INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Ing. Andreas Comouth
aus Jena

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2012

Kontrollierte Deposition synthetischer Nanopartikel auf Lungenzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht für toxikologische Untersuchungen

Gutachter: **Prof. Dr. Thomas Leisner**
Prof. Dr. Henning Bockhorn

Kurzfassung

In der Dosimetrie und Charakterisierung relevanter Materialeigenschaften stoßen etablierte Expositionsverfahren zur Bewertung der toxischen Wirkung von nanoskaligen Partikeln an ihre Grenzen. Zur Untersuchung der Wirkung inhalierter Partikel wird daher zunehmend das Verfahren zur in vitro Exposition von Lungenzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde ein entsprechendes Expositionssystem aufgebaut, im Detail charakterisiert und für die Untersuchung von Nanopartikeln eingesetzt. Zur Vorhersage der Depositionseffizienzen wurde ein fluid-dynamisches Modell für Partikelgrößen zwischen 20 nm und 2 μm entwickelt und experimentell validiert. Die relativ geringe Depositionseffizienz der Expositionskammern von ca. 1% wurde durch ein elektrostatisches Feld um mehr als eine Größenordnung erhöht, so dass die Simulation akut erhöhter Partikelbelastungen möglich ist.

Die Funktionstüchtigkeit des Expositionssystems wurde mit luftgetragenen Metalloxidnanopartikeln (TiO_2, SiO_2) und Rußaerosol demonstriert. Dazu wurden verschiedene Aerosolerzeugungsverfahren getestet und die Aerosole insbesondere bezüglich ihres Agglomerationszustands und Residualpartikelanteils charakterisiert. Zur Bestimmung der deponierten Dosis wurden verschiedene Methoden untersucht und deren Anwendungsbereiche eingegrenzt. Die aus den Expositionsversuchen ermittelten wirksamen Dosen wurden mit realistischen Partikelbelastungen verglichen und den beobachteten Reaktionen der A549 Lungenzelllinie gegenübergestellt. Akute inflammatorische und zytotoxische Zellreaktionen wurden nur nach Exposition mit unnatürlich hohen Dosen an SiO_2 Nanopartikeln beobachtet.

Abstract

Established exposure procedures reach their limits in the assessment of toxic hazard of nanomaterials regarding dosimetry and characterisation of relevant material properties. Hence in vitro procedures for cell exposure of lung cells at the air liquid interface are used more frequently to evaluate the toxic impact of inhaled particles.

In this work an according exposure setup was build, characterized, and applied for the investigation of nanoparticles. In order to predict the deposition efficiency a fluid dynamic model was developed and validated for particle sizes between 20 nm and 2 μm. The deposition efficiency of the exposure chamber of about 1% was increased by more than one order of magnitude by applying an electrostatic field. This allows now simulation of acute increased particle levels.

The operational reliability of the exposure system was demonstrated with metal oxide nanoparticles and soot aerosols. Various procedures for aerosol generation were tested. Agglomeration state and residual fraction of the particles were characterized. Different methods for determination of deposited doses and their range of application were investigated. The effective dose values determined in exposure experiments were compared to realistic particle loadings of human lungs and related to reactions of A549 lung cells. Acute inflammatory and cytotoxic cell reactions were only observed after exposure to extremely high doses of SiO_2 nanoparticles.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

2 Biologischer Hintergrund **3**
2.1 Dosimetrie und relevante Dosisgrößen 7
2.2 Zellmodellsysteme für *in vitro* Versuche 8
2.3 Submerse Exposition 9
2.4 Exposition an der Luft - Flüssigkeits - Grenzschicht 10
2.5 Biologische Endpunkte 12

3 Methodische Grundlagen **14**
3.1 Nanopartikel 14
3.1.1 Kinetik der Agglomeratbildung 16
3.1.2 Verfahren zur Deagglomeration 17
3.1.3 Methoden zur Stabilisierung flüssiger Suspensionen 18
3.2 Deposition luftgetragener Nanopartikel auf Lungenzellen 22
3.2.1 Aerosolerzeugung mit dem Elektrospray und Atomizer . . 23
3.2.2 Aerosolcharakterisierung und Dosisbestimmung 25
3.3 Simulation der Depositionseffizienz 30

4 Aufbau, Modellierung und Versuchsdurchführung **35**
4.1 Aerosolerzeugung und Charakterisierung 35
4.1.1 Erzeugung stabiler Partikelsuspensionen 37
4.1.2 Synthese von SiO_2 Partikeln zur direkten Exposition . . . 39
4.1.3 Charakterisierung der Agglomerat- und Residualanteile . . 41
4.2 Aufbau der Expositionseinheit 43
4.2.1 Modifikation der Expositionskammer zur elektrostatischen Deposition von Nanopartikeln 45
4.2.2 Messung der Depositionseffizienz 46
4.2.3 Simulation der Depositionseffizienz 48
4.3 Durchführung der Expositionsversuche 51
4.3.1 Blindversuche mit Partikelfreier Luft 51
4.3.2 Exposition mit SiO_2 Nanopartikeln 52
4.3.3 Exposition mit TiO_2 Nanopartikeln 55
4.3.4 Exposition mit Kohlenstoffpartikeln 55

5 Resultate **58**
5.1 Residual- und Agglomeratanteil der Aerosole 58
5.1.1 Stabilisierte kommerzielle Suspensionen 59
5.1.2 Resuspendierte Metalloxide aus der Gasphasensynthese . . 65

5.1.3 Flüssigabgeschiedene SiO_2 Partikel aus der Mikrowellenplasmasynthese . . . 72
5.1.4 Direkte Erzeugung von SiO_2 Nanopartikeln für Expositionsversuche . . . 76
5.1.5 Reproduzierbarkeit und Stabilität der Aerosole . . . 79
5.2 Agglomeratstruktur der Aerosolpartikel . . . 81
5.3 Zellverträglichkeit der Anlage . . . 88
5.4 Depositionseffizienz der Expositionskammer ohne Elektrode . . . 92
5.4.1 Größenabhängigkeit der Depositionseffizienz . . . 93
5.4.2 Dichteabhängigkeit der Depositionseffizienz . . . 96
5.4.3 Depositionseffizienz fraktalähnlicher Agglomerate . . . 98
5.4.4 Experimentelle Validierung der Simulation . . . 99
5.5 Depositionseffizienz mit Elektrode . . . 103
5.6 Zytotoxische und Inflammatorische Wirkung verschiedener Nanopartikel . . . 108
5.6.1 SiO_2 Partikel . . . 109
5.6.2 TiO_2 Partikel . . . 117
5.6.3 Kohlenstoff Partikel . . . 119
5.7 Diskussion der Ergebnisse . . . 123
5.7.1 Gefahr durch Nanopartikel? . . . 126

6 Zusammenfassung **127**

7 Ausblick **130**

1 Einleitung

Aufgrund ihrer besonderen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften werden Nanopartikel in einer Vielzahl von Verfahren und Produkten angewendet. Sie ermöglichen unter anderem die Herstellung und Entwicklung neuer Verbundwerkstoffe mit besonderen mechanischen, thermischen, magnetischen oder elektrischen Eigenschaften [Wegner et al., 2004]. Die vielen Vorteile bei der Anwendung nanoskaliger Materialien sind unumstritten. Epidemiologische Studien belegen allerdings auch eine gesundheitsschädliche Wirkung durch inhalierte feine und ultrafeine Partikel [Ibald-Mulli et al., 2002], [Pope et al., 2004], [Pope and Dockery, 2006], [Stoelzel et al., 2007], [Pope et al., 2009]. Die zunehmende Anwendung von Nanopartikeln erfordert daher auch eine sinnvolle Risikobewertung der damit einhergehenden Exposition von Mensch und Umwelt. Da Partikel dieser Größenordnung in der Lage sind im alveolaren Bereich des Atemtrakts zu deponieren und dort nur eine sehr dünne Epithelbarriere vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass die Lunge eine der wesentlichen Pforten für Nanopartikel in den menschlichen Körper darstellt [Society, 2004], [Curwin and Bertke, 2011]. Die epidemiologischen Studien geben allerdings keinen Aufschluss über die für eine gesundheitsschädliche Wirkung verantwortlichen Partikeleigenschaften oder Wirkmechanismen. Das Aufstellen gesetzlicher Regularien im Umgang mit Nanomaterialien zum wirksamen Schutz der Bevölkerung und von Arbeitnehmern erfordert aber gerade ein Verständnis der zugrundeliegenden physiologischen Wirkmechanismen. Neben der Beurteilung der Exposition durch spezifische Partikelsorten ist dabei insbesondere die Bestimmung des toxischen Potentials zur Bewertung der von ihnen ausgehenden Gefahr erforderlich. Aus diesem Grund machte sich das durch die Deutche Forschungsgemeinschaft, im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1313 geförderte, NANO-SYNCC Projekt (Nanoparticles: Synthesis, characterisation, and cellular effects) die Beurteilung der toxischen Wirkung von Nanopartikeln auf alveolare Epithelzellen und Makrophagen, sowie die Identifizierung der dafür verantwortlichen Partikelparameter und zugrundeliegenden Mechanismen zur Kernaufgabe. Da gasphasensynthetisierte Metalloxide derzeit die kommerziell relevantesten und neben Kohlenstoffverbindungen am häufigsten synthetisierten Nanomaterialien darstellen [Wegner et al., 2004], [Society, 2004] lagen sie im Fokus der im NANO-SYNCC Projekt durchgeführten Untersuchungen. Daher wurden vom Engler Bunte Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) maßgeschneiderte Metalloxidnanopartikel in einem niederdruck Flammensyntheseverahren hergestellt und charakterisiert [Nalcaci et al., 2011]. Die toxische Wirkung dieser Partikel wurde vom Institut für Toxikologie und Genetik des KIT durch die Exposition von Lungenzellen mit flüssigen Nanopartikelsuspensionen charakterisiert. Da das als submers bezeichnete Verfahren mit flüssigen Nanopartikelsuspensionen ein sehr unrealistsiches Expositionsszenario darstellt und die Partikeleigenschaften sowie deponierten Dosen

nur unzureichend charakterisiert werden können, wurde es in erster Linie als Auswahlprüfverfahren zur Identifizierung besonders toxisch wirkender Partikelsorten eingesetzt. Zur Untersuchung der toxischen Wirkung unter deutlich realistischeren und wohl definierten Bedingungen wurden, in Zusammenarbeit des Intituts für Meteorologie und Klimaforschung, sowie dem Institut für Technische Chemie des KIT, Expositionsversuche an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (ALI) mit den im Submersverfahren als besonders potent identifizierten Partikeln durchgeführt. Ein in dieser Arbeit behandelter Schwerpunkt liegt in der Bereitstellung der für ALI Expositionsversuche notwendigen Aerosole. Diese erfordern eine reproduzierbare Resuspendierung der gasphasensynthetisierten Partikel in einem über mehrere Stunden stabilen Aerosol mit einem definierten Agglomeratzustand. Weiterhin dürfen die Aerosole keine toxischen Gase, Nebendprodukte oder zu große Anteile an Residualpartikeln enthalten, welche die biologische Wirkung beeinflussen können. Aufgrund der schwachen Zellreaktionen nach einer Metalloxidnanopartikelexposition sind außerdem hohe Partikeldosen erforderlich. Da stabile Konzentrationen luftgetragener Partikel natürlichen Grenzen unterliegen ist ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit die Erhöhung der Depositionseffizienz einer kommerziell erhältlichen Expositionskammer durch ein elektrostatisches Feld. Des Weiteren wird eine auf dieser Expositionskammer basierende Expositionsanlage zur Durchführung von ALI Experimenten unter stabilen zellverträglichen Bedingungen vorgestellt. Insbesondere wird auf die Charakterisierung der Depositionseffizienz zur Bestimmung der deponierten Dosis eingegangen. Diese ist erforderlich zur Bestimmung der deponierten Dosis der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expositionsversuche

