmotischem Stress während der TEM-Probenvorbereitung. B: PEG-Gold-Nanopartikel: vergleichsweise lockere Anordnung der PEG-Gold-Nanopartikel mit deutlichem Abstand zueinander als Zeichen ihrer hohen Stabilität (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

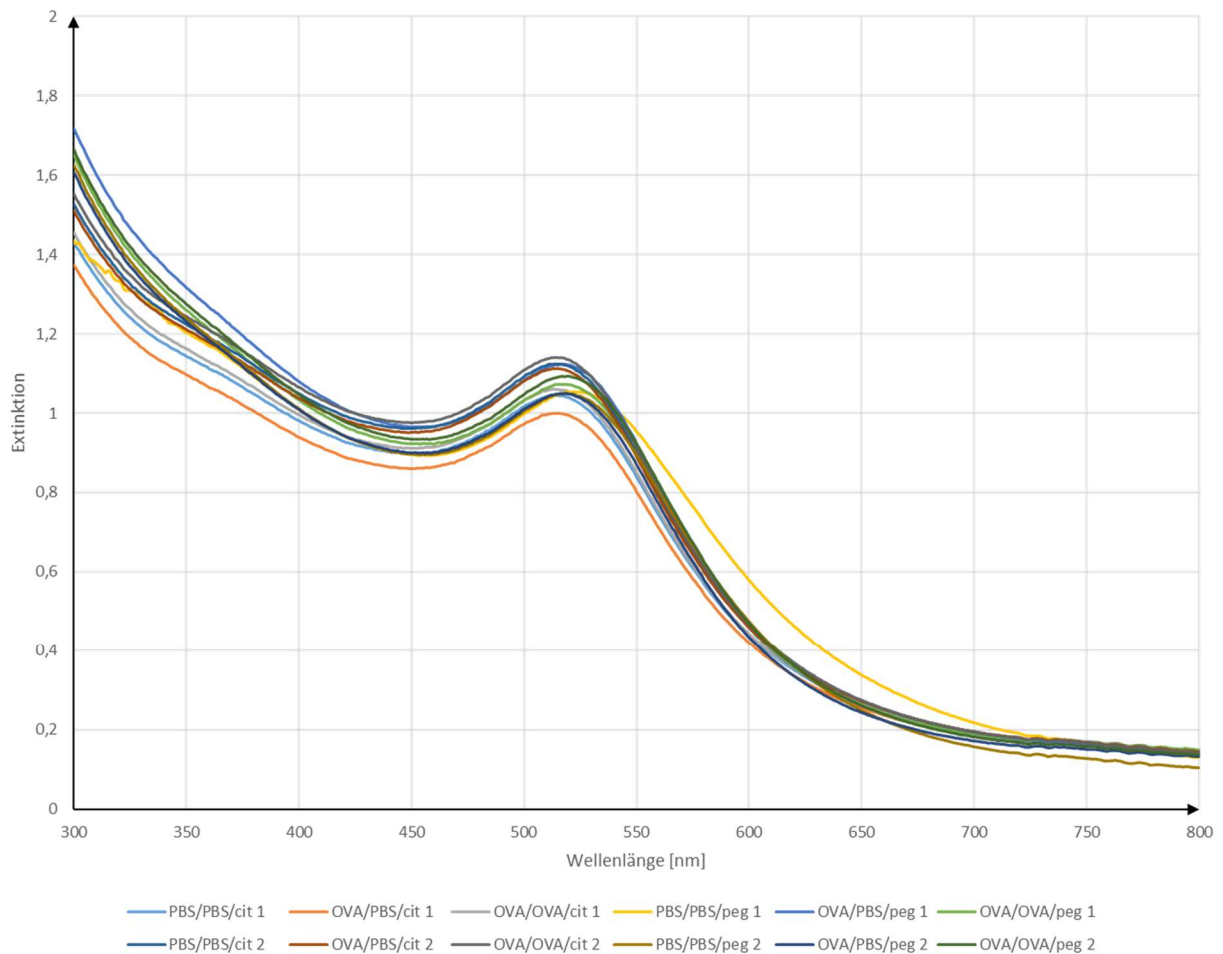


Abbildung 9: Bestimmung der Qualität der verabreichten Nanopartikel vor jeder Instillation mithilfe von UV-Vis-Spektroskopie der verdünnten Aliquote. Nicht nur Aussagemöglichkeit über Konzentration, sondern auch Größenverteilung (laut Hersteller sowohl Zitrat- als auch die PEG-Gold-Nanopartikel mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $1,10 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und einem Extinktionsmaximum zwischen 515 nm und 520 nm). Ähnlichkeit der Graphen beweist: Alle Versuchsgruppen in Bezug auf Konzentration und Größenverteilung vergleichbar (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

4.2 Das OVA-Asthma-Modell

Nachweis von Gesamt-IgE und OVA-spezifischem IgE als Maß für den Erfolg der Sensibilisierung:

Um den Erfolg der Sensibilisierung zu verifizieren, wurden Elisa-Assays für Gesamt-IgE und OVA-spezifisches IgE in Serumproben der 9 Versuchsgruppen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Gesamt-IgE-Spiegel als auch der Spiegel an OVA-spezifischem IgE in den gegen OVA sensibilisierten Gruppen (OVA/PBS und OVA/OVA) signifikant gegenüber den nicht sensibilisierten Gruppen (PBS/PBS) erhöht war (Abbildung 10).

Manifest wurde die Asthmasymptomatik in der Histologie allerdings nur, wenn zusätzlich zur Sensibilisierung auch eine inhalative Provokation mit OVA erfolgte.

Qualitative Bewertung der Zelldichten in Kryoschnitten der 9 Versuchsgruppen:

In HE-gefärbten Lungenschnitten wurde die Entzündung qualitativ bewertet. Dabei zeigte sich nur bei den sowohl sensibilisierten als auch provozierten Gruppen (OVA/OVA) eine deutlich erhöhte Zelldichte als Zeichen der Inflammation.

Dieser Effekt war unabhängig von nicht durchgeführter (PBS) oder erfolgter Nanopartikelbehandlung mit Citrat- bzw. PEG-Gold-Nanopartikeln (Abbildung 11).

Qualitative Bewertung der Mukusproduktion in Kryoschnitten der 9 Versuchsgruppen:

Neben der veränderten Zelldichte wurde auch das Ausmaß der Mukusproduktion in PAS-gefärbten Schnitten qualitativ bestimmt. Auch hier zeigten die OVA/OVA-Gruppen eine deutlich gesteigerte Mukusproduktion. Der Mukus stellte sich dabei wegen der in ihm enthaltenen Mucopolysaccharide tief magenta-rot dar (Abbildung 12).

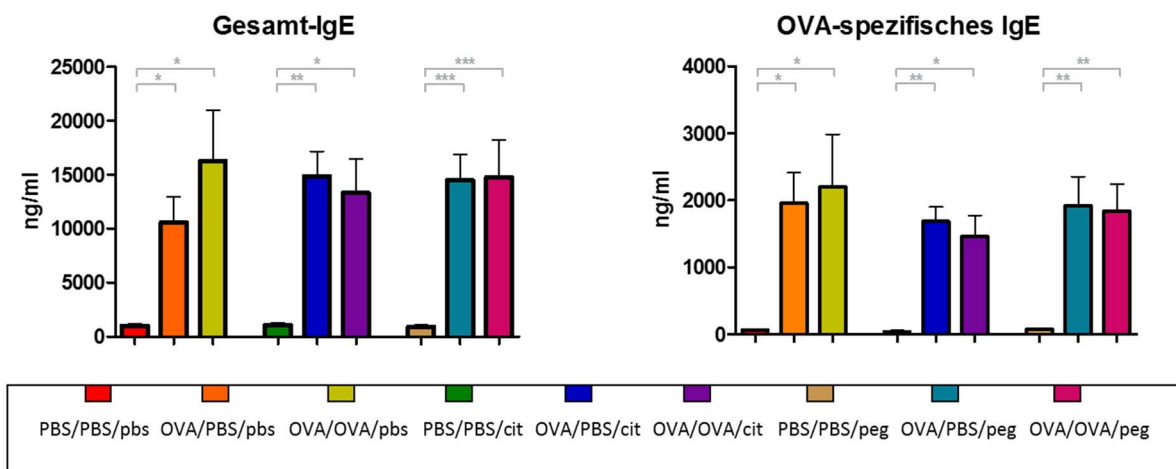


Abbildung 10: Gesamt-IgE und OVA-spezifisches IgE in den Versuchsgruppen. Signifikante Erhöhung von gesamt-IgE und OVA-spezifischem IgE bei allen OVA-sensibilisierten Gruppen (OVA/PBS und OVA/OVA) gegenüber den nicht sensibilisierten Gruppen (PBS/PBS) (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

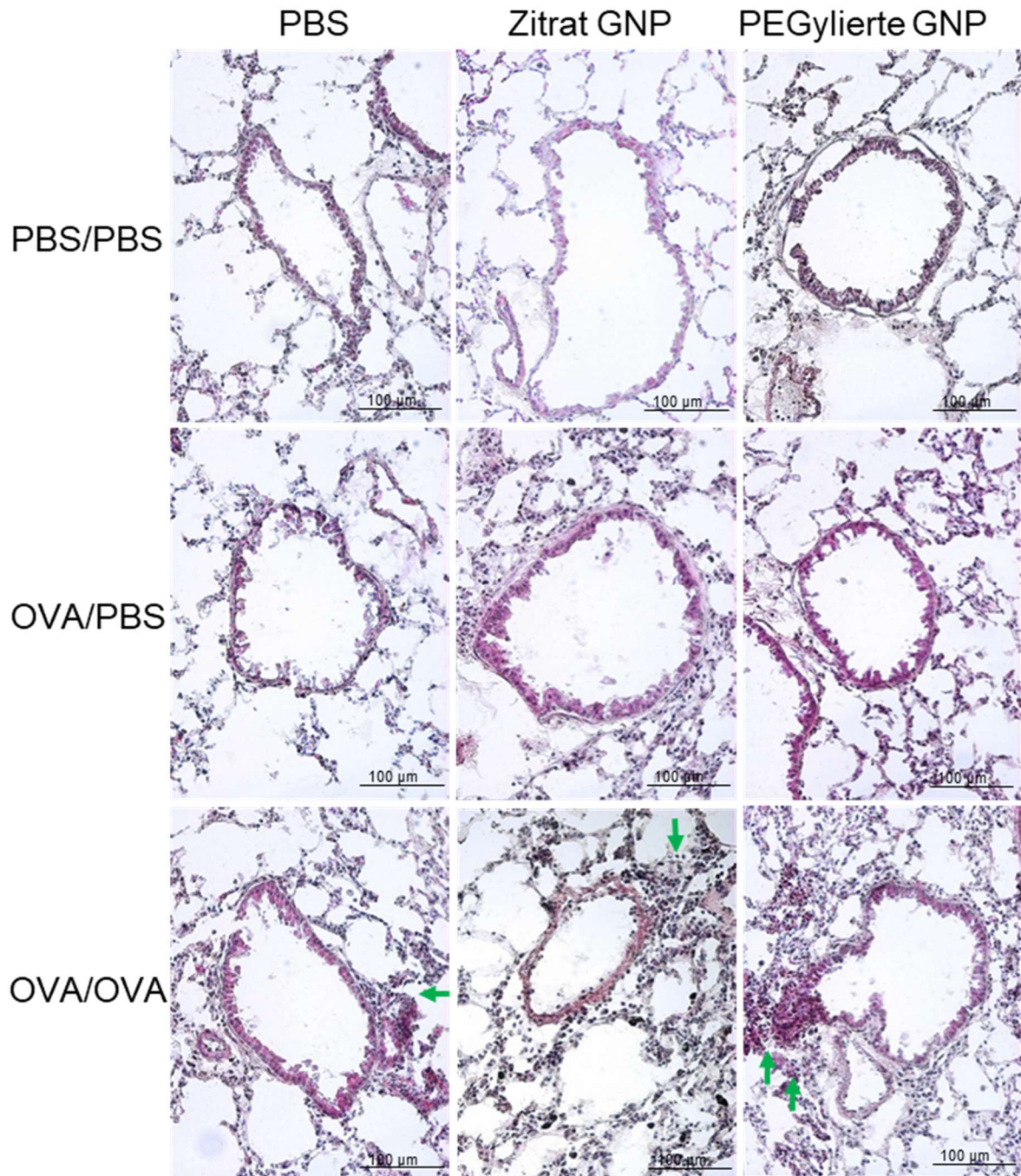


Abbildung 11: Repräsentative Bilder von HE gefärbten Lungenschnitten (20x Objektiv). Deutlicher Anstieg der Anzahl an Immunzellen (grüne Pfeile) in den Asthma-Gruppen (OVA/OVA) im Vergleich zu Gruppen ohne OVA-Challenge (PBS/PBS und OVA/PBS). Keine deutlichen Unterschiede zwischen Gruppen ohne Nanopartikelbehandlung (PBS)) und mit Nanopartikelbehandlung (Zitrat-Gold-Nanopartikel bzw PEG-Gold-Nanopartikel) (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