2 Biologischer Hintergrund

Mensch und Umwelt sind verschiedenen Partikeln aus natürlichen und anthropogenen Quellen ausgesetzt. Zu den natürlichen Quellen zählen unter anderem Waldbrände, Seesalzaerosole, biogene Stäube (Sporen, Pollen etc.) und Vulkane. Die größte anthropogene Fraktion bilden die in unvollständigen Verbrennungsprozessen entstehenden Kohlenstoff- bzw. Rußpartikel. Eine weitere, relativ neue, anthropogene Quelle stellen die in wachsendem Maße synthetisch hergestellten Nanomaterialien dar. Diese finden nicht nur in Verbundwerkstoffen eingebettet in einer festen Matrix Anwendung, sondern werden als ungebundene Nanopartikel auch in verbrauchsnahen Produkten wie Kosmetikartikeln, Medikamenten, Nahrungsmitteln, Textilien oder Farbstoffen eingesetzt. Mit dem zunehmenden Einsatz derartiger Produkte steigt auch die Exposition des Menschen. Nanopartikeln bieten sich dabei verschiedene Pforten in den menschlichen Körper. Die Anwendung in Textilien oder kosmetischen Produkten wie z.B. TiO_2 haltiger Sonnenmilch legt unter anderem eine Aufnahme über die Haut nahe. Ein Eintritt dieser nanoskaligen Partikel in den menschlichen Körper über gesunde Haut konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden [Society, 2004], [Butz et al., 2007], [Landsiedel et al., 2010]. Wahrscheinlicher ist dagegen eine Aufnahme über den Magen - Darm (gastroenteralen) Trakt z.B. durch den Verzehr von Nahrungsmitteln die nanoskaliges SiO_2 (E551) als Fließmittel enthalten [Hoffbauer, 2008]. Ebenfalls können durch intravenös verabreichte Nanokolloide, die als Kontrastmittel [Na et al., 2009] oder zur Bekämpfung inoperabler Tumoren [Grobe et al., 2008] in der Medizin Anwendung finden, hohe Partikelkonzentrationen in den menschlichen Körper gelangen. Die unter normalen Umständen größte Pforte für Nanopartikel stellt allerdings die Lunge dar [Curwin and Bertke, 2011], [Society, 2004], [Paur et al., 2011]. Insbesondere die in der Umgebungsluft enthaltene Fraktion ultrafeiner Partikel führt zu einer permanenten Exposition des Atemtrakts. Trotz der teilweise großen anthropogenen Partikelanteile in der Atemluft ist eine Exposition gegenüber synthetischen Nanopartikeln durch anwendernahe Produkte sehr unwahrscheinlich [Borm, 2002]. Für Arbeitnehmer der produzierenden und verarbeitenden Betriebe besteht allerdings die Gefahr einer erhöhten Exposition der Atemwege während der Herstellung und Verarbeitung derartiger Materialien. Die biologische Wirkung der inhalierten Materialien hängt dabei maßgeblich von der Größe, Struktur und chemischen Zusammensetzung des jeweiligen Partikels ab. Die Größe wirkt sich dabei direkt auf den Ort und die Effizienz der Abscheidung und somit die deponierte Dosis im Atemtrakt aus. Das Depositionsverhalten von Aerosolen in den Atemwegen ist daher Inhalt zahlreicher Studien und Veröffentlichungen [Yeh and Schum, 1980], [Peter A. Jaques, 2000], [Brown et al., 2002], [Daigle et al., 2003], [Asgharian et al., 2001], [Shi et al., 2004]. Ein weit verbreitetes Modell zur Beschreibung der in den verschiedenen Bereichen des Atemtrakts abgeschiedenen Partikelfraktionen wurde von der „International

Commission on Radiological Protection“ [ICRP, 1994] aufgestellt. Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für die daraus resultierenden Depositionseffizienzen in den unterschiedlichen Regionen des respiratorischen Trakts. Darin werden Partikel mit Durchmessern über 1 μm und unter 10 nm zum größten Teil bereits im Nasen - Rachenraum abgeschieden. Die dort existierenden Abwehrmechanismen, wie der durch die Schleimhäute gebildete Mucus (Schleim) oder die Haare des Nasenraums sorgen dabei für ein relativ schnelles Entfernen von Partikeln dieser Größenordnung. Partikel mit Durchmessern unter 1 μm scheiden sich dagegen zum größeren Teil in den tieferen Regionen der Atemwege ab. Im Bereich des

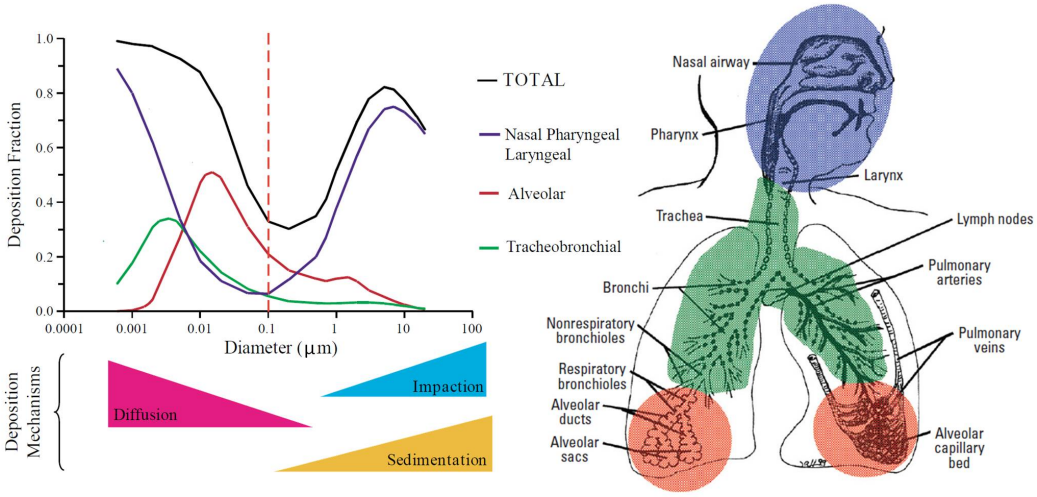


Abbildung 1: Deponierter Anteil inhalierter Partikel im Nasen - Rachenraum (blau), Tracheo - Bronchialraum (grün) und der alveolaren Region (rot) basierend auf dem ICRP Modell unter Annahme nasaler Atmung [ICRP, 1994]. Die Abbildungen wurden von Oberdörster et al. [2005] und Oberdörster et al. [2007] übernommen.

Tracheobronchialraums sorgen dabei die Zilien durch rhythmische Bewegungen (Zilienschlag) für einen schnellen Abtransport deponierter Partikel in den Nasen - Rachenraum, wo sie abgehustet oder verschluckt und dem gastroenteralen Trakt zugeführt werden (mukoziliare Reinigung). Der größere Anteil an feinen und ultrafeinen Partikeln deponiert jedoch in der alveolaren Region. Da in diesem Bereich der Lunge der Gasaustausch zwischen dem Lumen (Alveolarraum) und den Blutgefäßen stattfindet, besteht er nur aus einer sehr dünnen, mit einer oberflächenaktiven Flüssigkeitsschicht (Surfactant) überzogenen, Epithelschicht (Abbildung 2). Eine mukuziliäre Reinigung der Alveolen von Partikeln ist daher nicht möglich. Stattdessen sorgen Makrophagen, Epithelzellen und dendritische Zellen durch die Aufnahme von Partikeln (Phagozytose, Endozytose) für eine Beseitigung deponierter Partikel. Eine direkte Folge des Kontakts zwischen Epithelzellen oder Makrophagen und den deponierten Partikeln kann z.B. eine lokale Entzündungsreaktion sein. Die Zellen setzen dabei sogenannte Entzündungsme-

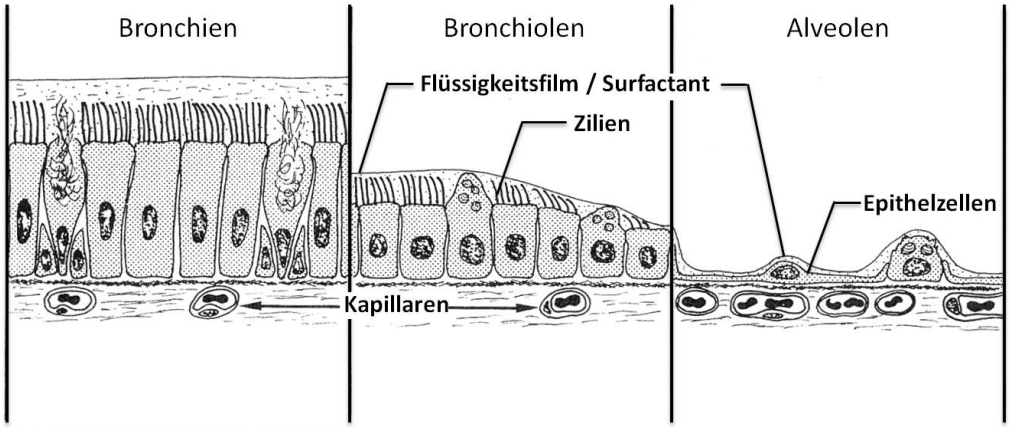


Abbildung 2: Die Epithelbarriere in verschiedenen Bereichen der menschlichen Lunge. Im Bereich der Bronchien und Bronchiolen sorgt eine Flimmerepithelschicht über rhythmische Bewegungen der Zilien für den Abtransport des Schleims und der darauf deponierten Partikel. Auf der in den Alveolen weniger als 1 μm dicken Epithelschicht sind keine Zilien vorhanden. Stattdessen versuchen Makrophagen deponierte Partikel aufzunehmen und zu beseitigen. Die Abbildung wurde von Gehr and Heyder [2000] übernommen.

diatoren wie z.B. Zytokine frei, die zur Aktivierung weiterer Immunzellen dienen [Baggiolini and Clark-Lewis, 1992]. Mit einer chronischen Aktivierung dieser Abwehrmechanismen, z.B. durch kristalline SiO_2 Partikel, werden aber auch verschiedene pathophysiologische Folgen, wie die Bildung eines Emphysems [Hoshino et al., 2007], einer Lungenfibrose (Silicose) oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen [Merget et al., 2002], assoziiert. Epidemiologische Studien weisen dabei neben diesen pulmonalen Reaktionen insbesondere auf eine Beeinflussung der kardiovaskulären Funktion hin. So zeigen unter anderem Pope et al. [2004] eine zunehmende kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei erhöhten Feinstaubbelastungen. Aus den Studien von Wichmann and Peters [2000] bzw. Ibald-Mulli et al. [2002] geht außerdem hervor, dass auch die Konzentration der ultrafeinen Partikelfraktion trotz geringer Massenanteile mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert werden kann. Verschiedene Veröffentlichungen belegen, dass Partikel dieser Größenordnung über unterschiedliche Translokationsmechanismen (Transzytose) in der Lage sind in die Blutzirkulation und somit in weitere Organe zu gelangen [Kreyling et al., 2002], [Semmler et al., 2004], [Oberdörster et al., 2005]. Abgesehen von indirekten Wirkungswegen durch die direkten pulmonalen Reaktionen könnten Nanopartikel somit auch in weiteren Systemen des Körpers, wie z.B. dem Herz-Kreislauf System, direkte Effekte induzieren (Abbildung 3).

Die zahlreichen epidemiologischen Studien mit einer Vielzahl an untersuchten Endpunkten, also beobachteten Wirkungen wie z.B. der Mortalität, Lebenserwartung oder Anzahl an Herzinfarkten, reichen alleine jedoch nicht für eine sinnvolle Risikoberwertung inhalierter Partikel aus. So zeigt sich am Beispiel des in

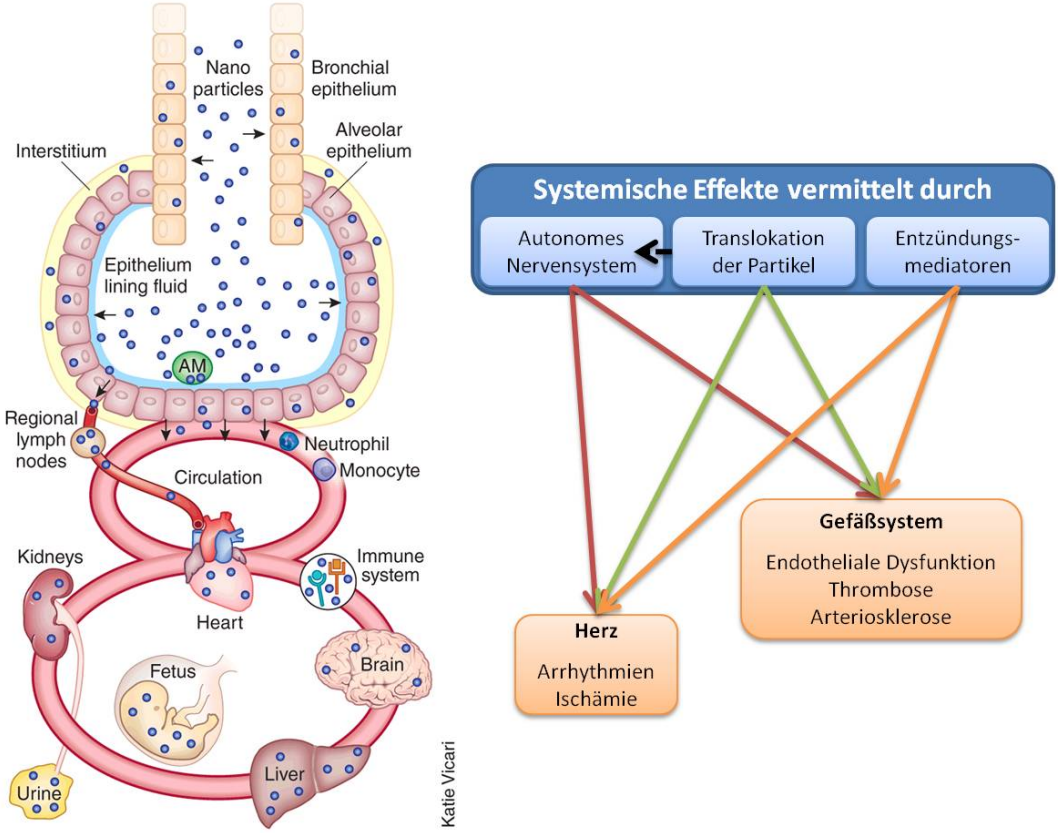


Abbildung 3: Eine mögliche Wirkungskaskade nach einer Inhalation von Nanopartikeln. Bei einer Abscheidung in den Alveolen können sie unter anderem von Alveolarmakrophagen (AM) aufgenommen werden. Als Folge könnten die dabei freigesetzten Entzündungsmediatoren indirekt weitere systemische Effekte induzieren. Die Translokation der Partikel in die Blutzirkulation ermöglicht aber auch eine direkte Exposition weiterer Systeme, die sich wiederum direkt oder indirekt, z.B. auf die kardiovaskuläre Funktion, auswirken könnten. Die linke Abbildung entstammt Kreyling et al. [2010]. Das rechte Schema wurde nach Lahl [2005] adaptiert.

der Inhalationstherapie eingesetzten Seesalzaerosols mit positiven Auswirkungen auf den respiratorischen Trakt, dass eine alleinige Betrachtung der Partikelgröße und Konzentration nicht für eine aussagekräftige Risikobewertung genügen. Vielmehr sind insbesondere für synthetische Nanopartikel die Auswirkungen spezifischer Partikeleigenschaften auf biologische Systeme und die Wahrscheinlichkeit einer Exposition für verschiedene Partikelsorten und Personengruppen individuell zu bewerten. Toxikologen stehen dabei verschiedene Verfahren zur Bewertung des von einem Material ausgehenden Gefährundgspotentials zur Verfügung. Diese Verfahren erlauben im Gegensatz zu epidemiologischen Studien auch eine Aufklärung der zugrundeliegenden Wirkmechanismen auf der zellulären und molekularen Ebene. Die gängigste Praxis zur Bewertung der toxischen Wirkung eines Materials ist die Durchführung von *in vivo* Versuchen. Dabei werden lebende Organismen mit dem vermeintlich toxischen Material exponiert. In der Regel handelt

es sich dabei um Tierversuche z.B. mit Ratten oder Mäusen. Ein großer Vorteil dieser Verfahren ist die Möglichkeit, Aussagen zur Wirkung einer Exposition auf ein intaktes System zusammenwirkender Organe eines lebenden Organismus in seiner gesamten Komplexität treffen zu können. Aufgrund der hohen Kosten und kontrovers geführten Diskussionen über die ethische Vertretbarkeit [Baumans, 2004] und Übertragbarkeit von Tierversuchen auf den Menschen, werden häufig auch sogenannte *in vitro* Verfahren zur Beurteilung der toxischen Wirkung einbezogen. Anstatt lebender Organismen werden in diesen Verfahren isolierte Zellen von Säugetieren exponiert. Obwohl Tierversuche nicht gänzlich durch *in vitro* Experimente ersetzt werden können, helfen sie bei der Aufklärung grundlegender Mechanismen möglicher toxischer Wirkungen und somit bei der Minimierung der erforderlichen *in vivo* Versuche. Die Expositionsversuche können dabei sowohl unter Submersbedingungen, als auch an der Luft - Flüssigkeitsgrenzschicht (engl. Air Liquid Interface - ALI) stattfinden.

2.1 Dosimetrie und relevante Dosisgrößen

Unabhängig von dem zur Beurteilung der toxischen Wirkung eingesetzten Verfahren erfordert die Bewertung der tatsächlich von einem Partikel ausgehenden Gefahr nicht nur die Messung der Wirkung (Endpunkt), sondern auch die Bestimmung der sie verursachenden Dosis. Auch in der Inhalations- und Nanotoxikologie ist der von Paracelsus formulierte Grundsatz „*Alle Ding sind Gift und nichts ohn Gift; allein die Dosis macht das ein Ding kein Gift ist*“ noch weitgehend gültig (Abbildung 4). Lediglich die für die biologische Wirkung relevante Dosisgröße kann sich von denen der klassischen Festkörper des gleichen Materials unterscheiden. So zeigt sich z.B. für nanoskalige Materialien, dass die biologische Wirkung eines Stoffes nicht nur von der applizierten Masse abhängt, sondern insbesondere durch die untereinander korrelierenden Parameter Partikelanzahl, Größe und Oberfläche beeinflusst wird. Verschiedene Arbeiten lassen dabei auf eine besondere Bedeutung der applizierten Oberflächendosis schliessen Oberdörster et al. [2005], [Schmid et al., 2009], [Brown et al., 2001]. Aufgrund des abnehmenden Oberflächen zu Volumenverhältnis bieten Nanopartikel bei gleicher Masse eine wesentlich größere Oberfläche zur Interaktion mit ihrer Umgebung. Diese Eigenschaft wird unter anderem bei der Verwendung von Nanopartikeln als Katalysator ausgenutzt. Die hohe spezifische Oberfläche ermöglicht aber auch eine verstärkte Wechselwirkung mit biologischen Systemen. Sie kann etwa zur Bildung einer erhöhten Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies, wie H_2O_2, OH oder O_2^- führen und somit verstärkten oxidativen Stress in Zellen induzieren [Nel et al., 2006]. Im Fall löslicher Nanopartikel ist dagegen davon auszugehen, dass die applizierte Oberfläche nicht die einzig relevante dosimetrische Größe zur Beurteilung der toxischen Wirkung eines Materials ist. Im Gegensatz zu den klassischen Fällen von großen Festkörpern, Lösungen oder Gasen, erfordert das Aufstellen

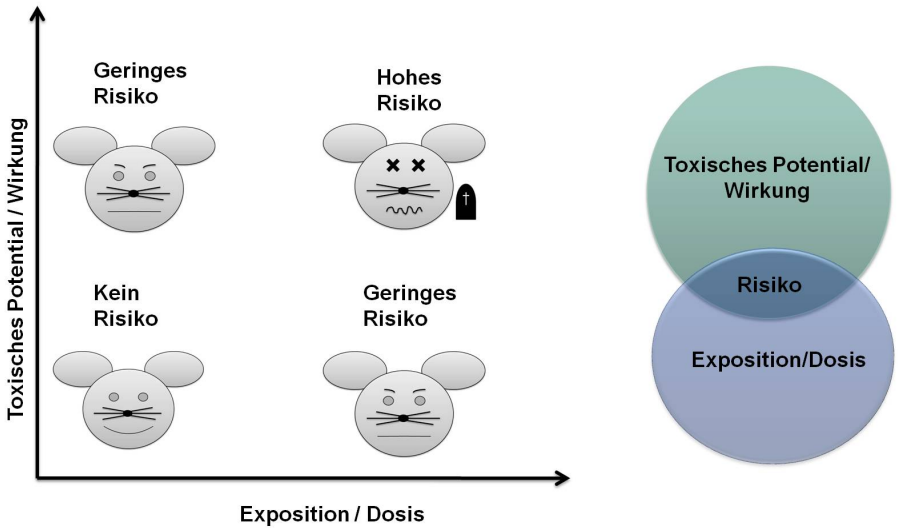


Abbildung 4: Wie bereits von Paracelsus formuliert wurde, ergibt sich das von einem Material ausgehende Risiko aus einer Funktion seines toxischen Potentials und der Wahrscheinlichkeit einer Exposition bzw. der exponierten Dosis. Die für ein sinnvolles Risikomanagement notwendige Risikobewertung erfordert daher die Bestimmung aussagekräftiger Dosis - Wirkungs - Beziehungen. Im Fall von Nanomaterialien ist dabei neben der Massendosis insbesondere die Oberflächendosis zu berücksichtigen. Nicht berücksichtigt wird dagegen der aus einer Exposition zu erwartende Schaden. Dieser bildet erst beim Risikomanagement, wie im Fall der Kernenergie, eine weitere relevante Größe.

einer brauchbaren Dosis - Wirkungs - Beziehung für nanopartikuläre Stoffe daher sowohl eine Angabe der insgesamt verabreichten Dosis z.B. in Form einer Massendosis, als auch die Bestimmung partikelspezifischer Dosisgrößen, wie etwa die Anzahl- oder Oberflächendosis. Die Dosimetrie nanopartikulärer Stoffe ist dabei keineswegs trivial und hängt vom verwendeten Verfahren zur Beurteilung der toxischen Wirkung ab. Während *in vivo* Verfahren z.B. radioaktiv markierte Partikel verwenden, oder invasiv die deponierten Mengen bestimmen, werden für *in vitro* Untersuchungen oft fluoreszierende Partikel zur Quantifizierung der Dosis am Ort der Wirkung eingesetzt. Oftmals wird aber auch nur die applizierte Dosis bestimmt und daraus die tatsächlich deponierte Dosis nach bestem Wissen und Gewissen abgeschätzt.

2.2 Zellmodellsysteme für *in vitro* Versuche

Es gibt eine Vielzahl an Zellmodellsystemen für *in vitro* Expositionsversuche wie z.B. Primärzellen [Seagrave et al., 2007], isolierte Zellkulturlinien oder Kokulturen [Paur et al., 2011]. Als Primärzellen bezeichnet man die für einen Versuch einem lebenden Organsimus, z.B. durch eine Biopsie, direkt entnommenen Zellen. Der Nachteil primärer Zellen ist eine mitunter schlechte Reproduzierbarkeit der Experimente. So können die Zellen bereits vor der Entnahme variablen Bela-

stungen ausgesetzt sein und somit die Ergebnisse beeinflussen. Häufig werden *in vitro* Versuche daher mit kultivierten Zelllinien durchgeführt. Im Fall der Inhalationstoxikologie kommen dafür die verschiedenen Zelltypen der Atemwege wie unter anderem die Bronchial- oder Alveolarepithelzellen, Alveolarmakrophagen oder auch die Blutgefäße auskleidenden Endothelzellen in Frage. Verschiedene Arbeiten belegen allerdings, dass die zelluläre Antwort stark von der Interaktion verschiedener Zelltypen untereinander abhängt [Alfaro-Moreno et al., 2008], [Müller et al., 2010]. Eine weitere Möglichkeit ist daher die Verwendung von Kokulturen, also einer aus mehreren Zelltypen bestehenden Zellkultur. Diese stellen ein etwas realistischeres Zellmodell dar und können neben der toxischen Bewertung auch zur Untersuchung des Transports von Nanopartikeln aus den Alveolen in die Blutbahn eingesetzt werden [Paur et al., 2011]. Alle in einem lebenden Organismus stattfindenden Interaktionen verschiedener Zelltypen untereinander, aber auch mit Nanopartikeln, können jedoch durch kein existierendes Zellmodellsystem vollständig beschrieben werden. Sie sind daher individuell für die jeweilige Untersuchung auszuwählen. In dieser Arbeit wird speziell die humane Typ 2 Lungenepithelzelllinie A549 als zelluläres Modellsystem eingesetzt. Diese wurde 1972 dem Karzinom eines 58 jährigen Mannes entnommen. Die Bezeichnung Typ 2 kennzeichnet dabei die Fähigkeit der Zellen an der Grenzschicht zur Luft eine dünne Schicht oberflächenaktiver Stoffe (Surfactant) auszubilden. Ungefähr 16% aller alveolaren Zellen in der menschlichen Lungen sind Typ 2 Alveolarzellen und bedecken grob 7% der gesamten alveolaren Oberfläche [Paur et al., 2011]. Die A549 Zelllinie stellt ein akzeptiertes Modell für nanotoxikologische Studien dar, wenngleich deren Herkunft aus einem Adenokarzinom berücksichtigt werden muss.

2.3 Submerse Exposition

Ein weit verbreitetes *in vitro* Verfahren ist die submerse Exposition von Zellen. Dabei werden Zellen mit einer Lösung oder Suspension des vermeintlich toxischen Stoffes behandelt (Abbildung 5). Im Fall gelöster Stoffe ist ein Vergleich der toxischen Wirkung unterschiedlicher Materialien bei bekannter Expositionsdauer und angebotener Dosis (z.B. Konzentration) für eine Risikobewertung ausreichend. Für partikuläre Stoffe kann eine solch vereinfachende Betrachtung nicht angewendet werden. In diesem Fall wird die Dosis am Ort der Wirkung durch die deponierte Partikeldosis beschrieben. Diese hängt sowohl von der Größe, Struktur und Dichte der Partikel, als auch von der Expositionsdauer ab. Obwohl prinzipiell eine theoretische Betrachtung der in submersexperimenten deponierten Dosis möglich ist [Teeguarden et al., 2007], erschweren die komplexen Wechselwirkungen der Partikel mit dem verwendeten Lösungsmittel eine akkurate Dosisbestimmung. So führen die hohen Ionenkonzentrationen in physiologischen Lösungen, wie in Abschnitt 3.1.3 erläutert wird, zur unkontrollierten Agglomeratbildung.