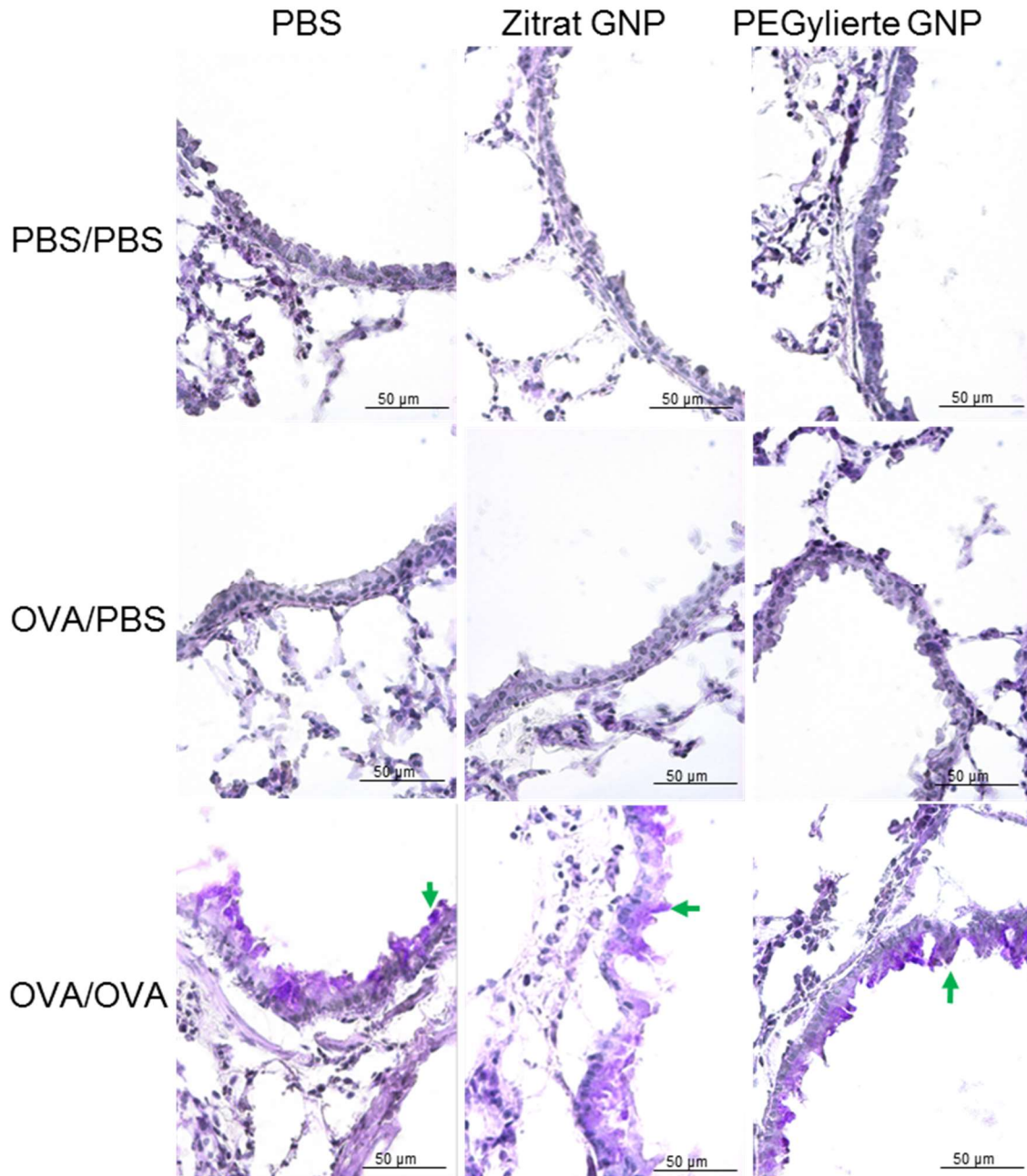


Abbildung 12: Repräsentative Bilder von Mucus-Anfärbung der unterschiedlichen Versuchsgruppen (PAS-Färbungen, 40x Objektiv). Starke Mucus-Sekretion (grüne Pfeile) in Lungenschnitten von OVA/OVA-Gruppen (Tiere mit Ova-Sensibilisierung und inhalative Ova-Challenge). Deutlich geringere Mucus-Sekretion in Kontrollgruppen ohne OVA-Challenge (PBS/PBS und OVA/PBS). Mucus-Sekretion unabhängig von fehlender (PBS) bzw. durchgeführten Nanopartikelbehandlung (Zitrat-Gold-Nanopartikel bzw. PEG-Gold-Nanopartikel) (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

4.3 BAL-Gesamtzellzahl

Quantitative Bestimmung der Entzündung in den 9 Versuchsgruppen anhand der BAL-Gesamtzellzahl:

Die BAL-Auszählung deckte sich mit den qualitativen Ergebnissen der HE- und PAS-Färbungen insoweit, dass alle drei Asthma-Gruppen (OVA/OVA/pbs, OVA/OVA/cit, und

OVA/OVA/peg) eine signifikant ($p < 0,01$) höhere Gesamtzahl an Immunzellen aufwiesen als Tiere ohne OVA/OVA-Behandlung (Abbildung 13).

Bemerkenswert ist der Vergleich der Asthmagruppen untereinander. Hier zeigten sich abhängig von der Nanopartikel-Therapie deutliche Unterschiede. Die Gesamtzellzahl an Immunzellen für die mit Zitrat-Nanopartikeln behandelten Asthma-Tiere (OVA/OVA/cit) war hochsignifikant ($p < 0,001$) reduziert im Vergleich zu Asthma-Tieren ohne Nanopartikelbehandlung (OVA/OVA/pbs).

Auch bei Behandlung mit den PEG-Nanopartikeln ist eine Zellzahl-reduzierende Wirkung der Nanopartikel bei Asthma-Tieren zu beobachten. Der Reduktion ist signifikant ($p < 0,05$) aber geringer ausgeprägt als bei den Zitrat-Gold-Nanopartikeln.

Bei Tieren ohne Asthma (PBS/PBS und OVA/PBS) kam es bei keiner der beiden Nanopartikel-Behandlungen zu signifikanten Zellzahlreduktionen.

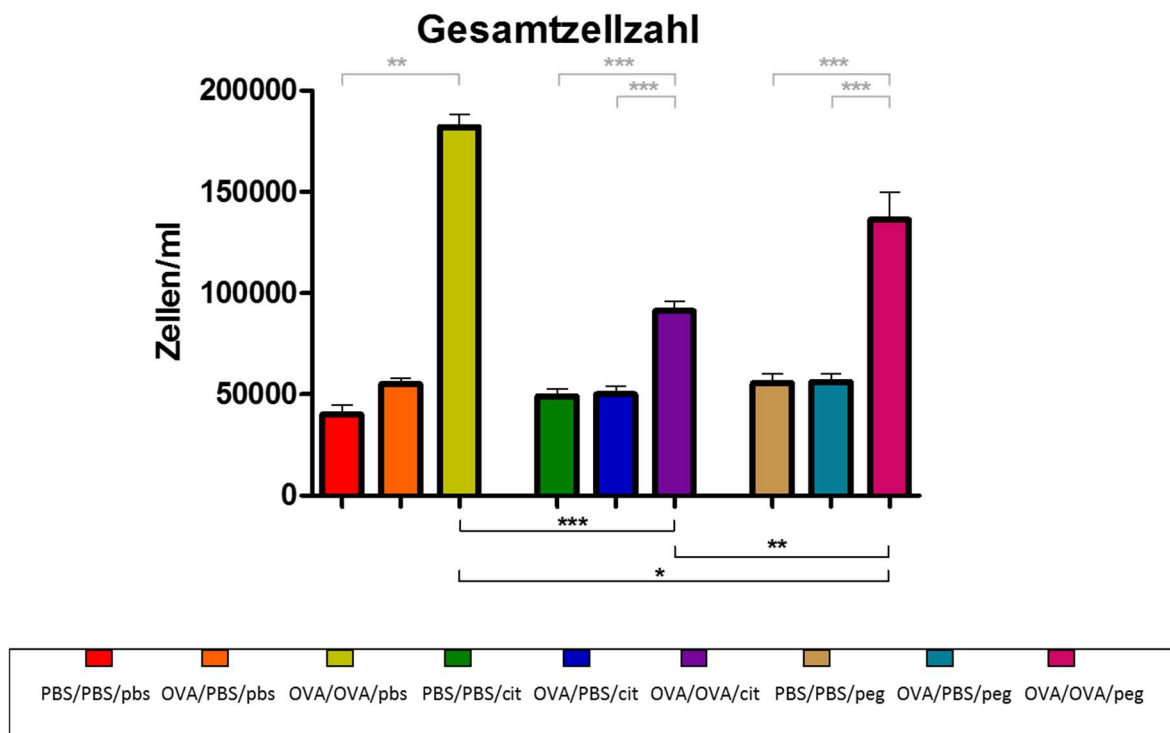


Abbildung 13: Gesamtzellzahl in der BAL in den 9 Versuchsgruppen. Verstärkte Entzündung bei Makrophagen und Eosinophilen in den OVA/OVA-Gruppen (Asthma-Gruppen) im Vergleich zu den PBS/PBS- und OVA/PBS-Gruppen (Kontrollgruppen). Die Gesamtzellzahl bei OVA/OVA/pbs liegt signifikant ($p < 0,01$) über PBS/PBS/pbs. OVA/OVA/cit und OVA/OVA/peg sind hoch signifikant ($P < 0,001$) über PBS/PBS/cit und PBS/PBS/peg. Antiinflammatorischer Effekt bei Zitrat-Nanopartikeln und bei PEG-Nanopartikeln führt zu niedrigeren Gesamtzellzahlen in der OVA/OVA/cit- ($p < 0,001$) der OVA/OVA/peg-Gruppe ($p < 0,05$) im Vergleich zur OVA/OVA/pbs-Gruppe. Signifikant stärkerer antiinflammatorischer Effekt auf die Gesamtzellzahl bei den Zitrat-Nanopartikeln im Vergleich zu den PEG-Nanopartikeln ($P < 0,01$) (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

4.4 Messung der Atemwegsreaktivität

Als weiterer Parameter der Atemwegsentszündung wurde die Reaktivität auf die Inhalation von Methacholinlösungen steigender Konzentration bestimmt.

Zur Auswertung wurde der Widerstand der Kanüle (Baseline) vom Gesamtwiderstand subtrahiert und das Ergebnis als Prozentanteil der Baseline ausgedrückt. Dieser Wert wurde logarithmisch gegen die Methacholinkonzentration geplottet und mittels linearer Regression gefittet.

Die Steigung dieser Geraden ist ein Maß für das Ansprechen des Atemwegswiderstands auf Methacholin.

Auswertung der logarithmisch aufgetragenen Dosis-Wirkungs-Kurven nach Metacholininhalationen in den 9 Versuchsgruppen:

Betrachtet man die verschiedenen Geradensteigungen als Maß der Atemwegsreaktivität auf Methacholin, so zeigt sich das gleiche Muster wie bei der Gesamtzellzahl. Es findet sich eine erhöhte Reaktivität bei den OVA/OVA Gruppen, welche durch zusätzliche Nanopartikelgabe abgemildert wird (Abbildung 14). Im Gegensatz zu den BAL-Zellzahlen stellt sich dieser Trend für die Atemwegsreaktivität jedoch nicht statistisch signifikant dar.