Weiterhin ist bei löslichen Partikeln die Abnahme der Partikelgröße und Freisetzung entsprechender Ionen zu berücksichtigen. Abgesehen von der somit äußerst komplexen Dosisbestimmung wird die Wirkung der Partikel stark von den in der Suspension enthaltenen Proteinen beeinflusst. Panas et al. [2011] zeigten z.B. dass die toxische Wirkung von amorphen SiO_2 Nanopartikeln auf A549 Zellen deutlich durch die Anwesenheit von fötalem Kälberserum in der Suspension geschwächt wird (Tabelle 1). In realen biologischen Systemen variieren pH-Wert, Ionenkon-

	NOAEL in Medium + FCS [µg / cm²]		NOAEL in Medium - FCS [µg / cm²]	
Metabolische Aktivität	62.5	62.5	3.1	15.6
LDH Freisetzung	31.3	62.5	6,2	3.1

Tabelle 1: Die von A. Panas bestimmten niedrigsten Testkonzentrationen ohne beobachteten Einfluss auf die Membranintegrität und metabolische Aktivität von A549 Lungenepithelzellen bei der Exposition mit amorphen SiO_2 Nanopartikeln. Das Resultat hängt stark von der Anwesenheit des fötalen Kälberserums (FCS) in der Suspension ab. Die angegebenen Werte entsprechen der verabreichten (nicht deponierten) Dosis und wurden der Dissertation von A. Panas entnommen [Panas, 2011]

zentration und die Anwesenheit verschiedener Proteine mit dem Aufenthaltsort des Partikels, so dass eine Nachahmung realistischer Expositionsbedingungen mit dem Submersverfahren nahezu unmöglich ist. So deponieren inhalierte Partikel z.B. in einer serumfreien Umgebung auf einer mit surfactant überzogenen Zellschicht, welche bei einer submersen Exposition nicht vorhanden ist. Abgesehen von der schwierigen Dosimetrie und dem für inhalierte Partikel unrealistischen Expositionsszenario zeichnet sich das Submersverfahren allerdings durch kurze Versuchsdauern sowie eine relativ einfache und kostengünstige Handhabung aus und findet daher trotz der genannten Nachteile sehr häufig Anwendung in nanotoxikologischen Studien.

2.4 Exposition an der Luft - Flüssigkeits - Grenzschicht

Eine Alternative zur Beurteilung der toxischen Wirkung inhalierter Partikel ist die Exposition von Lungenzellen an der Luft-Flüssigkeits Grenzschicht (ALI). Bei diesem Verfahren erfolgt eine Exposition der Zellen mit Gasen oder luftgetragenen Partikeln. Die Zellen werden dabei nur von einer Seite durch ein Nährmedium über eine poröse Membran versorgt, während die andere Zellseite direkt dem Aerosol ausgesetzt ist (Abbildung 5). ALI Systeme imitieren somit *in vivo* Expositionen der Atemwege wesentlich realistischer als submerse Experimente. Die Exposition an der Luft - Flüssigkeits - Grenzschicht ist allerdings um ein vielfaches aufwendiger als submerse Experimente. Insbesondere die Erzeugung und Charakterisierung geeigneter Aerosole mit hohen Partikelkonzentrationen sowie

der Aufbau und die Charakterisierung der verhältnismäßig komplexen ALI Systeme und der damit verbundene hohe Zeitaufwand können nur schwer in biologischen Laboren mit dem einfach handzuhabenden Submersverfahren konkurrieren. Aufgrund der in Abschnitt 2.3 genannten Grenzen submerser Verfahren finden ALI Systeme dennoch zunehmend Anwendung. Bereits in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden frühe Versionen dieses Verfahrens vorgestellt [Paur et al., 2011]. Die meisten derzeit beschriebenen ALI Systeme sind individuelle Aufbauten [GAGNÉ et al., 1998], [Tippe et al., 2002], [Bitterle et al., 2006], [Stevens et al., 2008], [Savi et al., 2008], [de Bruijne et al., 2009], [Lenz et al., 2009]. Aber auch kommerzielle Expositionsmodule der Firmen Cultex und VitroCell werden zunehmend in verschiedenen Systemen eingesetzt [Aufderheide, 2000], [Seagrave et al., 2007], [Paur et al., 2008]. Die ALI Systeme unterscheiden sich dabei im wesentlichen nur durch den Depositionsmechanismus der Partikel, worauf in Abschnitt 3.2 näher eingegangen wird. Abgesehen von der realitätsnäheren Exposition zeichnet sich das ALI Verfahren durch eine wesentlich bessere Kontrolle über die applizierten Aerosole und Dosen aus. Im Gegensatz zum Submersverfahren können Wechselwirkungen der Partikel mit ihrer Umgebung vor der Deposition weitgehend vernachlässigt oder mit gängigen Methoden der Aerosolmesstechnik kontrolliert werden. So lassen sich etwa die Partikelgröße und Konzentration während der Exposition kontrollieren und beeinflussen. Auf diese Weise ist nicht nur eine bessere Kontrolle der Partikeleigenschaften, sondern auch der deponierten Partikeldosis möglich, wenngleich deren Bestimmung eine gute und teils aufwendige Charakterisierung des eingesetzten ALI Systems erfordern.

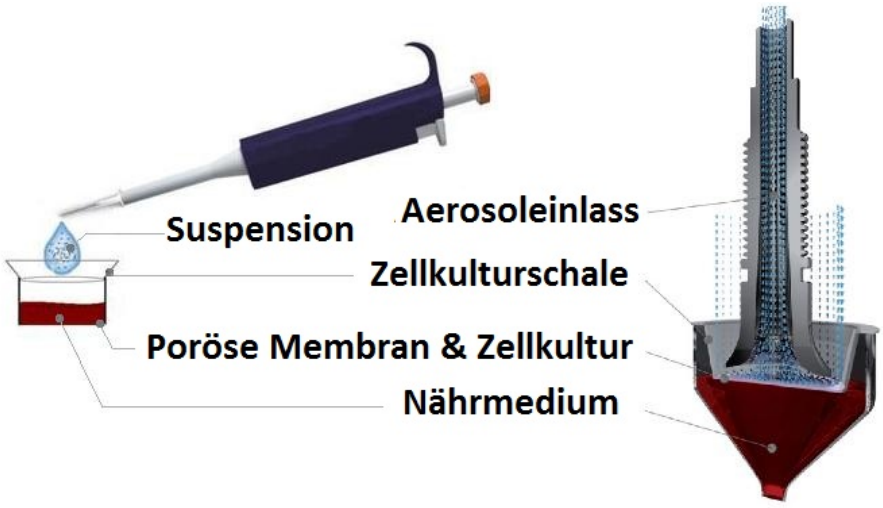


Abbildung 5: Schematische Darstellung von in vitro Verfahren zur Zellexpostion unter submersen Bedingungen (links) und an der Luft Flüssigkeits Grenzschicht (rechts, [Vitrocell, 2011])

.

2.5 Biologische Endpunkte

Als Endpunkt werden die in der Biologie und Medizin nach einem Ereignis beobachteten Wirkungen bezeichnet. Wie bereits am Beispiel der epidemiologischen Studien erwähnt wurde, kann es sich dabei z.B. um die Anzahl an stationär aufgenommenen Patienten, Herzinfarkten oder auch Todesfällen nach einer erhöhten Partikelbelastung handeln. Die Wahl welcher Endpunkt betrachtet wird ist dabei abhängig von der zu erwartenden Reaktion. Wie bereits in Abschnitt 2 beschrieben wurde, gehen Partikelexpositionen unter anderem mit lokalen Entzündungsreaktionen (Inflammation) einher. Ein Indikator dafür ist z.B. eine erhöhte Menge an neutrophilen Granulozyten in der Lunge, welche daher z.B. von Oberdörster et al. [2005] bei in vivo Experimenten als Endpunkt untersucht wurde. In dieser Arbeit werden im wesentlichen Indikatoren für eine zytotoxische, aber auch inflammatorische Wirkung der Nanopartikel auf das Zellmodellsystem betrachtet. Indikatoren für eine zytotoxische Wirkung sind unter anderem die Membranintegrität und Vitalität der Zellen. Als Maß für die Membranintegrität kann ein LDH Test eingesetzt werden. Dabei wird die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) aus exponierten Zellen analysiert. Dieses Enzym ist normalerweise nicht in der Lage die Zellmembran zu passieren. Sterben die Zellen jedoch, steigt deren Membranpermeabilität und das im Cytosol enthaltene LDH kann in das Nährmedium freigesetzt und dort nachgewiesen werden. Als Maß für die Vitalität kann der AlamarBlue Test verwendet werden. Die Umwandlung des darin enthaltenen Farbstoffs Resazurin in das fluoreszierende Produkt Resofurin in lebenden Zellen ermöglicht eine Bewertung der mitochondrialen Aktivität der Zellen. Indikator für eine proinflammatorische Wirkung der Partikel ist z.B. die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Zytokinen) wie z.B. der Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und die Interleukine (IL-6, IL-8, IL-1β). Diese sind unter anderem für die Regulation der Immunreaktion verantwortlich. So wird IL-8 von Epithelzellen freigesetzt zur Rekrutierung der oben genannten neutrophilen Granulozyten an den Entzündungsort. Eine weitere zentrale Funktion im Entzündungsgeschehen besitzt die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und kann daher als Endpunkt für proinflammatorische Prozesse untersucht werden. Dessen Synthese kann unter anderem durch verschiedene Entzündungsmediatoren gefördert werden [Raz et al., 1988], [Seibert et al., 1994]. Die COX-2 ist ein Enzym das an der Synthese von Prostaglandinen und Thromboxanen, welche Entzündungen verstärken oder hemmen können, beteiligt ist. An der Regulation der Synthese von Zytokinen und der COX-2 sind verschiedene Signalwege beteiligt, wobei mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen der Fokus nur auf der Beteiligung der Stress-aktivierten Kinase p38 lag. Diese reguliert unter anderem die Translation der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF-α und die Stabilität der mRNA von COX-2 [Beyaert et al., 1996], [Li et al., 2002], [Gaestel, 2006], [Mbonye and Song].

Neben der inflammatorischen Antwort können Partikel wie z.B. kristallines Quarz, Dieselrußpartikel und TiO2 Partikel auch oxidativen Stress auslösen [Nel et al., 2006]. Ein wichtiges Enzym ist dabei die Hämoxygenase-1 (HO-1), die unter anderem durch Prostaglandine, aber z.B. auch durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hochreguliert wird [Otterbein and Choi, 2000]. Dieses Enzym wirkt anti-oxidativ sowie anti-inflammatorisch und schützt somit Zellen vor oxidativem Stress [Morse et al., 2003]. Es gibt eine Vielzahl weiterer relevanter Endpunkte, die sowohl in vivo, als auch in vitro, betrachtet werden können und für eine toxische Bewertung der Nanopartikel relevant sind. Die Auswahl der Endpunkte in dieser Arbeit erfolgte aufgrund der in Submersexperimenten gemachten Beobachtungen [Panas et al., 2011]. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um die freigesetzte Menge an LDH, IL-8, COX-2 und HO-1, sowie die Aktivierung der Kinase p38. Da der Schwerpunkt der Arbeit allerdings nicht in der Auswertung und Interpretation der biologischen Ergebnisse liegt, soll an dieser Stelle nicht näher auf die Grundlagen und Bedeutung dieser Endpunkte eingegangen werden. Eine tiefgründigere Beschreibung der eingesetzten Verfahren zum Nachweis der genannten Enzyme, sowie der daraus resultierenden Ergebnisse erfolgt in der Dissertation von A. Panas [Panas, 2011]. In dieser Arbeit werden diese Ergebnisse der von A. Panas durchgeführten Experimente nur zur Vervollständigung der durchgeführten Expositionsversuche vorgestellt.

3 Methodische Grundlagen

Die Erzeugung, Charakterisierung und Deposition luftgetragener Nanopartikel auf Lungenzellen zur Beurteilung der toxischen Wirkung erfordert grundlegende Kenntnisse aus den Bereichen der Partikelsynthese und Aerosolphysik. Dieser Abschnitt gibt einen Überblick über den aktuellen Kenntnisstand, sowie die notwendigen Grundlagen und Methoden zum Verständnis der Arbeit.

3.1 Nanopartikel

Eine einheitliche Definition des Begriffs Nanopartikel existiert derzeit nicht. In der Regel werden damit aber Partikel bezeichnet, die in allen 3 äußeren Dimensionen nanoskalig sind. Unter nanoskalig werden dabei üblicherweise Größen zwischen 1 nm und 100 nm verstanden. Es gibt eine Vielzahl an Verfahren zur Synthese von Nanopartikeln. Eine Möglichkeit ist die Zerkleinerung großer Festkörper z.B. durch Mahlen. Eine bessere Kontrolle über die Partikelgröße, -größenverteilung und -morphologie hat man jedoch in „Bottom Up“ Prozessen. Die Partikel wachsen dabei durch Nukleation einzelner Atome und Moleküle oder Koagulation und Koaleszenz kleinerer Cluster oder Partikel. Die Syntheseprozesse können sowohl in flüssiger Umgebung, als auch in der Gasphase stattfinden. Unter den nasschemischen Verfahren finden insbesondere Sol-Gel Prozesse Anwendung zur Synthese keramischer Partikel. Der wohl bekannteste Vertreter der Sol-Gel Prozesse ist die Stöber Synthese zur Herstellung monodisperser SiO_2 Partikel [Stöber and Fink, 1968]. Die Vorteile der nasschemischen Partikelsynthese sind eine höhere Reinheit und Homogenität der Produkte, sowie die niedrigeren Prozesstemperaturen [Blum, 2004]. Für die Synthese großer Partikelmengen sind nasschemische Verfahren jedoch häufig ungeeignet. Die großtechnische Partikelsynthese erfolgt daher meistens in der Gasphase. Bei diesen Prozessen entstehen keine zu reinigenden Abwässer und die Anwendung oberflächenaktiver Substanzen ist nicht erforderlich [Wegner et al., 2004]. Des Weiteren ist eine kontinuierliche Partikelsynthese im Vergleich zu den Flüssigphasenprozessen einfacher zu realisieren. Das Prinzip der Gasphasensynthese ist die Erzeugung einer übersättigten Atmosphäre des Produktmaterials. Das Produktmaterial wird dabei chemisch oder physikalisch aus dem sogenannten Precursor (Ausgangsmaterial) erzeugt. Innerhalb der übersättigten Atmosphäre bilden sich durch homogene Nukleation erste Partikel, die im weiteren Verlauf bei Überschreiten des Kelvindurchmessers je nach Synthesebedingungen durch Kondensation, chemische Reaktionen an der Oberfläche oder Koagulations- und Koaleszenzvorgänge weiter wachsen. Zu den Gasphasenprozessen gehören unter anderem die Flammen- und Plasmasynthese, Heißwandreaktoren, Inertgaskondensationsverfahren und Freistrahlsysteme. Eine genauere Beschreibung dieser Verfahren wird von Wegner et al. [2004] gegeben. In dieser Arbeit werden insbesondere Partikel aus einer Flammen- und Mikrowellen-

plasmasynthese (MWP) eingesetzt. Dabei wird die Energie einer Wasserstoffflamme [Nalcaci et al., 2011] bzw. eines Mikrowellenplasmas [Baumann et al., 2005] zur Umsetzung des Precursors und Bildung von Partikeln eingesetzt. Die beiden Verfahren unterscheiden sich im Wesentlichen in der Temperatur innerhalb des Reaktors. Diese ist mit weniger als 200°C im Mikrowellenplasma deutlich geringer als bei der Flammensynthese. Die Temperatur nimmt dabei unter anderem Einfluss auf das Partikelwachstum und die Koaleszenz koagulierender Partikel. Unter Koaleszenz versteht man das Versintern zwischen Partikeln. Dieser Vorgang beeinflusst entscheidend die Partikelmorphologie. Ist die Koaleszenzzeit größer als die Koagulationsrate der Partikel in der Flamme bzw. des Plasmas, so bilden sich verstärkt Aggregate nicht sphärischer Struktur. Derartige Partikel sind abzugrenzen von den oben definierten Nanopartikeln. Solche „nanostrukturierten Materialien“ sind in ihrer physikalischen Größe oder Form nicht begrenzt, besitzen aber eine innere, nanoskalige Struktur und treten in der Regel als Verbundsystem von Nanoobjekten auf [Catenhusen et al., 2008]. Aggregate, aber auch Agglomerate sind typische Vertreter nanostrukturierter Materialien. Die Bezeichnungen Agglomerat und Aggregat führen dabei häufig zu Verwirrungen und Missverständnissen aufgrund vollkommen unterschiedlicher Definitionen die in der Literatur gängig sind [Nichols et al., 2002]. In dieser Arbeit werden die Begriffe, angelehnt an die Definitionen von Gerstner et al. [Gerstner, 1966], wie folgt verwendet.

Agglomerate

„*Ein Agglomerat ist die schwache Verbindung von Primärpartikeln, Aggregaten oder einer Mischung beider z.B. über Ecken und Kanten. Die Gesamtoberfläche ist identisch mit der Summe aller Oberflächen der individuellen Partikel*“

Aggregate

„*Ein Aggregat besteht aus Primärpartikeln verbunden über ihre Oberflächen. Die Oberfläche eines solchen Aggregats ist kleiner als die Summe aller Oberflächen der Primärpartikel.*“

Die Struktur und Größe der Agglomerate ist neben der Primärpartikelgröße entscheidend für Wechselwirkungen wie z.B. Aufnahme- und Translokationsmechanismen in Zellen und biologischen Systemen [Skebo et al., 2007]. Aufgrund des häufigen Auftretens synthetischer Nanopartikel in Form von Aggregaten und Agglomeraten ist daher auch eine Charakterisierung ihrer Wechselwirkungen mit biologischen Systemen für eine Risikobewertung erforderlich. Des Weiteren ist der Aggregat- und Agglomeratzustand der Partikel wichtig bei der Resuspendierung der Partikel zur Durchführung und Auswertung eines ALI Experiments. Im

Folgenden sollen daher die wesentlichen Grundlagen der Partikelwechselwirkungen in flüssiger und gasförmiger Umgebung erläutert werden.

3.1.1 Kinetik der Agglomeratbildung

Im Gegensatz zu Aggregaten sind Agglomerate nicht durch kovalente Bindungen bzw. Sinterbrücken verbunden, sondern werden durch die zwischen den Partikeln wirkenden, attraktiven Van der Waals Kräfte zusammengehalten. Diese sind verhältnismäßig schwach und hängen vom Suspensions- und Partikelmaterial, sowie der Größe und Struktur der das Agglomerat bildenden Primärpartikel ab. Das zwischen 2 sphärischen Partikeln wirkende Van der Waals Potential $\Phi_{VdW}(r)$ wurde erstmals von Hamaker 1937 beschrieben [Hamaker, 1937] und lässt sich für gleich große Partikel darstellen als [Prasher et al., 2006]

$$\Phi_{VdW}(r) = \frac{-A}{6}\left[\frac{2R_p^2}{r(r+4R_p)} + \frac{2R_p^2}{(r+2R_p)^2} + ln\left(\frac{r(r+4R_p)}{(r+2R_p)^2}\right)\right] \tag{1}$$

A, die Hamakerkonstante, ist eine materialspezifische Konstante, R_p der Radius des Partikels und r der Abstand zwischen den Partikeloberflächen. Demnach nehmen die zwischen den Partikeln wirkenden anziehenden Kräfte ungefähr antiproportional zu dem Quadrat des Abstands voneinander zu. Erst Kräfte noch kürzerer Reichweite, wie die Bornsche Abstoßungskraft, verhindern eine völlige Durchdringung der Partikel, weshalb die ursprüngliche Oberfläche der Primärpartikel erhalten bleibt. Innerhalb eines Aerosols wird die Geschwindigkeit der Agglomeratbildung von der Stoßrate der Partikel bestimmt. Diese kann als unabhängig von der Van der Waals Kraft aufgrund deren kurzer Reichweite angesehen werden und ist für ein monodisperses Aerosol proportional zum Quadrat der Partikelkonzentration n [Fuchs, 1964]. Unter der Annahme, dass jeder Stoß eine Agglomeratbildung zur Folge hat, ergibt sich für den Agglomerationsprozess somit eine Ratengleichung zweiter Ordnung

$$\frac{dn}{dt} = -Kn^2 \tag{2}$$

Im Fall sehr kleiner Partikel wird die Stoßrate im Wesentlichen durch die Brownsche Bewegung bestimmt. Für diesen perikinetischen Fall bestimmte Smoluchowski 1917 als erster Gleichung 2 mit

$$K = 8\pi R_p D = \frac{4kT}{3\eta} \tag{3}$$

als Koagulationskonstante [Smoluchowski, 1917], wobei k der Boltzmannkonstante, T der Temperatur, D der Diffusionskonstante und η der Viskosität der Suspensionsflüssigkeit entsprechen.

Befinden sich die Partikel nicht im Aerosol, sondern werden wie in Gasphasensynthesen üblich auf Filtern oder in Kühlfallen gesammelt, kommen sie zwangsläufig in Kontakt und bilden Agglomerate. Als Folge besitzen Nanopartikel in nicht suspendierter Form die makroskopischen Eigenschaften eines Pulvers.

Wie in der Gasphase können auch in flüssigen Suspensionen die attraktiven Van der Waals Wechselwirkungen eine Agglomeration der Partikel bewirken. Neben den Van der Waals Kräften wirken in flüssiger Suspension allerdings zusätzlich Hydrationskräfte, sterische Kräfte sowie eine elektrochemische Doppelschicht. Insbesondere die letzten beiden können eine repulsive Komponente verursachen. Als Folge der repulsiven Komponenten führt nicht jeder Stoß zwischen den Partikeln zu einer Agglomeratbildung und die in Gleichung 3 angegebene Koagulationskonstante nimmt ab.

$$K = \frac{4kT}{3\eta Z} \tag{4}$$

Der Korrekturfaktor Z wird als Stabilitätsfaktor bezeichnet und entspricht dem Verhältnis der perikinetischen Koagulationskonstante und der Koagulationskonstante unter Berücksichtigung der repulsiven Wechselwirkung und kann nach Gleichung 5 aus dem Wechselwirkungspotential zweier Partikel berechnet werden [Prasher et al., 2006], [Hanus et al., 2001].

$$Z = 2R_p \int_0^\infty B(r) \frac{e^{\left(\frac{V_{ww}}{k_B T}\right)}}{(r+2R_p)^2} dr \tag{5}$$

Hierbei ist B(r) eine Korrektur für die im Wechselwirkungspotential V_{ww} nicht berücksichtigte Hydrationsenergie [Honig et al., 1971] welche für große Partikelabstände vernachlässigt werden kann.

3.1.2 Verfahren zur Deagglomeration

Um den Einfluss der Agglomeratgröße genauer zu untersuchen, ist es häufig notwendig agglomerierte Partikel in einen definierten Agglomerationszustand zu überführen. Es gibt wenige Verfahren bei denen Partikel in der Gasphase deagglomeriert werden. Einige Gruppen nutzen Scherkräfte, die durch Turbulenzen in einer Düse auftreten, um schwache Partikelbindungen aufzubrechen [Stahlmecke et al., 2009] [Kurkela et al., 2008]. In anderen Verfahren impaktieren Partikel auf einer Oberfläche [Froeschke et al., 2003]. Die dabei frei werdende kinetische Energie führt zu einer teilweisen Fragmentierung der Partikel. Auf diese Weise konnten Seipenbusch et al. [2010] zeigen, dass eine Deagglomeration bis zur Primärpartikelgröße für Partikel mit Sinterbrücken unter realistischen Energieeinträgen unmöglich ist. Agglomerate hingegen konnten fast vollständig aufgebrochen werden.

Diese Verfahren dienen in erster Linie der Untersuchung von Partikelbindungen unter nicht physiologischen Bedingungen und sind daher für Anwendungen in der Nanotoxikologie ungeeignet. Besser kontrollierbare Resultate für die Anwendung unter physiologischen Bedingungen lassen sich mit Verfahren zur Dispergierung von Nanopartikeln in Flüssigkeiten erreichen. In der Literatur werden häufig Rotor/Stator Dispergierer [Pacek et al., 2007], Kugelmühlen [Knieke et al., 2010] [Sommer et al., 2006], Hochdrucksysteme [Sauter and Schuchmann, 2007] sowie Ultraschallgeräte [Sauter et al., 2008] [Pohl et al., 2004] verwendet. Am Beispiel von TiO_2 zeigten Sato et al. [2008], dass sowohl Mahlverfahren als auch Ultraschallverfahren ähnliche Ergebnisse liefern, wobei höhere Konzentrationen mit einem Ultraschallgerät bearbeitet werden können. Eine völlige Deagglomeration der kommerziellen Nanopartikelpulver in seine Primärpartikel wurde jedoch mit keinem der genannten Verfahren berichtet. Ursache ist einerseits der Anteil an Aggregaten in diesen Produkten. Des Weiteren wird durch die Kinetik von Deagglomeration und Agglomeration eine praktische Grenze bestimmt. Nach einer anfänglichen, schnellen Verkleinerung großer Agglomerate nimmt die Deagglomerationsrate ab [Mandzy et al., 2005]. Dem entgegen wirkt die Reagglomeration, so dass eine effektive Deagglomeration auch bei weitergehender Ultraschallbehandlung verhindert wird. Über eine Stabilisierung der suspendierten Partikel ist es möglich die Reagglomerationsrate zu minimieren und somit das Ergebnis zu optimieren.

3.1.3 Methoden zur Stabilisierung flüssiger Suspensionen

Aus Gleichung 2 und 4 zeigt sich, dass mit zunehmender Stabilitätskonstante die Agglomerationsrate abnimmt. Obwohl sich eine dauerhafte Stabilisierung nur für $Z \rightarrow \infty$ erreichen lässt, kann der Potentialverlauf V_{ww} über geeignete Stabilisierungsmaßnahmen so beeinflusst werden, dass die Agglomerationsrate vernachlässigbar klein wird. Man unterscheidet dabei zwischen sterischer und elektrostatischer Stabilisierung.

Sterische Stabilisierung

Unter sterischer Stabilisierung versteht man die gezielte Physisorption oder Chemisorption von Liganden bzw. Polymeren an der Partikeloberfläche. Die Kettenenden können dabei je nach Dispersionsmedium hydrophiler oder lipophiler Natur sein. Nähern sich zwei Partikel beginnen die Polymere zu überlappen, wodurch die adsorbierten Molekülschichten komprimiert werden und eine Abnahme der Entropie bewirken. Als Folge steigt die Gibbsche freie Energie welche die repulsive Wirkung begründet. Zusätzlich zur Abnahme der Entropie kann die Wechselwirkung der Moleküle mit dem Medium die repulsive Wirkung verstärken. So ist z.B. die Überlappung im Falle lipophiler Kettenenden mit einer Dehydratisie-

rung und so mit einer Zunahme der Enthalpie sowie Freien Energie verbunden. Das repulsive Potential bei einer sterischen Stabilisierung ist nahezu null bei größerer Entfernung der Partikel und beinahe unendlich sobald eine Überlappung der Polymere stattfindet. Sie ist daher sehr effektiv zur Stabilisierung nanokolloidaler Systeme, hat jedoch verschiedene Nachteile. Der Adsorptionsprozess der stabilisierenden Moleküle auf der Partikeloberfläche ist verhältnismäßig langsam. Während eines Deagglomerationsprozesses können Partikel daher wieder koagulieren bevor der Stabilisierungsprozess abgeschlossen ist. Des Weiteren ist die Identifizierung geeigneter Moleküle zur Stabilisierung einer Partikelsorte relativ aufwendig. Nicht zu letzt kann aber auch davon ausgegangen werden, dass sich eine derartige Stabilisierung auf die Wechselwirkung mit biologischen Systemen auswirkt. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit im Wesentlichen mit elektrostatisch stabilisierten Nanokolloiden gearbeitet.