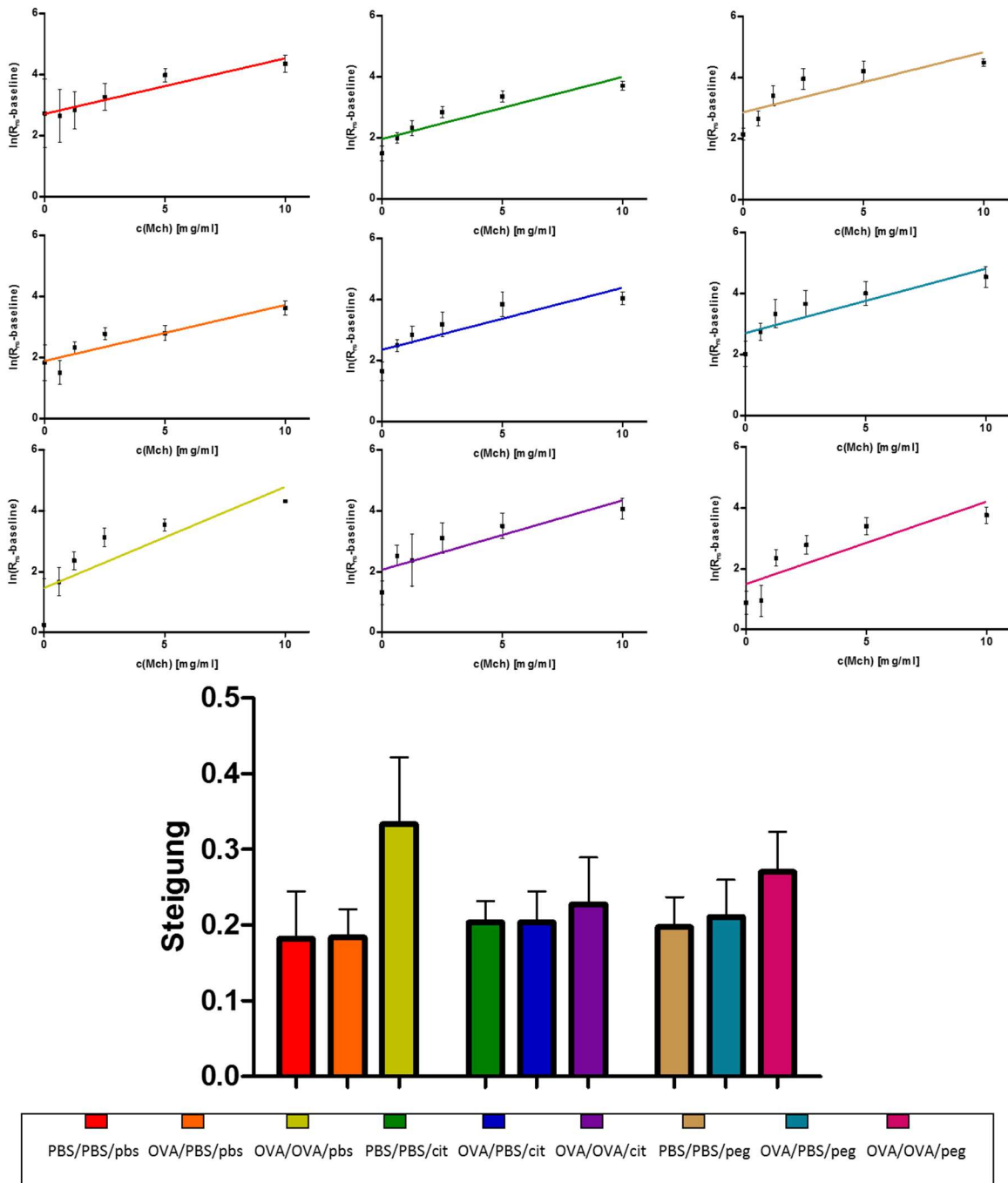


Abbildung 14: Die Atemwegsreaktivität auf Methacholin stellt sich als Steigung der logarithmisch aufgetragenen Dosis-Wirkungs-Kurven dar. Die Werte der jeweiligen Steigungen sind im Balkendiagramm zusammengefasst. Die höchste Steigung (und damit Reaktivität) zeigte sich bei der Asthma-Gruppe ohne Nanopartikel-Behandlung (OVA/OVA/pbs). Die Asthma-Gruppen mit Gold-Nanopartikel-Behandlung (OVA/OVA/cit und OVA/OVA/peg) waren dagegen nur leicht erhöht. Beim Vergleich der Atemwegsreaktivität zwischen den Gruppen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Gesamtzellzahl in der BAL (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

4.5 Histologischer Nachweis von Gold-Nanopartikeln

Hierfür wurden Kryoschnitte der Lunge histologisch auf Gold-Nanopartikel untersucht.

Erwartungsgemäß zeigten sich nur bei Tieren, die mit Nanopartikeln behandelt worden waren, intrazelluläre schwarze Ablagerungen, die durch Versilberung mit einem Autometallographie-Kit für Nanopartikel deutlicher differenziert werden konnten.

Um zu beweisen, dass es sich bei den schwarzen Ablagerungen tatsächlich um agglomerierte Gold-Nanopartikel handelt, wurde für beide verabreichte Nanopartikelformen je eine der schwarzen Ablagerungen in Kryoschnitten ohne Deckglas lichtmikroskopisch dargestellt und anschließend die gleiche Stelle morphologisch im Rasterelektronenmikroskop (REM) aufgesucht und mithilfe von Röntgenfluoreszenz (EDX) auf Goldbanden untersucht (Abbildung 15).

Sowohl im Präparat für Zitrat-, als auch in dem für PEG-Gold-Nanopartikel waren im Röntgenspektrum Banden für Gold nur in dem Bereich nachweisbar, in dem lichtmikroskopisch die schwarze Ablagerung zu sehen war.

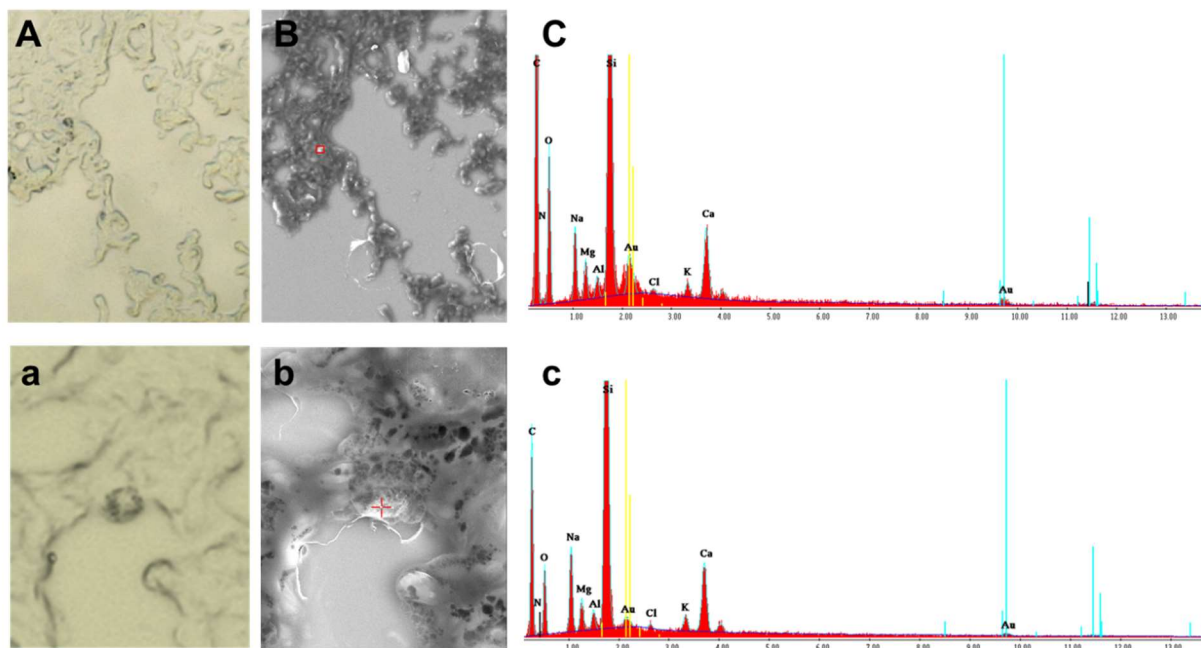


Abbildung 15: Um zu beweisen, dass es sich bei den schwarzen Ablagerungen in den lichtmikroskopischen Bildern (A) um Zitrat-Gold-Nanopartikel handelt, wurde derselbe Ausschnitt elektronenmikroskopisch dargestellt (B). An der rot markierten Position in B wurde ein EDX-Scan auf chemische Elemente durchgeführt. Das EDX-Spektrum (C) zeigte Gold-Signale und zwar nur an den Stellen, bei denen im Lichtmikroskop die schwarzen Ablagerungen zu sehen sind. (a), (b) und (c) zeigten analog das gleiche für PEG-Gold-Nanopartikel (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

Differenzierung von intrazellulären Gold-Nanopartikelablagerungen mittels Immunfluoreszenz:

Da die nachgewiesenen Ablagerungen der Gold-Nanopartikel eindeutig intrazellulär waren, wurde im nächsten Schritt mittels Immunfluoreszenz untersucht, von welchen Zellen die Nanopartikel aufgenommen wurden.

Es wurden CD11c-positive und F4/80-positive Zellen, Siglec-F-positive und CD11c-negative Zellen, Ly6G-positive Zellen, CD3ε-positive Zellen und CD45r-positive Zellen dargestellt (Abbildung 16).

Hauptsächlich fanden sich die Nanopartikelablagerungen in den CD11c-positiven und F4/80-positiven Zellen, in geringen Mengen aber auch in Siglec-F-positiven und CD11c-negativen Zellen.

In den restlichen identifizierten Zellpopulationen konnten trotz Kontrastierung mit dem Autometallographie-Kit keine Nanopartikelablagerungen nachgewiesen werden.

Diese Verteilung war sowohl bei Zitrat- als auch bei PEG-Gold-Nanopartikeln zu beobachten.

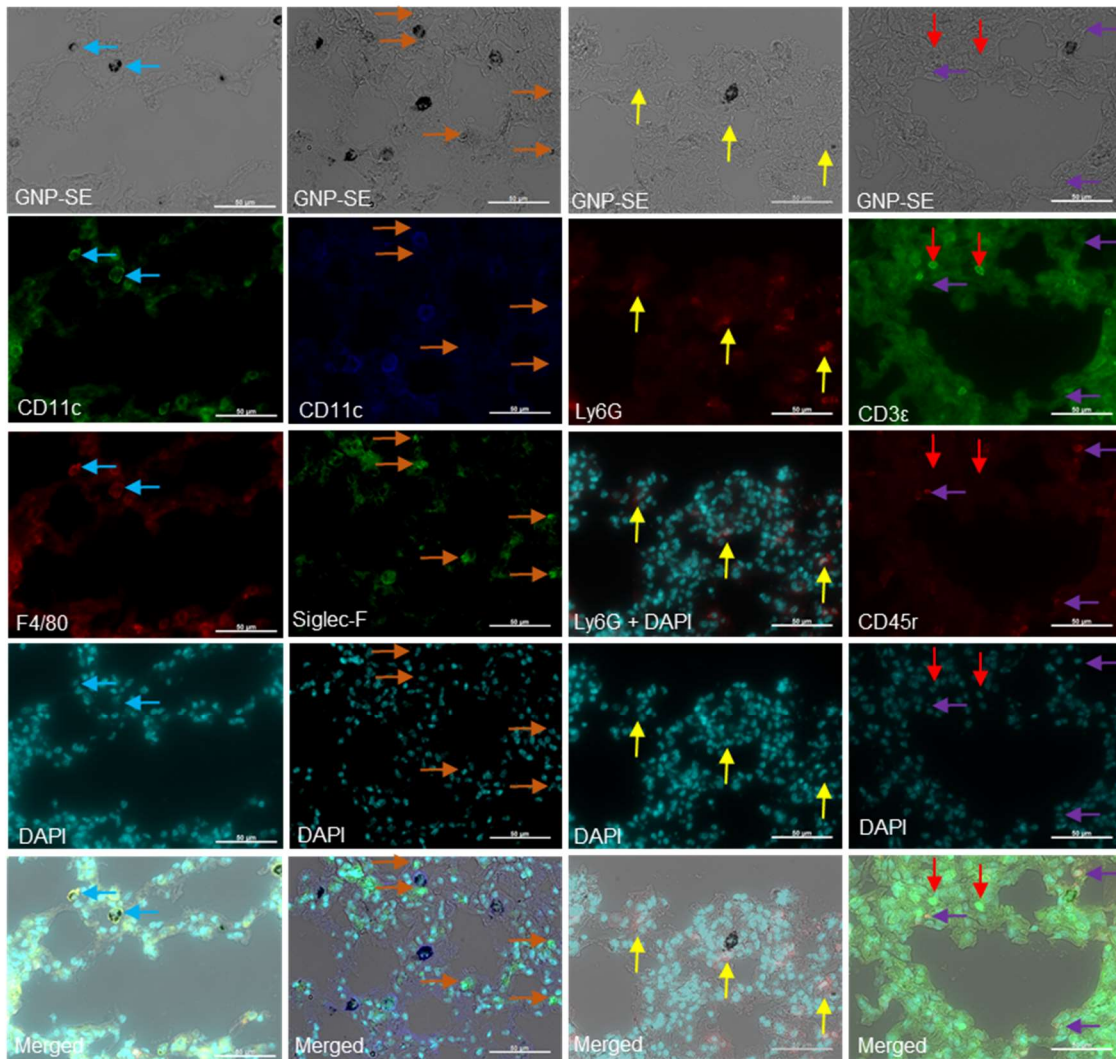


Abbildung 16: Immunofluoreszenzfärbung zur weiteren Differenzierung von intrazellulär gelegenen schwarzen Ablagerungen. Nachweis, dass die Zellen, welche die schwarzen Ablagerungen enthalten, CD11c und F4/80 positiv sind. Es handelt sich also wahrscheinlich um Alveolarmakrophagen. Geringe Mengen an schwarzen Ablagerungen wurden auch in Siglec-F positiven und CD11c negativen Zellen (wahrscheinlich Eosinophile) gefunden. Bei den restlichen Zellpopulationen wie den Ly6G positiven Zellen (vermutlich Neutrophile), den CD3 ϵ positive Zellen (vermutliche T-Lymphozyten) und den CD45r positiven Zellen (vermutlich B-Lymphozyten) lagen keine nachweisbaren Nanopartikelablagerungen vor (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

4.6 Aufnahme von Gold-Nanopartikeln in extrapulmonale Organe

Ziel unserer Studie war es, neben der Wirkung der Nanopartikel auf Atemwege und Lunge auch zu untersuchen, wie die Nanopartikelaufnahme in Organe außerhalb des Atmungssystems erfolgt.

Hierzu wurde mit ICP-MS die Goldkonzentration in den Lysaten verschiedener Organe bestimmt und über die Einwaage auf die Organe zurückgerechnet.

ICP-MS-Messung der Goldkonzentrationen in den extrapulmonalen Organen Herz, Niere, Gehirn, Milz und Leber in den verschiedenen Versuchsgruppen:

Es konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, dass Gold nur in Organen von Mäusen, welche mit Gold-Nanopartikeln behandelt worden waren, nachweisbar war. Die Menge an Gold-Nanopartikeln in den verschiedenen Gruppen und Organen ist in Abbildung 17 zusammengefasst. Bei der ICP-MS-Messung zeigte sich, dass die Goldkonzentration in extrapulmonalen Organen im ppb-Bereich liegt und damit für die PEG-Gold-Nanopartikel weniger als 0,1% der entsprechenden Konzentration in der Lunge beträgt, für die Zitrat-Gold-Nanopartikel sogar weniger als 0,01%. Außerdem wurde deutlich, dass sich die Nanopartikel nicht gleichmäßig auf die verschiedenen Organe verteilen. Die höchsten Gold-Konzentrationen wurden sowohl für Zitrat- (5-8 ppb) als auch PEG-Gold-Nanopartikel (10-34 ppb) im Herzen gefunden. In Niere, Gehirn und Milz zeigten sich in beiden Fällen deutlich geringere Konzentrationen. Bei der Leber zeigte sich ein gemischtes Bild. Die Aufnahme von Zitrat-Gold-Nanopartikeln in die Leber war verhältnismäßig gering (0,5-3 ppb), während sich bei den PEG-Gold-Nanopartikeln eine ähnlich hohe Aufnahme wie im Herzen (12-18 ppb) zeigte.

Für alle Organe zeigte sich insgesamt ein Trend zu einer höheren Aufnahme bei Mäusen mit einer durch OVA/OVA-Behandlung ausgelösten allergischen Atemwegsreaktion. Dies war besonders deutlich bei der Milz zu beobachten. Hier waren die gemessenen Gold-Konzentrationen bei Nicht-Asthma-Gruppen sehr gering (0,1 ppb für Zitrat und 0,3 ppb für PEG). In den OVA/OVA-Gruppen zeigte sich bei der Milz jedoch eine signifikant ($p < 0,05$ für Zitrat und $p < 0,01$ für PEG) höhere Goldaufnahme sowohl für die Zitrat-Gold-Nanopartikel (2,5 ppb) als auch für die PEG-Gold-Nanopartikel (7 ppb).

Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass die Oberflächenbeschichtung der Nanopartikel einen größeren Effekt auf die Aufnahme hat als der Asthma-Status der Mäuse. In allen Organen zeigte sich eine stärkere Aufnahme von PEG-Gold-Nanopartikeln im Vergleich zu den Zitrat-Gold-Nanopartikeln. Dies war mit einer absoluten Steigerung um mehr als 10 ppb in der Leber besonders signifikant ($p < 0,01$).

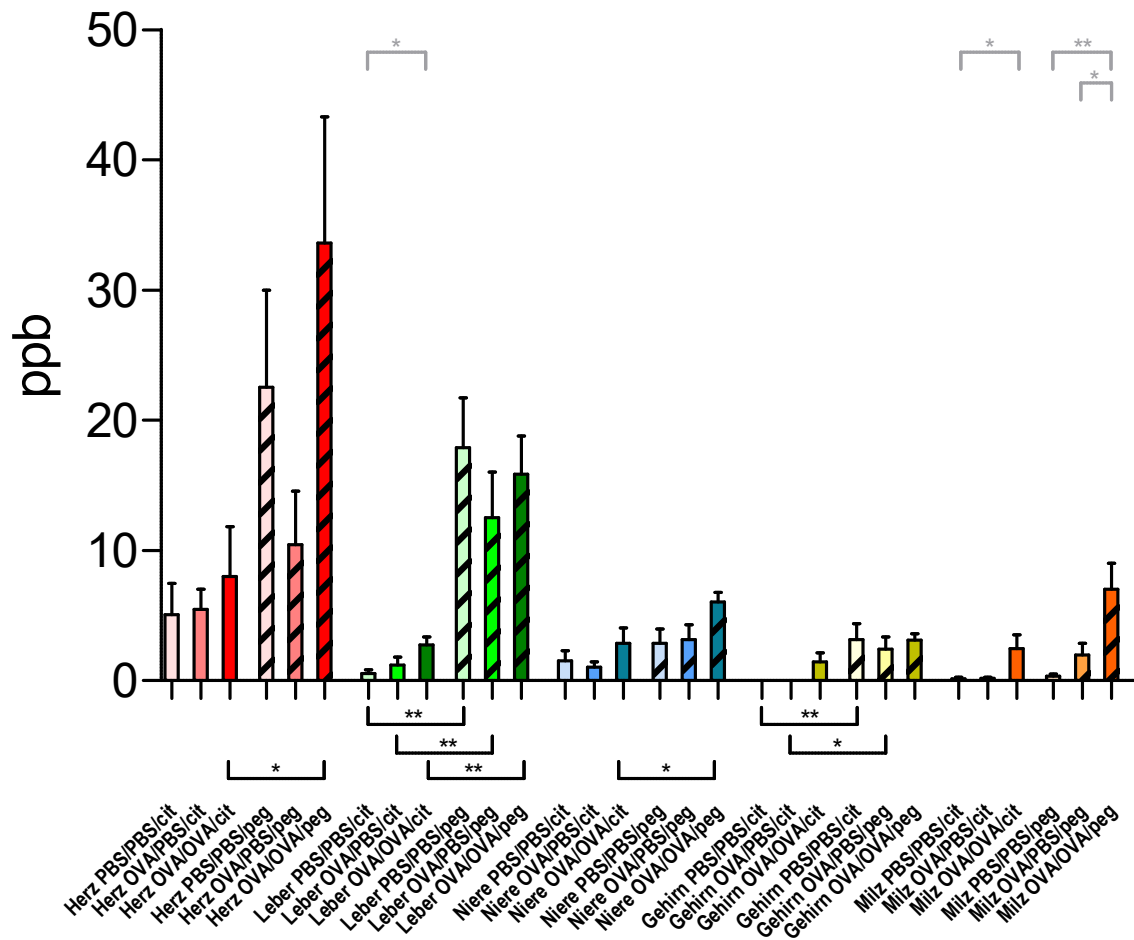


Abbildung 17: Goldgehalt (Masse Gold-Nanopartikel/Masse Organ in ppb) in den verschiedenen Organen in den mit Zitrat-Gold-Nanopartikeln (kein Muster) und PEG-Gold-Nanopartikeln (schraffiert) behandelten Gruppen. Gold-Nanopartikelmenge am höchsten im Herzen und am niedrigsten im Gehirn. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede in der Aufnahme zwischen PEG- und Zitrat-Nanopartikeln. Die grauen Balken zeigen signifikante Unterschiede in der Aufnahme zwischen Asthma-(OVA/OVA) und Nicht-Asthma- (PBS/PBS, OVA/PBS) Gruppen. Bei allen Organen war die Akkumulation bei den PEG-Gold-Nanopartikeln höher, besonders deutlich in Leber (signifikant bei $p < 0,01$). Trend zu stärkerer Nanopartikelaufnahme bei den Asthmagruppen (besonders deutlich in der Milz mit Signifikanz $p < 0,05$ für cit sowie $p < 0,01$ für peg). Die Gruppen ohne Nanopartikelbehandlung (PBS/PBS/pbs, OVA/PBS/pbs, und OVA/OVA/pbs) zeigten keine messbaren Gold-Mengen und sind deshalb im Diagramm nicht aufgeführt (modifiziert nach Omlor et al., 2017, Small).

5 Diskussion

5.1 Kritische Betrachtung dieser Arbeit im Vergleich mit bisherigen Publikationen

Im Gegensatz zu klassischen Materialien und Wirkstoffen müssen in der nanotoxikologischen Forschung neben der Zusammensetzung und Dosierung auch die Größenverteilung und die Nanostruktur bestimmt und kontrolliert werden, um die Vergleichbarkeit innerhalb der Studie und zu anderen wissenschaftlichen Arbeiten zu ermöglichen. Außerdem ist es aufgrund der Metastabilität von Nanopartikeln entscheidend, die Qualität der verwendeten Nanopartikel häufig und idealerweise unmittelbar vor Applikation zu überprüfen.

Gold-Nanopartikel besitzen ausgeprägte optische Absorptionseigenschaften, da sie durch Licht einer bestimmten Frequenz zu einer Plasmon-Schwingung angeregt werden können (Khlebtsov and Dykman, 2010). Weil die Resonanzfrequenz dieser Plasmon-Schwingung abhängig von dem Nanopartikeldurchmesser ist, kann aus dem UV-Vis-Spektrum einer Gold-Nanopartikellösung nicht nur über die Konzentration der Lösung, sondern auch über die Größenverteilung eine Aussage getroffen werden (Chen et al., 2008). Zitrat- und PEG-Gold-Nanopartikel können anhand ihrer Extinktion direkt verglichen werden, da der Extinktionskoeffizient in beiden Fällen $1,10 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ beträgt. Aufgrund der Ähnlichkeit der UV-Vis-Spektren (Abbildung 9) ist von vergleichbaren Konzentrationen in allen Proben auszugehen.

Über die Größenabhängigkeit der UV-Vis-Spektren konnte auch eine Agglomeration der Partikel während der Zubereitung, welche sich durch eine Abflachung der Kurve mit Rechtsverschiebung des Extinktionsmaximums dargestellt hätte, ausgeschlossen werden.

Eine LPS-Kontamination der Nanopartikel, welche das Asthmodell möglicherweise stark beeinflusst hätte, wurde mit einem kolorimetrischen LAL-Assay ausgeschlossen. In diesem Test wird durch das Endotoxin ein Enzym aktiviert, welches den Farbstoff p-Nitroanilin aus dem Substrat freisetzt. Die Konzentration von p-Nitroanilin kann nach einer festen Zeit im Bereich von 405 nm bis 410 nm photometrisch gemessen werden und ist im Bereich von 0,1 EU/mL und 1,0 EU/mL proportional zur LPS-Konzentration. Dieser Test wurde verwendet, weil er in der Literatur auch in Gegenwart von Nanopartikeln als zuverlässig beschrieben wurde (Smulders et al., 2012).

Applikationsform der Goldnanopartikel:

Die Nanopartikel-Applikation erfolgte intranasal. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da die intranasale Flüssigkeitsgabe bei Mäusen in der Literatur im Vergleich zur intratrachealen Gabe als ähnlich effektiv bei deutlich geringerer Invasivität beschrieben wurde (Ebino et al., 1999).

Ein wichtiges Anliegen unserer Arbeit war es, den Einfluss von Gold-Nanopartikeln auf Asthma zu untersuchen.