Elektrostatische Stabilisierung

Bei einer elektrostatischen Stabilisierung macht man sich die Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht an der Partikeloberfläche zu nutze. Die Ausbildung einer derartigen Schicht lässt sich am Beispiel von Metalloxidoberflächen veranschaulichen. Adsorbierendes Wasser dissoziiert an der Oberfläche und bildet Hydroxylgruppen. Die Oberflächenladung kann schliesslich über einen Protonenaustausch an den Hydroxylgruppen entstehen [Larson and Attard, 2000].

$$MeO^- \rightleftharpoons MeOH \rightleftharpoons MeOH_2^+$$

Über den pH Wert der Lösung lässt sich die Polarität und die Stärke des Potentials beeinflussen. Als Folge der Oberflächenladung wird das Partikel von entgegengesetzt geladenen Ionen umgeben welche die innere und äußere Helmholtzschicht bilden [Grahame, 1947]. Im weiteren Verlauf wird die Ionenkonzentration durch das Gleichgewicht zwischen thermischer und elektrostatischer Energie bestimmt. Innerhalb dieser diffusiven Schicht befinden sich frei bewegliche Ionen beider Polaritäten deren Konzentration vom Abstand zur Partikeloberfläche abhängt und das Potential an der Partikeloberfläche weiter abschirmen. Die exakte Bestimmung des Konzentration- und Potentialverlaufs ist sehr komplex und erfordert die Lösung der Poisson Gleichung. Häufig wird dazu, wie im Fall des Gouy-Chapmann Modells [Gouy, 1910], [Chapman, 1913], die Poisson-Bolzmann Gleichung als Näherung angesetzt. Eine vereinfachte Darstellung des Potentials aufgrund der Überlagerung der Doppelschichten zweier identischer Partikel ist durch Gleichung 6 gegeben und gilt für kleine Partikelradien r_p sowie große Debyelängen κ [Prasher et al., 2006], so dass $r_p/\kappa < 5$.

$$\Phi_{el}(r) = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r R_p \psi^2 e^{(-\frac{r}{\kappa})} \tag{6}$$

Mit der Debyelänge κ

$$\kappa = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_b T}{2 N_A e^2 I}} \tag{7}$$

Für ψ wird statt des Oberflächenpotentials die messtechnisch zugängliche Größe des Zetapotentials angenommen, welche dem elektrischen Potential an der Scherebene eines umströmten Partikels entspricht. Nach der Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) Theorie [B. Derjaguin, 1941], [E.J.W. Verwey, 1948] ergibt sich das insgesamt zwischen zwei Partikeln wirkende Potential V_{ww} aus der Summe aller repulsiven und attraktiven Wechselwirkungen, insofern diese nicht untereinander wechselwirken. Vernachlässigt man in erster Näherung die sehr kurzreichweitigen und schwachen Potentiale, ergibt sich damit die Summe aus Gleichung 1 und Gleichung 6. Der daraus resultierende Potentialverlauf enthält ein lokales Minimum sowie ein darauf folgendes Maximum (Abbildung 6B). Zu

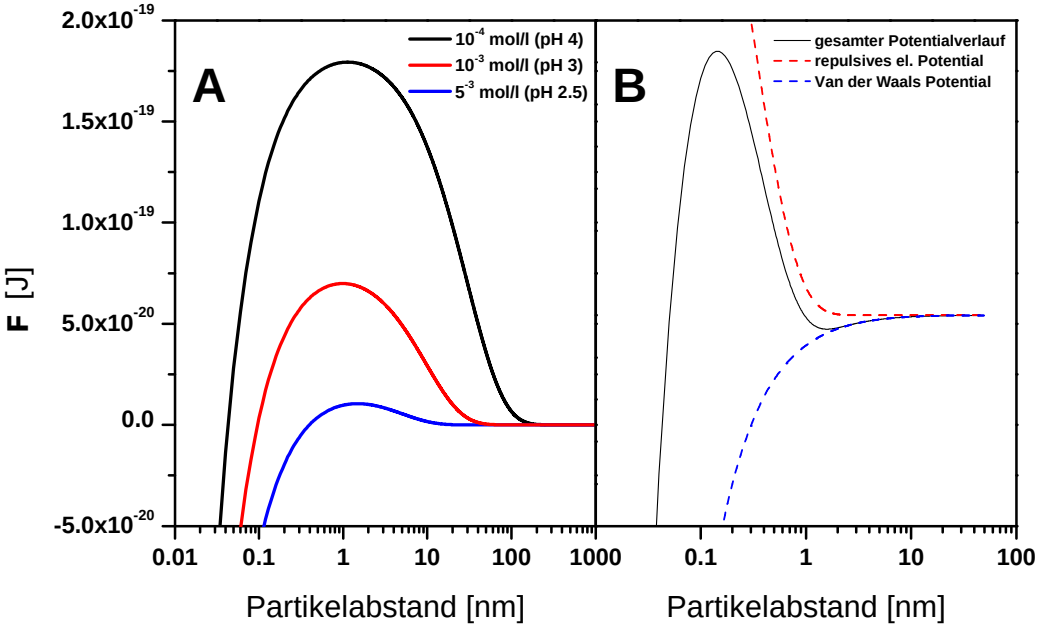


Abbildung 6: (**A**) Wechselwirkungspotential von zwei sphärischen, 50nm großen SiO_2 Partikeln in Wasser mit einer Hamakerkonstante von 2 ZJ [Ackler, 1996] und den von Kerner and Leiner [1975] für Aerosil200 bestimmten Zeta Potentialen bei verschiedenen Konzentrationen einer einwertigen starken Säure. (**B**) Schematischer Verlauf der sich aus Gleichung 1 und 6 ergebenden Potentiale, sowie das aus deren Summe resultierende gesamte Wechselwirkungspotential

kleineren Partikelabständen fällt das Potential wieder bis es ein globales Minimum als Folge der Bornschen Abstoßung erreicht. Im Falle einer stabilen Suspension befinden sich die Partikel in einem metastabilen Zustand im Bereich des lokalen Minimums. Besitzen die Partikel genügend Energie um die Potentialdifferenz

zwischen dem lokalen Minimum und dem Maximum zu überwinden, können sie in das globale Minimum rutschen, aus dem sie ohne Energieeintrag nicht mehr heraus kommen und eine Deagglomeration erforderlich machen. Aufgrund der Abhängigkeit der Debyelänge von der Ionenkonzentration I wird deutlich, dass der Betrag dieser Potentialdifferenz von der Konzentration und der Wertigkeit der in der Lösung enthaltenen Ionen abhängt (Abbildung 6A). Neben dem Zeta Potential ist daher die Ionenkonzentration einer Lösung entscheidend für die Stabilität der Suspension.

3.2 Deposition luftgetragener Nanopartikel auf Lungenzellen

Die Deposition luftgetragener Nanopartikel auf Lungenzellen zur *in vitro* Bewertung der toxischen Wirkung erfordert die Erzeugung dafür geeigneter Aerosole und die Bestimmung der deponierten Dosis. Die Dosis hängt dabei von dem jeweiligen ALI System und den darin genutzten Depositionsmechanismen ab. Wie in Abschnitt 2.4 schon erwähnt wurde, gibt es bereits eine Vielzahl an ALI Systemen die zur Exposition von Lungenzellen mit luftgetragenen Partikeln eingesetzt werden. Häufig werden dabei rein auf Diffusion und Sedimentation basierende Systeme angewendet [Tippe et al., 2002], [Aufderheide, 2000], [Bitterle et al., 2006], [Rothen-Rutishauser et al., 2009]. Diese weisen in der Regel jedoch verhältnismäßig kleine Depositionseffizienzen im Bereich weniger Prozent auf [Paur et al., 2011], [Desantes et al., 2006]. Ausgenommen davon ist z.B. das von Lenz et al. [2009] präsentierte Verfahren zur Deposition von Nanopartikel enthaltenden Tröpfchen. Aufgrund der schlechten Kontrolle über die Partikeleigenschaften während der Exposition eignet sich ein solches System hauptsächlich zur Bewertung von Verfahren in der medizinischen Diagnostik oder Inhalationstherapie, in welchen Tröpfchen ähnlicher Größe angewendet werden [Paur et al., 2011]. Um dennoch höhere Depositionseffizienzen mit typischen Nanopartikel- und Agglomeratgrößen zu erreichen, werden zunehmend elektrostatisch arbeitende Expositionskammern eingesetzt [Savi et al., 2008], [de Bruijne et al., 2009], [Stevens et al., 2008]. Die erreichbare Depositionseffizienz solcher Systeme beträgt bis zu 100% für unipolar geladene Partikel[Stevens et al., 2008], und wird nur durch die geringe Ladungswahrscheinlichkeit kleiner Aerosolpartikel [Fuchs, 1963], [Wiedensohler, 1988], sowie die zunehmende Reibungskraft großer Aerosolpartikel begrenzt. Die obere Grenze der deponierten Dosis wird allerdings von der Partikelkonzentration im Aerosol vorgegeben. Neben der Depositionseffizienz ist daher die Aerosolerzeugung ausschlaggebend für die maximal möglichen Depositionsraten. Obwohl es eine Vielzahl an Verfahren zur Erzeugung luftgetragener Nanopartikel gibt [Biskos et al., 2008], ist der Großteil für ALI Experimente ungeeignet. Das Aerosol darf weder toxische Nebenprodukte, noch Residuen anderer Partikel enthalten, welche die biologische Wirkung beeinflussen können. Häufig ist daher eine direkte Exposition mit gasphasensynthetisierten Nanopartikeln aufgrund der in der Regel unphysiologischen Synthesebedingungen nicht möglich. Eine Ausnahme bilden z.B. das von Ostraat et al. [2008] vorgeschlagene Verfahren zur SiO_2 Synthese für die Untersuchung von Arbeitsplatzbelastungen und die von Bitterle et al. [2006] verwendeten Funkengeneratoren [Schwyn et al., 1988] zur Untersuchung der Wirkung von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln auf A549 Zellen. Bei der Verwendung von Funkengeneratoren zur Synthese von Metalloxidpartikeln unter einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre ist jedoch die mögliche Bildung von Stickoxiden oder Ozon und deren Auswirkungen auf die Zellen zu berück-

sichtigen. Der Großteil aller Gasphasensyntheseprozesse, wie die Flammen- und Mikrowellenplasmasynthese, findet jedoch bei niedrigen Drücken statt oder ist mit der Bildung toxischer Nebenprodukte verbunden, die eine direkte Exposition unmöglich und Resuspendierung erforderlich machen. Diese kann sowohl mit Trocken- als auch Flüssigdispergierern erfolgen. Da bei Trockendispergierern, wie in Abschnitt 3.1.2 angesprochen, eine direkte Beeinflussung des Agglomerationsgrades nur schwer realisierbar ist, werden in dieser Arbeit Flüssigdispergierer bevorzugt eingesetzt. Häufig werden dafür Ultraschallvernebler, Membranvibrationsgeneratoren [Lenz et al., 2009], Zweistoffdüsen sowie Atomizer und Elektrosprays [Lenggoro et al., 2006], [Lenggoro et al., 2002] eingesetzt. Insbesondere die letzten beiden dienen in dieser Arbeit als Aerosolquellen und werden daher im Folgenden genauer beschrieben. Des Weiteren wird genauer auf mögliche Verfahren zur Dosisbestimmung der deponierten Partikelmenge bei einer Exposition an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht eingegangen.