Wir wandten in unserer Versuchsreihe das murine OVA-Asthma-Modell, ein etabliertes und daher gut verstandenes Modell des allergischen Asthmas, an. Dieses Modell beruht im Grunde auf zwei Interventionen, der Sensibilisierung gegen das Allergen Ovalbumin (OVA) und der darauffolgenden inhalativen Provokation damit (Drazen et al., 1996; Foster et al., 1996; Herz et al., 1998; Joachim et al., 2006a).

Im Ergebnisteil konnte eingehend dargelegt werden, dass eine zusätzliche Behandlung mit Gold-Nanopartikeln bei Asthmaticern zu einer Abschwächung der Symptome führt. Am deutlichsten zeigte sich dies anhand der Gesamtzellzahl in der BAL (Abbildung 13). Die Reduktion der Gesamtzellzahl bei Tieren mit Asthma und Nanopartikelbehandlung im Vergleich zu Tieren mit Asthma ohne zusätzliche Nanopartikelbehandlung lassen sich als ein antiinflammatorischer Effekt der Gold-Nanopartikel, insbesondere der mit Ziträt beschichteten Partikel, deuten. Ein unselektiv zytotoxischer Mechanismus der Nanopartikel erscheint unwahrscheinlich, da in den nicht Asthmagruppen keine Reduktion der Zellzahl unter Nanopartikelbehandlung zu beobachten war.

Der insgesamt günstige Effekt der Gold-Nanopartikel auf die Asthmasymptome deutete sich auch in der Atemwegswiderstandsmessung unter Methacholinprovokation an.

In unserem Versuch wurde eine Auswertung mit linearer Regression bei logarithmischer Auftragung der Datenpunkte gewählt, wie sie in der Literatur beschrieben ist (Evans et al., 2003; Novali et al., 2015; Truchetti et al., 2014; Walker et al., 2012). Da die Geradensteigung als Maß der Atemwegsreaktivität auf diese Weise relative Änderungen misst, ist das Ergebnis verhältnismäßig stabil gegenüber äußeren Störeinflüssen. Solche Störfaktoren können in geringfügigen Unterschieden im Widerstand der verschiedenen eingesetzten Trachealkanülen oder in der unvermeidlichen Variabilität in der Trachealpräparation begründet sein. Da sich diese während der einzelnen Messrunden bei verschiedenen Methacholinkonzentrationen jedoch nicht verändern, beeinflussen sie zwar den absoluten Atemwegswiderstand, nicht jedoch die

relative Zunahme unter Methacholin, wie sie über die Geradensteigung erfasst wird. Insgesamt zeigte sich bei der Atemwegsreaktivität ein ähnliches Bild wie bei der BAL, nämlich eine Erhöhung bei Asthmaticern, welche durch Nanopartikelgabe wieder abgeschwächt wurde.

Dies spiegelt sich insbesondere in der ins Auge springenden Ähnlichkeit der beiden Säulendiagramme der Atemwegsreaktivität und der BAL-Gesamtzellzahl wider (Abbildung 13, Abbildung 14).

Wir gehen davon aus, dass der Zusammenhang zwischen Entzündungsbild bei der BAL und Atemwegsreaktivität, der auch in der Literatur mehrfach so beschrieben wurde (Barreto et al., 2015; Hussain et al., 2011), nicht zufällig sein kann.

In der Literatur gibt es nur zwei Arbeiten, welche den Einfluss von Gold-Nanopartikeln auf Asthma bei Mäusen beschreiben. Auf den ersten Blick sind diese Arbeiten widersprüchlich.

Barreto et al. untersuchten den Effekt von 12 nm großen Zitrat-Nanopartikeln in einem OVA-Asthma-Modell von Swiss-Webster und A/J-Mäusen. Hier zeigte sich wie in unserer Studie eine Reduktion der Entzündung und Atemwegsreagibilität durch die Nanopartikel (Barreto et al., 2015).

In der anderen Studie untersuchten Hussain et al. den Einfluss von 40 nm großen Zitrat-Gold-Nanopartikeln auf Toluoldiisocyanat(TDI)-induziertes Asthma bei Balb/c-Mäusen. In diesem Fall verstärkten die Nanopartikel sowohl Entzündung als auch Atemwegsreagibilität (Hussain et al., 2011).

In beiden Studien wurden Nanopartikel verwendet, die zwar einen deutlich abweichenden Partikeldurchmesser aufwiesen, jedoch in der Oberflächenchemie unseren 5 nm-Zitrat-Gold-Nanopartikeln ähnlich waren.

Barreto et al. führten die gegensätzliche Wirkung der Nanopartikel auf die unterschiedlichen Entzündungsprofile im TDI- und OVA-Asthmamodell zurück.

Aus unserer Sicht könnten jedoch auch die unterschiedlichen Nanopartikel-Durchmesser entscheidend dafür sein, ob ein antiinflammatorischer oder proinflammatorischer Effekt resultiert. Als Indiz hierfür kann eine Studie von Sumbayev et al. herangezogen werden, in der *in vitro* an humanen THP-1-Leukämiezellen und *in vivo* an C57BL/6-Mäusen gezeigt wurde, dass Gold-Nanopartikel größenabhängig die inflammatorische Antwort auf Interleukin 1 β reduzieren (Sumbayev et al., 2013). In dieser Studie wurden Zitrat-Gold-Nanopartikel der

Größe 5 nm, 15 nm und 35 nm verwendet. Die 5 nm-Partikel unterdrückten die Entzündungsantwort am stärksten, in geringerem Maß wirkten auch die 15 nm-Partikel antiinflammatorisch, wohingegen die 35 nm-Partikel keinen signifikanten Effekt erkennen ließen.

Sowohl die 5 nm-Gold-Nanopartikel unserer Studie als auch die 12 nm-Partikel von Barreto liegen demnach in einem Größenbereich, der laut Sumbayev antiinflammatorisch wirkt, während die 40 nm-Gold-Nanopartikel aus der Studie von Hussain sogar jenseits des Durchmessers liegen, bei dem Sumbayev keine entzündungshemmende Wirkung mehr fand.

Eine Erklärung für die Aggravierung durch 40 nm-Gold-Nanopartikel wäre, dass im Größenbereich jenseits der 35 nm die antiinflammatorische Wirkung nicht nur wegfällt, sondern zunehmend auch proinflammatorische Effekte an Einfluss gewinnen.

Als Mechanismus für die entzündungshemmende Wirkung der Gold-Nanopartikel wurde von Sumbayev et al. eine aggregierende Wirkung der Nanopartikel auf das Interleukin 1 β angenommen. Hierdurch würde die Anzahl an freien Interleukin-1 β -Molekülen, welche am Rezeptor wirken können, erniedrigt. Inwiefern dieser Mechanismus so auch auf ein komplexes Asthmamodell übertragen werden kann, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

In der Literatur wurde bei Makrophagenzellkulturen bei Behandlung mit Gold-Nanopartikeln in den meisten Studien keine verstärkte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine gesehen (Shukla et al., 2005; Zhang et al., 2011). Yen et al. zeigten jedoch eine verstärkte Freisetzung von IL-1, IL-6 und TNF- α durch Makrophagen bei Behandlung mit Gold-Nanopartikel (Yen et al., 2009). Eine mögliche Erklärung für diese konträren Aussagen könnte darin liegen, dass es sich bei den Gold-Nanopartikeln von Yen et al um „nackte“, unbeschichtete Partikel ohne eine Oberflächenstabilisierung wie in den anderen Fällen handelt. Solche unbeschichteten Partikel können im Vakuum aus Gold-Dampf erzeugt werden. Dies unterstreicht, wie wichtig die Oberflächenbeschichtung für die Nanopartikelwirksamkeit ist.

Wie im Ergebnissteil ausführlich dargestellt, konnten Gold-Nanopartikel lichtmikroskopisch als schwarze Ablagerungen dargestellt werden. Obwohl das Autometallographie-Kit nur Nanopartikel aus Gold, Silber und einigen Metallsulfiden und Seleniden kontrastieren kann (Danscher, 1984), musste zum definitiven Nachweis, dass es sich bei den Ablagerungen tatsächlich um Agglomerate der Gold-Nanopartikel handelt, eine Elementanalytik auf Gold erfolgen. Hierzu wurde eine REM-EDX Analyse durchgeführt. Hier kam erschwerend hinzu, dass dieselbe Ablagerung sowohl im Licht- als auch im Elektronmikroskop dargestellt werden musste. Um beide Verfahren am gleichen Präparat anwenden zu können, musste im Lichtmik-

roskop auf das Deckglas und im Elektronenmikroskop auf die Fixierung verzichtet werden. Dies hatte zur Folge, dass in der Lichtmikroskopie die Schärfe reduziert war und sich in der Elektronenmikroskopie bei längerer Messung der Fokus ins Präparat eingebrannt hat. Nichtsdestotrotz war die Bildqualität letztendlich ausreichend, um einer schwarzen Ablagerung in der Lichtmikroskopie ein EDX-Spektrum mit Gold-Banden in der Elektronenmikroskopie zuzuordnen und damit zu beweisen, dass es sich bei den schwarzen Ablagerungen um Gold-Nanopartikel handelt (Abbildung 15).

Nanopartikelablagerungen konnten in unserer Versuchsanordnung zum einen in den CD11c-positiven und F4/80-positiven Zellen, darüber hinaus in deutlich geringerem Maße auch in den Siglec-F-positiven und CD11c-negativen Zellen gefunden werden (Abbildung 16).

Bei Mäusen werden Alveolarmakrophagen in der Literatur als CD11c-positiv und F4/80-positiv beschrieben (Guilliams et al., 2013; Misharin et al., 2013; Zaynagetdinov et al., 2013), Eosinophile als Siglec-F-positiv und CD11c-negativ (Abdala Valencia et al., 2016; Bochner, 2009; Guo et al., 2011; Song et al., 2009). Somit wären genau diese beiden Zelltypen, welche in der BAL unter Nanopartikelbehandlung in ihrer Anzahl reduziert wurden, auch diejenigen Zellpopulationen, welche die Nanopartikel hauptsächlich aufnehmen.

Dass CD3 ϵ -positive Zellen, vermutlich T-Lymphozyten, und CD45r-positive Zellen, vermutlich B-Lymphozyten, keine lichtmikroskopisch detektierbare Mengen an Gold-Nanopartikeln phagozytiert haben, war zu erwarten. Erstaunlich war jedoch die Tatsache, dass Ly6G-positiven Zellen, bei denen es sich laut Literatur wahrscheinlich um Neutrophile handelt (Daley et al., 2008), nicht relevant an der Nanopartikelaufnahme beteiligt waren, obwohl gerade die Neutrophilen Granulozyten immunologisch die wichtigsten Mikrophagen darstellen.

Warum die Eosinophilen, welche zwar grundsätzlich zur Phagozytose fähig sind, insgesamt jedoch zu den weniger bedeutenden Phagozyten zählen, in Bezug auf die Nanopartikel offensichtlich kompetentere Phagozyten sind als die Neutrophilen, bleibt unklar und sollte Gegenstand weiterer Studien werden.

Es muss hier auch kritisch angemerkt werden, dass die Nanopartikelablagerungen, insbesondere bei starker Kontrastierung mit dem Autometallographie-Kit, die Immunfluoreszenz abschwächen. Es mussten daher Objektträger ausgewählt werden, bei denen die Versilberung intensiv genug war, um die Nanopartikelablagerungen gut darstellen zu können, ohne jedoch die Immunfluoreszenz zu stark zu verdunkeln.

Weitergehende Untersuchungen zur Aufnahmekinetik der Gold-Nanopartikel und die Berücksichtigung verschiedener Makrophagen-Subpopulationen sind derzeit Thema weiterer Forschungsprojekte in unserem Arbeitskreis und sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass sich die PEG-beschichteten Gold-Nanopartikel in Bezug auf zelluläre Aufnahme und Agglomeration offensichtlich nicht grundlegend von den Zitrat-beschichteten Gold-Nanopartikeln unterscheiden. Aufgrund der ausgeprägten Resistenz der PEG-Gold-Nanopartikel gegen Verklumpung in Lösungen mit hoher Ionenstärke war initial nicht damit gerechnet worden, in der Histologie Agglomeration von PEG-beschichteten Gold-Nanopartikeln zu finden. Im Gegensatz hierzu verklumpen die Zitrat-beschichteten Gold-Nanopartikel sehr schnell bei Erhöhung von Nanopartikelkonzentration und/oder Ionenstärke, wie sie zum Beispiel bei Evaporation auftreten (Abbildung 8). Auch die Ionenstärke physiologischer Kochsalz- sowie 0,1M PBS-Lösung ist ausreichend, um die Zitrat-Gold-Nanopartikel bei Vermischung innerhalb von Sekunden auszufällen. Dies war auch der Grund, warum die Nanopartikel nur in 0,4mM PBS-Lösung als Träger in die Mäuse appliziert worden sind.