3.2.1 Aerosolerzeugung mit dem Elektrospray und Atomizer

Allgemein sind unter dem Begriff Atomizer alle Geräte, welche Flüssigkeiten durch einen Energieeintrag in luftgetragene Tröpfchen verwandeln, zu verstehen [Hinds, 1999]. Im üblichen Sprachgebrauch entspricht der Atomizer jedoch dem auf Druckluft basierenden Verfahren (pneumatischer Atomizer). Luft wird dazu durch eine Düse beschleunigt, an deren Ende sich eine schmale Schlauchöffnung befindet. Dieser Schlauch ist verbunden mit einem Reservoir der zu versprühenden Flüssigkeit. Aufgrund des Bernoulli Effekts wird die Flüssigkeit durch den Schlauch in den Luftstrom gezogen, wo sie beschleunigt und in Tröpfchen aufgebrochen wird. Das daraus resultierende Aerosol ist polydispers und enthält sehr große Tröpfchen. Aufgrund der Geometrie der meisten Atomizer impaktieren die größeren Tropfen im weiteren Strömingsverlauf und werden in das Reservoir zurückgeführt. Typische Atomizer erreichen so Anzahlkonzentrationen von 10^6 bis 10^7 Tröpfchen/cm^3 bei mittleren Massendurchmessern (MMD) zwischen 1 und 10 μm und geometrischen Standardabweichungen von 1.5 bis 2.5 [Hinds, 1999]. Durch Verdampfen der Tröpfchen ergibt sich schliesslich die Größenverteilung des versprühten Nanokolloids. Die Größe der Partikel wird dabei durch die Anzahl der im Tröpfchen enthaltenen Partikel bestimmt. Sind die Partikel gleichmäßig in der Suspension verteilt, entspricht die Wahrscheinlichkeit, N Partikel in einem zufälligen Tropfen einer definierten Größe zu finden, einer Poissonverteilung [Li et al., 2011] und ist gegeben durch

$$P(N, \lambda) = \frac{e^{-\lambda}\lambda^N}{N!}, \tag{8}$$

wobei λ der mittleren im Tröpfchen enthaltenen Partikelzahl entspricht. Am Beispiel lognormalverteilter Tröpfchen mit geometrischen Standardabweichungen

zwischen 1.8 und 2.2 ergibt sich nach Hinds [1999] die größtmögliche Konzentration an nur ein Partikel enthaltenden Tröpfchen bei einer mittleren Partikelzahl pro Tropfen von 0.7. Gleichzeitig enthalten in diesem Fall 64 - 71% aller Tröpfchen mehr als ein Monomer und verursachen so eine polydisperse Größenverteilung. Senkt man die mittlere Partikelzahl auf 0.001 pro Tropfen erhöht sich der Anteil an Monomeren auf 84 - 97%. Dafür enthalten mehr als 98% aller Tröpfchen bei dieser Partikelkonzentration gar keine Partikel. Mit typischen Atomizern lassen sich daher entweder hohe Konzentrationen verbunden mit großen Agglomeratanteilen, oder aber kleine Konzentrationen mit einer hohen Anzahl an Primärpartikeln erzeugen. Ein weiterer Nachteil des Atomizers ist die bei längeren Betriebszeiten zunehmende Partikelkonzentration aufgrund des verdampfenden Lösungsmittels und die daraus resultierende Zunahme der Aerosolkonzentration und Agglomeratgrößen bei längeren Betriebsdauern. Trotz dieser Tatsache findet der Atomizer aufgrund der einfachen Handhabung und der ansonsten stabilen Betriebsbedingungen häufig Anwendung für nanotoxikologische Experimente.

Im Gegensatz zum Atomizer wird bei einem Elektrospray eine Spannung an die Suspension angelegt und über eine Druckdifferenz durch eine Kapillare befördert. Das zwischen der Flüssigkeit am Ende der Kapillare und einer geerdeten Gegenelektrode entstehende elektrische Feld induziert frei bewegliche Ladungsträger einer Polarität auf der Tropfenoberfläche an der Kapillarspitze. Überschreiten die auf die Ladungsträger wirkenden elektrostatischen Kräfte eine gewisse Grenze verursachen sie eine Instabilität und den Ausstoß hochgeladener Tröpfchen aus der Flüssigkeit an der Kapillarspitze. Dieser Ausstoß kann unter verschiedenen Moden erfolgen [Cloupeau and Prunet-Foch, 1989], [Grace and Marijnissen, 1994] und hängt von der angelegten Spannung sowie verwendeten Suspension ab. Der Cone-Jet oder auch Taylor-Cone Modus ist gekennzeichnet durch den Ausstoß eines einzigen Jets aus einem kegelförmigen Meniskus [Taylor, 1964]. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und schmalen Größenverteilung der emittierten Tröpfchen wird am häufigsten dieser Modus zur Aerosolerzeugung angewendet. Er ist jedoch nur in einem festen Stabilitätsbereich, dessen Grenzen durch die Flussrate und Leitfähigkeit vorgegeben sind, stabil [Chen et al., 1995]. Der mittlere Durchmesser d der Tröpfchen wird von der Flussrate Q und Leitfähigkeit K der Lösung bestimmt und ist gegeben durch

$$d = G(\epsilon_r) \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon_r Q}{K} \right)^{\frac{1}{3}}, \tag{9}$$

mit $G(\epsilon_r)$ als dimensionslose Funktion der Permittivität [Gañan-Calvo, 1994], [de Juan and de la Mora, 1997], [Ku et al., 2001]. Chen and Pui [1997] ermittelten $G(\epsilon_r)$ als

$$G(\epsilon_r) = -10.87\epsilon_r^{-6/5} + 4.08\epsilon_r^{-1/3}, \tag{10}$$

für nicht allzu große Viskositäten und gut leitende Flüssigkeiten. Aufgrund der monodispersen Tröpfchenverteilung ist das Elektrospray im Gegensatz zum Atomizer in der Lage Monomere in hoher Konzentration bei gleichzeitig geringer Agglomeratzahl zu erzeugen. Insofern nur Monomere in der Suspension enthalten sind ergibt sich aus Gleichung 8 die maximale Anzahl an Monomeren für eine mittlere Partikelzahl von 1. Dabei enthalten 74% aller Tropfen zu gleichen Teilen kein bzw. genau 1 Partikel. Lediglich die restlichen 26% der Tropfen enthalten 2 oder mehr Monomere. Das Elektrospray eignet sich daher besonders für die Erzeugung hoher Monomerkonzentrationen bei gleichzeitig schmaler Größenverteilung und geringem Agglomerationsgrad.

3.2.2 Aerosolcharakterisierung und Dosisbestimmung

Wie auch beim Submersverfahren wird die toxische Wirkung durch die Dosis am Ort der Wirkung bestimmt. Am nächsten kommt dem die deponierte Partikeldosis. Sie ist daher notwendig, um eine sinnvolle Dosis-Wirkungs Beziehung aufzustellen. Neben der im Aerosol enthaltenen Partikelkonzentration ist die Depositionseffizienz entscheidend für die deponierte Dosis. Sie beschreibt welcher Anteil der im Aerosol enthaltenen Partikel tatsächlich die Zelloberfläche erreicht und hängt stark vom zugrundeliegenden Depositionsmechansimus ab.

Aerosolcharakterisierung

Ein großer Vorteil des ALI Verfahrens ist die Vielzahl an Messtechniken, die zur in situ Charakterisierung der applizierten Partikel zur Verfügung stehen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den von Knutson und Whitby beschriebenen Mobilitätsanalysatoren (DMA) [Knutson and Whitby, 1975] zu. Mit ihnen ist es möglich Partikel einer bestimmten elektrischen Mobilität zu selektieren. In Kombination mit Kondensationskeimzählern (CPC) kann die Partikelgrößenverteilung eines Aerosols bei zeitlichen Auflösungen von wenigen Minuten gemessen werden [Wang and Flagan, 1990]. Im Fall sphärischer Partikel ergibt sich der Durchmesser d_{me} bei bekannter Ladungszahl i und der Mobilität Z_p aus

$$d_{me} = \frac{ieC_C}{3\pi\eta Z_p}. \tag{11}$$

Für nicht sphärische Partikel beschreibt d_{me} den Durchmesser einer Kugel gleicher Mobilität und dient als Maß für die Größe der Partikel. Die Klassierung mit dieser auch als SMPS genannten Methode deckt einen weiten Größenbereich von einigen wenigen bis hin zu mehreren hundert Nanometern ab. Für größere Partikel werden häufiger optische Aerosolpartikelklassierer (APS) verwendet. Dabei ergibt

sich der aerodynamische Durchmesser aus der Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel.

$$d_{ae} = \sqrt{\frac{18\eta v_s}{g\rho_0}} \tag{12}$$

Für bekannte Partikeldichten lässt sich daraus leicht der stokesäquivalente Durchmesser bestimmen. Von Interesse für die Dosisbestimmung sind jedoch häufiger die Massen- und Oberflächenäquivalenten Durchmesser. Im Fall nicht sphärischer Partikel ist die Korrelation zwischen verschiedenen Äquivalenzradien über dynamische Formfaktoren möglich. Diese sind in der Regel nicht bekannt und deren Bestimmung erfordert weitere experimentelle Methoden wie die Verwendung eines Aerosolpartikelmassenanalysators (APM) [Ehara et al., 1996],[Lall et al., 2008]. Einen Sonderfall stellen fraktalähnlich strukturierte Agglomerate monodisperser sphärischer Partikel dar. Da sie auch im Fall der dichtesten Kugelpackung das gesamte Raumvolumen nur zu 74% ausfüllen ist die effektive Dichte eines Agglomerats kleiner gegenüber der des Primärpartikels. Tatsächlich können die Packungsdichten noch wesentlich kleiner sein. Eine Korrelation zwischen geometrischem, mobilitätsäquivalentem d_{me} und Massenäquivalentem d_m Durchmesser kann über die fraktale Dimension d_f der Partikel erfolgen [Naumann, 2003].

$$d_m = \sqrt[3]{\frac{d_0^3}{f}\left(\frac{d_{me}}{d_0 h_{KR}}\right)^{d_f}}. \tag{13}$$

Dabei sind d_0 der Primärpartikeldurchmesser und f der Volumenfüllfaktor. h_{KR} entspricht dem Verhältnis aus dem mobilitätsäquivalenten und geometrischen Durchmesser. Dieser ergibt sich über die Kirkwood-Riseman Theorie nach Naumann et al. [Naumann, 2003] näherungsweise aus

$$h_{KR} = -0.06483 d_f^2 + 0.6353 d_f - 0.4898. \tag{14}$$

Bei bekannter Masse lässt sich über die Primärpartikelzahl ebenfalls eine Beziehung zwischen der fraktalen Dimension und dem oberflächenäquivalenten Durchmesser d_S aufstellen. Für fraktale Dimensionen unterhalb von 2 lässt sich diese vereinfacht darstellen als

$$d_S = \sqrt{d_0^2\left(\frac{d_m}{d_0}\right)^{3\gamma}}, \tag{15}$$

wobei der Skalenexponent γ nach Naumann [2003] als 0.86 angenommen werden kann. Der dargestellte Formalismus setzt eine annähernd winkelunabhängige kugelsymmetrische Monomerdichteverteilung voraus und ist daher nur für fraktale Dimensionen die deutlich größer als 1 sind gültig. Weiterhin ergibt sich bei einer fraktalen Dimension von 3 für h_{KR} mit der Kirkwood-Riseman Theorie ein Wert von 0.83 anstatt 1 [Naumann, 2003]. Aufgrund dieser verhältnismäßig großen Abweichung ist Gleichung 13 auch für große fraktale Dimensionen nicht geeignet.

Dosisbestimmung

Oft werden fluoreszierende Partikel angewendet und die Menge an deponiertem Material mit einem konfokalen Lasermikroskop oder Fluoreszenzspektrometer bestimmt [Savi et al., 2008], [de Bruijne et al., 2009], [Stevens et al., 2008] und mit dem Partikelangebot verglichen. Es lässt sich so eine Depositionseffizienz für Partikel unterschiedlicher Größe bestimmen, welche sich aus der Beladungsdichte n(r) und dem gesamten Partikelangebot N_{ges} einer bestimmten Partikelgröße ergibt.

$$W = \frac{2\pi \int_0^R n(r) r dr}{N_{ges}} \tag{16}$$

Die fluoreszierenden Partikel unterscheiden sich jedoch in der Regel in ihren Eigenschaften von den untersuchten Materialien und die Depositionseffizienzen können insbesondere für Partikel anderer Größe von denen der fluoreszierenden Materialien abweichen. Im Fall nicht fluoreszierender Partikel kann stattdessen wie von Bitterle et al. [2006] ein Elektronenmikroskop zur Bestimmung der deponierten Menge verwendet werden. Der Vergleich deponierter Partikelgrößen mit den im Aerosol gemessenen mobilitätsäquivalenten oder aerodynamischen Durchmessern ist dabei jedoch schwierig und in der Regel nur für sphärische Partikel möglich. Eine Möglichkeit zur Minimierung der notwendigen Experimente ist die Verwendung experimentell validierter Simulationen wie von Desantes et al. [2006] für die von Tippe et al. [2002] präsentierte Expositionskammer. Sie ermöglichen auch die Erweiterung auf nicht sphärische und fraktalähnlich strukturierte Partikel mit dem zuvor beschriebenen Formalismus. Bei bekannter Depositionseffizienz ergibt sich schliesslich die deponierte Anzahldosis N_{dep} aus

$$N_{dep} = \int_0^T Q \int_0^\infty W(d_p) \cdot f(d_p, t)\, dd_p\, dt \tag{17}$$

mit d_p als beliebigen messbaren Äquivalenzdurchmesser, T als Expositionsdauer, Q als Aerosolflussrate und f(d_p,t) als die Anzahlgrößenverteilung der Aerosolpartikel. Bewährte toxikologische Endpunkte werden jedoch in der Regel, wie im Fall der letalen Dosis oder Konzentration, auf die Masse des deponierten Materials bezogen. Ein experimenteller Zugang der deponierten Massendosis mit Quarzmikrowaagen wurde sowohl von Lenz et al. [2009], als auch Paur et al. [2011], beschrieben. Allerdings ist deren Anwendung aufgrund des Detektionslimits der Quarzmikrowaagen und durch den Einfluss von Temperatur und Feuchte auf die Resonanzfrequenz des Quarzkristalls auf große Massendosen und somit große Partikel, hohe Materialdichten oder sehr hohe Anzahlkonzentrationen beschränkt (Abbildung 7). Des Weiteren wurde bereits in Abschnitt 2.1 erwähnt, dass für nanopartikuläre Stoffe die biologische Wirkung eines Materials durch die untereinander korrelierenden Parameter Partikelanzahl, Größe und Oberfläche beeinflusst wird. Da in der Regel nicht alle, möglicherweise dosimetrisch relevanten