Die höhere Stabilität der PEG-beschichteten Gold-Nanopartikel lässt sich anhand der Oberflächenchemie erklären (Abbildung 18). Bei den Zitrat-beschichteten Gold-Nanopartikeln ist die Oberfläche der Partikel mit Anionen von Zitronensäure und Tanninsäure besetzt. Die Abstoßung zwischen den Partikeln wird überwiegend durch die negative Ladung dieser Anionen bewirkt. Auch die Bindung zwischen den Anionen und der Goldoberfläche ist verhältnismäßig schwach. Im Gegensatz dazu ist die Oberfläche der PEG-beschichteten Gold-Nanopartikel mit Mercaptopolyethylenglycolsäure besetzt. Dieses Polymer verhindert eine Agglomeration nicht nur durch elektrostatische Abstoßung, sondern auch durch sterische Behinderung zwischen den einzelnen Partikeln (Tejamaya et al., 2012; Wulandari et al., 2015). Die sterische Interaktion verhindert die Zusammenlagerung auch dann, wenn die elektrostatische Abstoßung bei hoher Ionenstärke des Mediums zusammenbricht. Außerdem sind die Mercaptopolyethylenglycolsäuremoleküle durch starke kovalente Bindungen über ihre Thiolgruppen auf Goldatomen der Nanopartikeloberfläche verankert, wodurch die PEG-Beschichtung beständiger wird (Dykman and Khlebtsov, 2014).

Dass Bestandteile des Atemwegs-Mucus oder des Surfactants der Grund für die Agglomeration der PEG-Gold-Nanopartikel in Lungenschnitten waren, konnte ausgeschlossen werden. Eine Vermischung der PEG-Gold-Nanopartikel mit BAL-Flüssigkeit führte zu keiner Verklumpung der PEG-Nanopartikel *in vitro*.

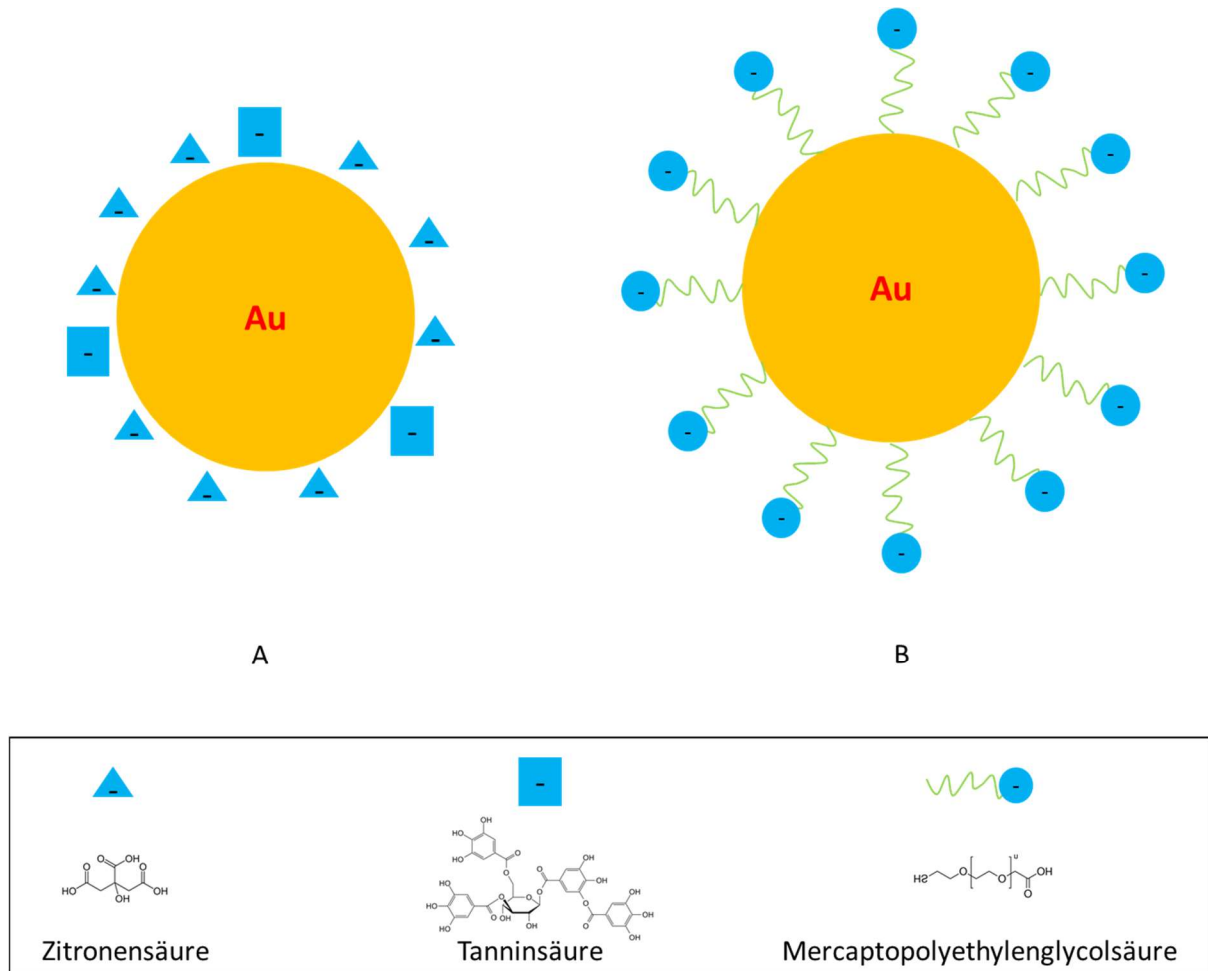


Abbildung 18: Schematischer Aufbau der Zitrat-beschichteten (A) und PEG-beschichteten Gold-Nanopartikel (B) im Vergleich. Bei den Zitrat-beschichteten Nanopartikeln befinden sich auf der Oberfläche die schwach gebundenen Anionen von Zitronen- und Tanninsäure. Bei den PEG-beschichteten Nanopartikeln ist Mercaptopolyethylenglycolsäure über einen Thiolanker fest mit dem Gold-Nanopartikelkern verknüpft.

Wir gehen daher davon aus, dass die Verklumpung der PEG-Gold-Nanopartikel erst nach Phagozytose intrazellulär stattfindet. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass der niedrige pH in den Lysosomen Polymerbeschichtungen von Nanopartikeln destabilisieren und abbauen kann (Chen et al., 2012; Kreyling et al., 2015; Soenen et al., 2010). Dies würde erklären, warum PEG-beschichtete Nanopartikel in physiologischen Umgebungen weniger inert sind, als oft angenommen wird.

Neben der Wirkung der Gold-Nanopartikel in Lunge und Atemwegen war auch die Frage nach einer potentiell systemischen Wirkung durch Aufnahme und Ablagerung in extrapulmonalen Organen ein wichtiger Teil dieser Arbeit. Dieser Aspekt erscheint uns deshalb relevant, da es so bei zukünftigen inhalativen Nanomedikamenten zu unerwünschten Nebenwirkungen in Organsystemen außerhalb des Atemtrakts kommen könnte. Andererseits könnte eine systemische Wirkung unter Umständen auch wünschenswert sein.

In diesem Zusammenhang erscheint es uns auch wichtig, die Nanopartikelaufnahme über die Lunge bei Individuen mit Atemwegsvorerkrankungen, was potentielle Barriere-Defekte impliziert, besser zu verstehen.

Die Beeinflussung der Nanopartikelauftnahmekinetik durch Vorerkrankungen der Atemwege ist bisher noch sehr wenig erforscht. Sie ist dennoch von erheblicher medizinischer Relevanz, nicht zuletzt im Hinblick auf die zunehmende ungewollte Nanopartikelexposition durch Umweltbelastungen im Rahmen des Einzugs der Nanotechnologie in unser Leben.

Bisherige Studien zeigten, dass die Luft-Blut-Schranke der Lunge vor allem für kleine und negativ geladene Nanopartikel passierbar ist (Choi et al., 2010). Aus diesem Grund wurden auch in unserem Experiment mit einem Kern-Durchmesser von 5 nm verhältnismäßig kleine Nanopartikel verwendet. Mithilfe von dynamischer Lichtstreuung (DLS) konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass der hydrodynamische Durchmesser sowohl der Zitrat-Gold-Nanopartikel mit 9 nm (bei einer Polydispersität von 29%) als auch der der PEG-Gold-Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 16 nm (bei einer Polydispersität von 22%) unter diesem Grenzwert von 34 nm liegen. Außerdem bestätigte eine Zeta-Potential-Messung, dass sowohl Zitrat- (-51 mV) als auch PEG-Gold-Nanopartikel (-43 mV) negative Oberflächenladungen aufweisen.

Wie im Ergebnissteil gezeigt, konnten sowohl die PEG-Beschichtung als auch die allergische Atemwegsentzündung als Faktoren identifiziert werden, welche die Nanopartikelaufnahme erhöhen.

Wir gehen davon aus, dass die erhöhte Aufnahme bei Entzündung des Atemsystems die Folge von Barrieredefekten und gesteigerter Perfusion ist. Hier sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig. Unsere Arbeit ist die erste Studie, welche den Einfluss eines Asthmodells auf die Nanopartikelaufnahme untersucht. Es gibt zwar eine publizierte Arbeit, in welcher der Effekt einer LPS-induzierten Lungenentzündung auf die Aufnahme von 40 nm-Zitrat-Gold-Nanopartikeln untersucht wurde, jedoch besteht hier nur eine begrenzte Vergleichbarkeit. Zum einen hat die LPS-induzierte Entzündung ein sehr unterschiedliches Immunprofil, zum anderen wurden mit 40 nm deutlich größere Nanopartikel verwendet. Nichtsdestotrotz zeigte sich in beiden Studien, dass die Entzündungsreaktionen die Nanopartikelaufnahme erhöhen.

Bemerkenswert ist hierbei, dass in beiden Fällen die Milz das Organ mit der deutlichsten Steigerung der Nanopartikelaufnahme in den Interventionsgruppen ist. Eine erhöhte Aufnah-

me infolge einer Barrierestörung würde dies nicht erklären, da hierbei alle Organe in ähnlicher Weise betroffen wären.

Als Erklärung könnte eine verstärkte Migration von mit Nanopartikeln beladenen Immunzellen zur Milz angenommen werden.

Alternativ wäre jedoch auch eine erhöhte Phagozytose von freien Nanopartikeln im Blut durch Immunzellen der Milz, welche durch eine systemische Entzündungskomponente der OVA-Reaktion aktiviert wurden, möglich.

Die Identifikation einzelner nanopartikelbeladener Zellen in der Milz mittels histologischer Methoden könnte hier zwar Aufklärung schaffen, war jedoch wegen eines zu hohen apparativen Aufwands in dieser Arbeit nicht realisierbar. Hierfür müssten Nanopartikel mit deutlich besserer Detektierbarkeit, z.B. durch Fluoreszenz oder Radioaktivität, verwendet werden.

Eine weitere wichtige Erkenntnis in unserer Arbeit war der Trend zur erhöhten Aufnahme der PEG-beschichteten Gold-Nanopartikel im Vergleich zu den Zitrat-beschichteten Gold-Nanopartikeln in der Lunge. Als Grund hierfür kann zum einen die in der Literatur beschriebene verbesserte Mucuspenetration von PEG-beschichteten Nanopartikeln angesehen werden (Ibricevic et al., 2013; Suk et al., 2014).

Wir gehen jedoch davon aus, dass auch die erhöhte Resistenz der PEG-beschichteten Gold-Nanopartikel gegen Agglomeration bei der erhöhten Aufnahme eine entscheidende Rolle spielt. Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PEG-beschichteten Gold-Nanopartikel die allergische Atemwegsreaktion weniger stark unterdrücken als die Zitrat-Gold-Nanopartikel. Im zweiten Teil der Arbeit wurde deutlich, dass die Aufnahme der PEG-Gold-Nanopartikel in extrapulmonale Organ größer ist als die der Zitrat-Gold-Nanopartikel. Möglicherweise ist das Agglomerationsverhalten die Erklärung für beide Phänomene. Durch eine stärkere und frühere Agglomeration der Zitrat-Nanopartikel kommt es zur Immobilisierung dieser Nanopartikel in Lunge und Atemwegen und damit zu einer stärkeren lokalen Wirkung bei gleichzeitig einer geringeren systemischen Aufnahme.

In einer anderen Studie, welche den Einfluss von Beschichtung radioaktiv markierter Gold-Nanopartikel mit 750 Da- und 10 kDa-PEG untersuchte, konnte keine erhöhte Aufnahme bei den PEG-beschichteten Partikeln gezeigt werden (Lipka et al., 2010). Allerdings wurden in dieser Studie nicht wie bei uns Zitrat-Gold-Nanopartikel sondern bis(p-Sulfonatophenyl)phenylphosphin-beschichtete Gold-Nanopartikel als Kontrollgruppen verwendet. Wir gehen davon aus, dass dies die geringen Unterschieden in der Aufnahme zwi-

schen PEG-Gruppen und Kontrollgruppe erklären könnte. Es konnte in einer weiteren Studie nämlich gezeigt werden, dass bis(p-Sulfonatophenyl)phenylphosphin die Agglomeration von Nanopartikeln bei hohen Salzkonzentrationen sehr viel effektiver verhindern kann als Zitrat (Jin et al., 2015). Somit verhalten sich bis(p-Sulfonatophenyl)phenylphosphin-beschichtete Gold-Nanopartikel in ihrer Stabilität ähnlich wie PEG-beschichtete Gold-Nanopartikel, während nur mit Zitrat beschichtete Partikel deutlich instabiler sind. Unter dieser Betrachtung sind die auf den ersten Blick widersprüchlichen Studien durchaus vereinbar. Auch bei diesem Aspekt wird deutlich, wie entscheidend die Oberflächenbeschichtung von Nanopartikeln für Verteilung und Wirkung im Organismus ist.

In unserer Arbeit konnte die komplexe Wechselwirkung von Gold-Nanopartikeln zweier unterschiedlicher Beschichtungen mit dem OVA-Asthmamodell herausgearbeitet werden. Es konnte eine insgesamt günstige Wirkung der Nanopartikel auf Asthma beobachtet werden. Umgekehrt führt jedoch die allergische Atemwegsreaktion zu einer verstärkten Aufnahme der Nanopartikel in extrapulmonale Organe, was bei der Entwicklung von zukünftigen Medikamenten auf Basis von Gold-Nanopartikeln berücksichtigt werden muss. Es zeigte sich auch, dass bei identischer Größe des Goldkerns die beiden unterschiedlichen Beschichtungen mit Zitrat und Polyethylenglykol zu signifikanten Unterschieden sowohl bei der antiinflammatorischen Wirkung im Atemtrakt, als auch bei der systemischen Aufnahme führten.

Diese Arbeit ist die erste Studie, welche den Einfluss des OVA-Asthmamodells auf die Aufnahme von Gold-Nanopartikeln in extrapulmonale Organe untersucht. Außerdem wurden erstmals in einem großen Tiermodell ein direkter Zusammenhang von therapeutisch gewünschter lokaler Wirkung und systemischer Aufnahme als potentielle Quelle von Nebenwirkungen hergestellt.

5.2 Ausblick

Für die therapeutische Anwendung von Gold-Nanopartikeln stellt insbesondere die fehlende Abbaubarkeit des Edelmetalls eine Hürde dar. Unter diesem Aspekt wären Nanopartikel aus biologisch abbaubaren Polymeren oder Liposomen günstiger. Inwiefern sich die antiinflammatorischen Effekte der Gold-Nanopartikel aber auf diese übertragen lassen, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

Der Nanokosmos konfrontiert uns mit vielen Phänomenen, die sich trotz aufwendiger Grundlagenforschung bislang nicht in allen Teilen entwirren und erklären lassen. Ähnlich wie bei der Entdeckung und Nutzbarmachung der Röntgenstrahlen offeriert uns die Nanotechnologie trotz ihrer Risiken ein neues faszinierendes Instrument für neue Therapieoptionen, sei es in der Tumorbekämpfung oder in der Entwicklung von beispielsweise effizienteren inhalativen Atemwegstherapeutika. Nehmen wir die Herausforderung an.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdala Valencia H, Loffredo LF, Misharin AV, Berdnikovs S (2016) Phenotypic plasticity and targeting of Siglec-F(high) CD11c(low) eosinophils to the airway in a murine model of asthma. *Allergy* 71:267-271
2. Ahn HK, Jung M, Sym SJ, Shin DB, Kang SM, Kyung SY, et al. (2014) A phase II trial of Cremophor EL-free paclitaxel (Genexol-PM) and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 74:277-282
3. Bao C, Conde J, Polo E, del Pino P, Moros M, Baptista PV, et al. (2014) A promising road with challenges: where are gold nanoparticles in translational research? *Nanomedicine (Lond)* 9:2353-2370
4. Barreto E, Serra MF, Dos Santos RV, Dos Santos CE, Hickmann J, Cotias AC, et al. (2015) Local Administration of Gold Nanoparticles Prevents Pivotal Pathological Changes in Murine Models of Atopic Asthma. *J Biomed Nanotechnol* 11:1038-1050
5. Bewersdorff T, Vonnemann J, Kanik A, Haag R, Haase A (2017) The influence of surface charge on serum protein interaction and cellular uptake: studies with dendritic polyglycerols and dendritic polyglycerol-coated gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 12:2001-2019
6. Bishop CJ, Kozielski KL, Green JJ (2015) Exploring the role of polymer structure on intracellular nucleic acid delivery via polymeric nanoparticles. *J Control Release* 219:488-499
7. Bochner BS (2009) Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors. *Clin Exp Allergy* 39:317-324
8. Braun NJ, DeBrosse MC, Hussain SM, Comfort KK (2016) Modification of the protein corona-nanoparticle complex by physiological factors. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 64:34-42
9. Brown CL, Whitehouse MW, Tiekink ER, Bushell GR (2008) Colloidal metallic gold is not bio-inert. *Inflammopharmacology* 16:133-137
10. Burkhard P, Karch CP (2017) Self-assembling protein nanoparticles: a promising tool against lethal influenza? *Nanomedicine (Lond)*
11. Burlaka AP, Sidorik YP, Prylutska SV, Matyshevskaya OP, Golub OA, Prylutskiy YI, et al. (2004) Catalytic system of the reactive oxygen species on the C60 fullerene basis. *Exp Oncol* 26:326-327

12. Chen C, Liu G, Liu X, Pang S, Zhu C, Lv L, et al. (2011) Photo-responsive, biocompatible polymeric micelles self-assembled from hyperbranched polyphosphate-based polymers. *Polymer Chemistry* 2:1389-1397
13. Chen C, Xing G, Wang J, Zhao Y, Li B, Tang J, et al. (2005) Multihydroxylated [Gd@C82(OH)22]_n nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity. *Nano Lett* 5:2050-2057
14. Chen H, Zou P, Connarn J, Paholak H, Sun D (2012) Intracellular dissociation of a polymer coating from nanoparticles. *Nano Research* 5:815-825
15. Chen S, Yang Y, Li H, Zhou X, Liu M (2014) pH-Triggered Au-fluorescent mesoporous silica nanoparticles for 19F MR/fluorescent multimodal cancer cellular imaging. *Chem Commun (Camb)* 50:283-285
16. Chen Y, Preece JA, Palmer RE (2008) Processing and characterization of gold nanoparticles for use in plasmon probe spectroscopy and microscopy of biosystems. *Ann N Y Acad Sci* 1130:201-206
17. Choi HS, Ashitate Y, Lee JH, Kim SH, Matsui A, Insin N, et al. (2010) Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol* 28:1300-1303
18. Choi MR, Stanton-Maxey KJ, Stanley JK, Levin CS, Bardhan R, Akin D, et al. (2007) A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Lett* 7:3759-3765
19. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE (2008) Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83:64-70
20. Danscher G (1984) Autometallography. A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochemistry* 81:331-335
21. Datta NR, Krishnan S, Speiser DE, Neufeld E, Kuster N, Bodis S, et al. (2016) Magnetic nanoparticle-induced hyperthermia with appropriate payloads: Paul Ehrlich's "magic (nano)bullet" for cancer theranostics? *Cancer Treat Rev* 50:217-227
22. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE (2008) Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29:1912-1919
23. Drazen JM, Arm JP, Austen KF (1996) Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med* 183:1-5

24. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA (2012) The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev* 41:2740-2779
25. Dutz S, Hergt R (2014) Magnetic particle hyperthermia--a promising tumour therapy? *Nanotechnology* 25:452001
26. Dwivedi PD, Tripathi A, Ansari KM, Shanker R, Das M (2011) Impact of nanoparticles on the immune system. *J Biomed Nanotechnol* 7:193-194
27. Dykman LA, Khlebtsov NG (2014) Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells. *Chem Rev* 114:1258-1288
28. Ebino K, Lemus R, Karol MH (1999) The importance of the diluent for airway transport of toluene diisocyanate following intranasal dosing of mice. *Inhal Toxicol* 11:171-185
29. Ema M, Tanaka J, Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, et al. (2012) Genotoxicity evaluation of fullerene C60 nanoparticles in a comet assay using lung cells of intratracheally instilled rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 62:419-424
30. Evans KL, Bond RA, Corry DB, Shardonofsky FR (2003) Frequency dependence of respiratory system mechanics during induced constriction in a murine model of asthma. *J Appl Physiol* (1985) 94:245-252
31. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG (1996) Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183:195-201
32. Golchin K, Golchin J, Ghaderi S, Alidadiani N, Eslamkhah S, Eslamkhah M, et al. (2017) Gold nanoparticles applications: from artificial enzyme till drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*:1-5
33. Gosens I, Post JA, de la Fonteyne LJ, Jansen EH, Geus JW, Cassee FR, et al. (2010) Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol* 7:37
34. Grzelczak M, Vermant J, Furst EM, Liz-Marzan LM (2010) Directed self-assembly of nanoparticles. *ACS Nano* 4:3591-3605
35. Guilliams M, Lambrecht BN, Hammad H (2013) Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunol* 6:464-473
36. Guo JP, Brummet ME, Myers AC, Na HJ, Rowland E, Schnaar RL, et al. (2011) Characterization of expression of glycan ligands for Siglec-F in normal mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44:238-243

37. Haruta M (2003) When gold is not noble: catalysis by nanoparticles. *Chem Rec* 3:75-87
38. Hergt R, Andra W, d'Ambly CG, Hilger I, Kaiser WA, Richter U, et al. (1998) Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles. *IEEE Transactions on Magnetism* 34:3745-3754
39. Herz U, Braun A, Ruckert R, Renz H (1998) Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 28:625-634
40. Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, et al. (2003) Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13549-13554
41. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4607-4612
42. Hrkach J, Von HD, Mukkaram AM, Andrianova E, Auer J, Campbell T, et al. (2012) Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Sci Transl Med* 4:128ra139
43. Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA (2006a) Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J Am Chem Soc* 128:2115-2120
44. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2006b) Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use of immunotargeted gold nanoparticles. *Photochem Photobiol* 82:412-417
45. Hussain S, Vanoirbeek JA, Haenen S, Haufroid V, Boland S, Marano F, et al. (2013) Prior lung inflammation impacts on body distribution of gold nanoparticles. *Biomed Res Int* 2013:923475
46. Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, De Vooght V, Verbeken E, Thomassen LC, et al. (2011) Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J* 37:299-309
47. Hutton GAM, Martindale BCM, Reisner E (2017) Carbon dots as photosensitisers for solar-driven catalysis. *Chem Soc Rev*
48. Ibricevic A, Guntsen SP, Zhang K, Shrestha R, Liu Y, Sun JY, et al. (2013) PEGylation of cationic, shell-crosslinked-knedel-like nanoparticles modulates inflammation and enhances cellular uptake in the lung. *Nanomedicine* 9:912-922

49. Jacobsen NR, Moller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, et al. (2009) Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Part Fibre Toxicol* 6:2
50. Jin P, Dai Z, Chang T (2015) The Role of Bis (p-Sulfonatophenyl) Phenylphosphine in Stabilizing Gold Nanoparticles.
51. Joachim RA, Cifuentes LB, Sagach V, Quarcoo D, Hagen E, Arck PC, et al. (2006a) Stress induces substance P in vagal sensory neurons innervating the mouse airways. *Clin Exp Allergy* 36:1001-1010
52. Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D, Dinh T, Arck PC, Klapp BF (2006b) Upregulation of tumor necrosis factor-alpha by stress and substance p in a murine model of allergic airway inflammation. *Neuroimmunomodulation* 13:43-50
53. Kang SG, Zhou G, Yang P, Liu Y, Sun B, Huynh T, et al. (2012) Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by Gd@C82(OH)₂₂ and its implication for de novo design of nanomedicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:15431-15436
54. Karra N, Nassar T, Ripin AN, Schwob O, Borlak J, Benita S (2013) Antibody conjugated PLGA nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel palmitate: efficacy and biofate in a lung cancer mouse model. *Small* 9:4221-4236
55. Khlebtsov N, Dykman L (2011) Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem Soc Rev* 40:1647-1671
56. Khlebtsov NG, Dykman LA (2010) Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 111:1-35
57. Kim EM, Jeong HJ (2017) Current Status and Future Direction of Nanomedicine: Focus on Advanced Biological and Medical Applications. *Nucl Med Mol Imaging* 51:106-117
58. Konstan MW, Davis PB, Wagener JS, Hilliard KA, Stern RC, Milgram LJ, et al. (2004) Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution. *Hum Gene Ther* 15:1255-1269
59. Kramer L, Winter G, Baur B, Kuntz AJ, Kull T, Solbach C, et al. (2017) Quantitative and correlative biodistribution analysis of ⁸⁹Zr-labeled mesoporous silica nanoparticles intravenously injected into tumor-bearing mice. *Nanoscale*
60. Kreyling WG, Abdelmonem AM, Ali Z, Alves F, Geiser M, Haberl N, et al. (2015) In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 10:619-623

61. Kreyling WG, Hirn S, Moller W, Schleh C, Wenk A, Celik G, et al. (2014) Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS Nano* 8:222-233
62. Kyjovska ZO, Jacobsen NR, Saber AT, Bengtson S, Jackson P, Wallin H, et al. (2014) DNA damage following pulmonary exposure by instillation to low doses of carbon black (Printex 90) nanoparticles in mice. *Environ Mol Mutagen*
- 63.
64. Lai X, Wei Y, Zhao H, Chen S, Bu X, Lu F, et al. (2015) The effect of Fe O and ZnO nanoparticles on cytotoxicity and glucose metabolism in lung epithelial cells. *J Appl Toxicol*
65. Leeson PD, Springthorpe B (2007) The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov* 6:881-890
66. Leu D, Manthey B, Kreuter J, Speiser P, DeLuca PP (1984) Distribution and elimination of coated polymethyl [2-¹⁴C]methacrylate nanoparticles after intravenous injection in rats. *J Pharm Sci* 73:1433-1437
67. Li B, Ze Y, Sun Q, Zhang T, Sang X, Cui Y, et al. (2013a) Molecular mechanisms of nanosized titanium dioxide-induced pulmonary injury in mice. *PLoS One* 8:e55563
68. Li Q, Hu X, Bai Y, Alattar M, Ma D, Cao Y, et al. (2013b) The oxidative damage and inflammatory response induced by lead sulfide nanoparticles in rat lung. *Food Chem Toxicol* 60:213-217
69. Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, Alexander HR, Jr., Gannon WE, Walker M, et al. (2010) Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin Cancer Res* 16:6139-6149
70. Lin EH, Chang HY, Yeh SD, Yang KY, Hu HS, Wu CW (2013) Polyethyleneimine and DNA nanoparticles-based gene therapy for acute lung injury. *Nanomedicine* 9:1293-1303
71. Lipka J, Semmler-Behnke M, Sperling RA, Wenk A, Takenaka S, Schleh C, et al. (2010) Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials* 31:6574-6581
72. Liu Y, Jiao F, Qiu Y, Li W, Lao F, Zhou G, et al. (2009) The effect of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-alpha mediated cellular immunity. *Biomaterials* 30:3934-3945
73. Loo C, Lin A, Hirsch L, Lee MH, Barton J, Halas N, et al. (2004) Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Technol Cancer Res Treat* 3:33-40

74. Mar Encabo-Berzosa M, Sancho-Albero M, Sebastian V, Irusta S, Arruebo M, Santamaria J, et al. (2017) Polymer functionalized gold nanoparticles as non-viral gene delivery reagents. *J Gene Med*
75. Mazzolini J, Weber RJ, Chen HS, Khan A, Guggenheim E, Shaw RK, et al. (2016) Protein Corona Modulates Uptake and Toxicity of Nanoceria via Clathrin-Mediated Endocytosis. *Biol Bull* 231:40-60
76. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GR, Perlman H (2013) Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49:503-510
77. Morton JG, Day ES, Halas NJ, West JL (2010) Nanoshells for photothermal cancer therapy. *Methods Mol Biol* 624:101-117
- 78.
79. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 8:543-557
80. Novali M, Shalaby KH, Robichaud A, Benedetti A, Fereydoonzad L, McGovern TK, et al. (2015) Mechanical consequences of allergic induced remodeling on mice airway resistance and compressibility. *Respir Physiol Neurobiol* 218:11-20
81. Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. (2005) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* 2:8
82. Omlor AJ, Le DD, Schlicker J, Hannig M, Ewen R, Heck S, et al. (2017) Local Effects on Airway Inflammation and Systemic Uptake of 5 nm PEGylated and Citrated Gold Nanoparticles in Asthmatic Mice. *Small* 13
83. Omlor AJ, Nguyen J, Bals R, Dinh QT (2015) Nanotechnology in respiratory medicine. *Respir Res* 16:64
84. Ortega MT, Riviere JE, Choi K, Monteiro-Riviere NA (2017) Biocorona formation on gold nanoparticles modulates human proximal tubule kidney cell uptake, cytotoxicity and gene expression. *Toxicol In Vitro* 42:150-160
85. Pankhurst Q, Thanh N, Jones S, Dobson J (2009) Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 42:224001
86. Perez-Hernandez M, Del Pino P, Mitchell SG, Moros M, Stepien G, Pelaz B, et al. (2015) Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprisms. *ACS Nano* 9:52-61

87. Raimondi F, Scherer GG, Kotz R, Wokaun A (2005) Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis. *Angew Chem Int Ed Engl* 44:2190-2209
88. Ravikumar P, Menon JU, Punnakitikashem P, Gyawali D, Togao O, Takahashi M, et al. (2016) Nanoparticle facilitated inhalational delivery of erythropoietin receptor cDNA protects against hyperoxic lung injury. *Nanomedicine* 12:811-821
89. Romer I, White TA, Baalousha M, Chipman K, Viant MR, Lead JR (2011) Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. *J Chromatogr A* 1218:4226-4233
90. Rubio L, Annangi B, Vila L, Hernandez A, Marcos R (2015) Antioxidant and anti-genotoxic properties of cerium oxide nanoparticles in a pulmonary-like cell system. *Arch Toxicol*
91. Sadhukha T, Wiedmann TS, Panyam J (2013) Inhalable magnetic nanoparticles for targeted hyperthermia in lung cancer therapy. *Biomaterials* 34:5163-5171
92. Sanna V, Pala N, Sechi M (2014) Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer. *Int J Nanomedicine* 9:467-483
93. Saputra D, Yoon JH, Park H, Heo Y, Yang H, Lee EJ, et al. (2014) Inhalation of carbon black nanoparticles aggravates pulmonary inflammation in mice. *Toxicol Res* 30:83-90
94. Semmler-Behnke M, Kreyling WG, Lipka J, Fertsch S, Wenk A, Takenaka S, et al. (2008) Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small* 4:2108-2111
95. Seydoux E, Rodriguez-Lorenzo L, Blom RA, Stumbles PA, Petri-Fink A, Rutishauser BR, et al. (2016) Pulmonary delivery of cationic gold nanoparticles boost antigen-specific CD4 T Cell Proliferation. *Nanomedicine*
96. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M (2005) Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir* 21:10644-10654
97. Singer JM, Adlersberg L, Sadek M (1972) Long-term observation of intravenously injected colloidal gold in mice. *J Reticuloendothel Soc* 12:658-671
98. Smulders S, Kaiser JP, Zuin S, Van Landuyt KL, Golanski L, Vanoirbeek J, et al. (2012) Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. *Part Fibre Toxicol* 9:41

99. Soenen SJ, Himmelreich U, Nuytten N, Pisanic TR, 2nd, Ferrari A, De Cuyper M (2010) Intracellular nanoparticle coating stability determines nanoparticle diagnostics efficacy and cell functionality. *Small* 6:2136-2145
100. Song DJ, Cho JY, Miller M, Strangman W, Zhang M, Varki A, et al. (2009) Anti-Siglec-F antibody inhibits oral egg allergen induced intestinal eosinophilic inflammation in a mouse model. *Clin Immunol* 131:157-169
101. Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ (2008) Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev* 37:1896-1908
102. Stern JM, Solomonov VV, Sazykina E, Schwartz JA, Gad SC, Goodrich GP (2015) Initial Evaluation of the Safety of Nanoshell-Directed Photothermal Therapy in the Treatment of Prostate Disease. *Int J Toxicol*
103. Stone V, Johnston H, Clift MJ (2007) Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience* 6:331-340
104. Suk JS, Kim AJ, Trehan K, Schneider CS, Cebotaru L, Woodward OM, et al. (2014) Lung gene therapy with highly compacted DNA nanoparticles that overcome the mucus barrier. *J Control Release* 178:8-17
105. Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, et al. (2013) Gold nanoparticles downregulate interleukin-1beta-induced pro-inflammatory responses. *Small* 9:472-477
106. Sung JH, Ji JH, Park JD, Song MY, Song KS, Ryu HR, et al. (2011) Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 8:16
107. Takenaka S, Moller W, Semmler-Behnke M, Karg E, Wenk A, Schmid O, et al. (2012) Efficient internalization and intracellular translocation of inhaled gold nanoparticles in rat alveolar macrophages. *Nanomedicine (Lond)* 7:855-865
108. Tang J, Huang N, Zhang X, Zhou T, Tan Y, Pi J, et al. (2017) Aptamer-conjugated PEGylated quantum dots targeting epidermal growth factor receptor variant III for fluorescence imaging of glioma. *Int J Nanomedicine* 12:3899-3911
109. Tejamaya M, Romer I, Merrifield RC, Lead JR (2012) Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ Sci Technol* 46:7011-7017
110. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M (2010) An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci Total Environ* 408:999-1006

111. Tran TH, Nguyen HT, Phuong Tran TT, Ku SK, Jeong JH, Choi HG, et al. (2017) Combined photothermal and photodynamic therapy by hyaluronic acid-decorated polypyrrole nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*
112. Truchetti G, Troncy E, Robichaud A, Gold L, Schuessler T, Maghezzi S, et al. (2014) Respiratory mechanics: comparison of Beagle dogs, Gottingen minipigs and Cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Toxicol Methods* 70:48-54
113. Walker JK, Kraft M, Fisher JT (2012) Assessment of murine lung mechanics outcome measures: alignment with those made in asthmatics. *Front Physiol* 3:491
114. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WC (2012) Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J Am Chem Soc* 134:2139-2147
115. Walkey CD, Olsen JB, Song F, Liu R, Guo H, Olsen DW, et al. (2014) Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano* 8:2439-2455
116. Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27:612-616
117. Wang H, Zheng L, Peng C, Shen M, Shi X, Zhang G (2013) Folic acid-modified dendrimer-entrapped gold nanoparticles as nanoprobes for targeted CT imaging of human lung adenocarcinoma. *Biomaterials* 34:470-480
118. Wang YF, Liu L, Xue X, Liang XJ (2017) Nanoparticle-based drug delivery systems: What can they really do in vivo? *F1000Res* 6:681
119. Whitwell H, Mackay RM, Elgy C, Morgan C, Griffiths M, Clark H, et al. (2016) Nanoparticles in the lung and their protein corona: the few proteins that count. *Nanotoxicology* 10:1385-1394
120. Wojnicki M, Luty-Blocho M, Bednarski M, Dudek M, Knutelska J, Sapa J, et al. (2013) Tissue distribution of gold nanoparticles after single intravenous administration in mice. *Pharmacol Rep* 65:1033-1038
121. Wulandari P, Nagahiro T, Fukada N, Kimura Y, Niwano M, Tamada K (2015) Characterization of citrates on gold and silver nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 438:244-248
122. Yang D, Zhao Y, Guo H, Li Y, Tewary P, Xing G, et al. (2010) [Gd@C(82)(OH)(22)](n) nanoparticles induce dendritic cell maturation and activate Th1 immune responses. *ACS Nano* 4:1178-1186

123. Yen HJ, Hsu Sh, Tsai CL (2009) Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 5:1553-1561
124. Yu B, Tai HC, Xue W, Lee LJ, Lee RJ (2010) Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Mol Membr Biol* 27:286-298
125. Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Kendall PL, Segal BH, Weller KP, Tighe RM, et al. (2013) Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49:180-189
126. Zhang Q, Hitchins VM, Schrand AM, Hussain SM, Goering PL (2011) Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators. *Nanotoxicology* 5:284-295
127. Zhou Z, Zhang C, Qian Q, Ma J, Huang P, Zhang X, et al. (2013) Folic acid-conjugated silica capped gold nanoclusters for targeted fluorescence/X-ray computed tomography imaging. *J Nanobiotechnology* 11:17