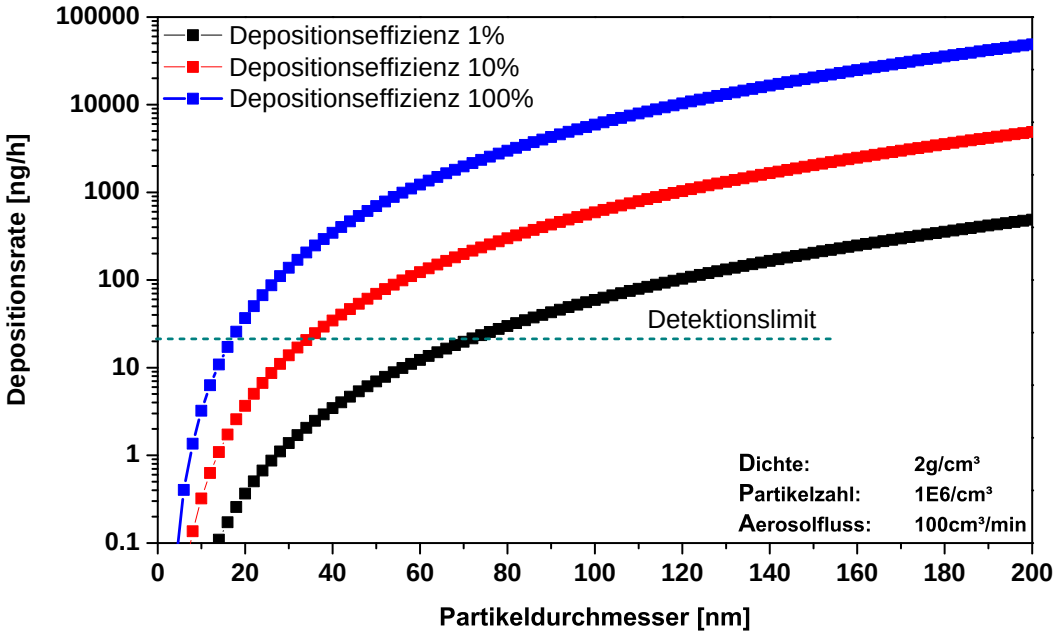


Abbildung 7: Die Depositionsraten sphärischer Partikel der Dichte 2 g/cm^3 bei einem Partikelangebot von 10^8 Partikeln/min für verschiedene Depositionseffizienzen. Der Vergleich mit dem Detektionslimit eines 5 MHz Quarzkristalls durch Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen innerhalb einer Stunde verdeutlicht die geringe Nachweisempfindlichkeit für Nanopartikel.

Größen, experimentell erfasst werden können, ist es notwendig eine Beziehung der verschiedenen Dosisgrößen untereinander zu formulieren. Mit Gleichung 17 und den entsprechenden Äquivalenzdurchmessern ergibt sich die Oberflächendosis S_{dep} und Massendosis M_{dep} aus

$$S_{dep} = \pi \int_0^T Q \int_0^\infty d_s^2 \cdot W(d_s) \cdot f(d_s, t)\, dd_s\, dt \tag{18}$$

und

$$M_{dep} = \frac{\pi\rho}{6} \int_0^T Q \int_0^\infty d_m^3 \cdot W(d_m) \cdot f(d_m, t)\, dd_m\, dt \tag{19}$$

mit d_s als Oberflächen- und d_m als Massenäquivalenzdurchmesser. Deren Bestimmung ist in der Regel nur für spezielle Partikelgeometrien möglich. Von einer Übereinstimmung aller Äquivalenzdurchmesser kann nur im Sonderfall sphärischer Partikel ausgegangen werden. Oft sind die Partikelformen komplizierter. Neben Kugeln, Würfeln, stumpfen Pyramiden, Stäben, hexagonal geformten Partikeln und fraktalähnlich strukturieren Agglomeraten treten sehr häufig unregelmäßige Formen auf, die eine experimentelle Bestimmung der Äquivalenzradien erfordern.
Eine weitere relevante Dosisgröße ist die Anzahl deponierter Primärpartikel N_{pdep}.

Sie kann über Gleichung 17 nur bestimmt werden, wenn im Aerosol keine Agglomerate enthalten sind. Enthält das Aerosol fraktalähnliche Agglomerate bestehend aus Monomeren mit annähernd monodisperser Größenverteilung, folgt die Primärpartikelzahl der deponierten Agglomerate einem Potenzgesetz ihrer Projektionsfläche.

$$N = k_a \left(\frac{d_p^2}{d_0^2} \right)^{\alpha} \tag{20}$$

d_p entspricht dabei dem projektionsflächenäquivalenten Durchmesser des Agglomerats und d_0 dem mittleren Primärpartikeldurchmesser. N_{pdep} kann so durch Messung der Projektionsflächen der deponierten Partikel experimentell bestimmt werden. Die Konstanten k_a und α hängen dabei von der Agglomeratstruktur und dem Überlapp der Primärpartikel ab. Für Agglomerate ohne Überlapp mit einer fraktalen Dimension von 1.78 geben Brasil et al. [1999] Werte von 1.08 und 1.1 für α und k_a an. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Primärpartikeldosis bei bekannter Massendosis ist die Verwendung der Primärpartikelgrößenverteilung p(d). p(d) entspricht in der Regel einer Lognormalverteilung

$$p(d_p) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma d_p} e^{\frac{-ln^2\left(\frac{d_p}{d_0}\right)}{2\sigma^2}}, \tag{21}$$

wobei σ dem Logarithmus der geometrischen Standardabweichung und d_0 im Fall schmaler Verteilungen annähernd dem modalen Durchmesser entspricht. Unter der Annahme, dass sich die Primärpartikelverteilung innerhalb der deponierten Agglomerate nicht von der im ursprünglichen Material unterscheidet, ergibt sich damit die deponierte Massendosis sphärischer Primärpartikel aus

$$M_{dep} = N_{pdep} \sqrt{\frac{\pi}{2}} \frac{\rho}{6\sigma} \int_0^{\infty} d_p^2 e^{\frac{-ln^2\left(\frac{d_p}{d_0}\right)}{2\sigma^2}} dd_p = \frac{1}{6} N_{pdep} \pi \rho d_0^3 e^{\frac{9\sigma^2}{2}}. \tag{22}$$

Durch Gleichsetzen von Gleichung 19 und 22 kann somit die deponierte Primärpartikeldosis bestimmt werden. Auf gleiche Weise kann für nicht aggregierte und porenfreie Primärpartikel die Oberflächendosis mit

$$S_{dep} = N_{pdep} \int_0^{\infty} s(d_p) p(d_p) dd_p = N_{pdep} \pi d_0^2 e^{2\sigma^2} \tag{23}$$

berechnet werden, wobei $s(d_p)$ der Oberfläche eines Primärpartikels mit dem Durchmesser d_p entspricht.

Welches Verfahren letztendlich zur Dosisbestimmung angewendet wird, ist abhängig von den zur Verfügung stehenden Informationen über die Partikel sowie der Agglomeratanteile und Strukturen.

3.3 Simulation der Depositionseffizienz

Die Depositionseffizienz ist in der Regel die am schlechtesten charakterisierte Größe eines ALI Systems. Sie ist jedoch häufig notwendig zur on-line Bestimmung der deponierten Dosis aus der applizierten Partikelmenge. Wie bereits in Abschnitt 3.2.2 erläutert wurde, ist eine experimentelle Bestimmung der Depositionseffizienz sehr aufwendig und nur mit speziellen Partikeln möglich. Zur Minimierung der notwendigen Experimente und Erweiterung auf Partikel mit experimentell nur schwer zugänglichen Depositionseffizienzen bieten sich daher computergestützte fluiddynamische Simulationen (CFD) zur Bestimmung der Depositionseffizienz an. Derartige Simulationen wurden bereits von Desantes et al. [2006] für das von Tippe et al. [2002] vorgestellte ALI System durchgeführt. Ein umfassendes Modell zur Beschreibung der Depositionseffizienz kommerziell erhältlicher Expositionskammern existiert derzeit jedoch nicht. Zur Beschreibung der Depositionseffizienz und des Partikelverhaltens ist eine Simulation des Strömungsfeldes innerhalb der Expositionskammern erforderlich. Mit fluiddynamischen Simulationen können für festgelegte Randbedingungen strömungsrelevante Variablen, wie z.B. Strömungsgeschwindigkeit, Temperatur und Druck, innerhalb einer vorgegebenen Geometrie abgeschätzt werden. Dafür werden numerische Verfahren zum Lösen der Navier-Stokes Gleichungen eingesetzt. Diese bilden die Grundlage der Strömungssimulation und beinhalten im Wesentlichen den Massen-, Energie- und Impulserhaltungssatz, sowie thermodynamische Zustandsgleichungen (z.B. Zustandsgleichung idealer Gase oder Redlich-Kwong Gleichung). Da analytische Lösungen nur für spezielle Geometrien und Randbedingungen existieren, wird in der Regel das finite Volumenverfahren zum Lösen dieses Systems aus nichtlinearen partiellen Differentialgleichungen angewendet. Dabei wird die vorgegebene Geometrie in kleinere, nicht überlappende, polygonal berandete Kontrollvolumenelemente bzw. Gitterzellen wie z.B. Tetraeder, Prismen oder Hexaeder, zerlegt. Anschliessend werden die Navier-Stokes Gleichungen in diskretisierter integraler Form iterativ für jedes Volumenelement gelöst [AnsysEurope, 2005]. Es existieren verschiedene kommerzielle und freie Programmpakete, mit denen auf diese Weise das Strömungsverhalten für Kontinuumssyteme beschrieben werden kann. In dieser Arbeit wird Ansys CFX zur Erzeugung der Geometrie einer kommerziellen Expositionskammer, deren Zerlegung in ein Rechengitter sowie zur Berechnung relevanter Strömungsvariablen an den Zellknoten angewendet.

Die Bestimmung der Depositionseffizienz erfordert zusätzlich die Simulation der Partikeltrajektorien. Partikel und Trägergas bilden dabei ein Mehrphasensystem, dessen Simulation sehr aufwendig ist. Für kleine Partikel und geringe Partikelkonzentrationen können allerdings Wechselwirkungen der Partikel untereinander, sowie eine Beeinflussung der Strömung des tragenden Fluids durch die Partikel, weitgehend vernachlässigt werden. In diesem Fall können die Partikeltrajektorien

getrennt von der Strömungssimulation behandelt werden. Ihr Verlauf in einem Expositionsmodul wird dabei je nach Depositionsmechanismus im Wesentlichen durch die Reibungskraft, Gewichtskraft und gegebenenfalls auch elektrostatischen Kräfte bestimmt. Andere Kräfte, wie die Corioliskraft, Druckgradientenkraft und thermophoretische Kraft, sind im Vergleich dazu sehr schwach und nehmen keinen signifikanten Einfluss auf die Partikeltrajektorien. Die Bewegungsgleichung der Partikel lässt sich daher vereinfacht mit Gleichung 24 darstellen.

$$m_p \frac{dv_p}{dt} = \frac{1}{2} \cdot \rho_f A C_D \left(v_f - v_p\right) \cdot \left|v_f - v_p\right| + V \left(\rho_p - \rho_f\right) g + F_{el} \tag{24}$$

A beschreibt die Projektions- bzw. Querschnittsfläche und V das Volumen des umströmten Partikels. C_D ist der Strömungswiderstandskoeffizient und hängt maßgeblich von der Reynoldszahl ab. Bei Relativgeschwindigkeiten mit Reynoldszahlen oberhalb von 1000 ist er konstant. Darunter lässt er sich mit der Schiller-Naumann Gleichung abschätzen [Schiller and Naumann, 1933]. Im Bereich kleiner Reynoldszahlen, also laminar umströmten Partikeln, ist er antiproportional zur Relativgeschwindigkeit zwischen Fluid und Partikel, so dass man sich dem Grenzfall stokescher Reibung annähert. Wird weiterhin angenommen, dass die Partikel ideale Kugeln sind und $\rho_f << \rho_p$ ist, so vereinfacht sich Gleichung 24 weiter auf

$$0 = \ddot{x_p} + \frac{18\eta}{d^2 \rho_p C_c} \cdot \left(\dot{x_p} - v_f\right) + g, \tag{25}$$

wobei x_p die Ortskoordinate des Partikels, η der dynamischen Viskosität des tragenden Fluids, v_f der Strömungsgeschwindigkeit und C_c dem Cunninghamkorrekturfaktor [Allen and Raabe, 1985] entsprechen. Letzterer ist insbesondere erforderlich für Partikel im freien molekularen und Übergangsbereich. Er korrigiert die Abweichung der Reibungskraft für Partikel, deren Durchmesser kleiner oder von der gleichen Größenordnung wie die mittlere freie Weglänge der Gasmoleküle ist.

Gleichung 25 entspricht für den Fall konstanter Strömungsgeschwindigkeiten einer linearen, inhomogenen Differentialgleichung, deren Lösung sich aus der Summe der homogenen Lösung x_h sowie einer partikulären Lösung x_p ergibt

$$x_h = a \cdot e^{c_1 t} + b$$

$$x_p = \frac{c_1 \cdot v_f + g_e}{c_1} \cdot t$$

$$c_1 = \frac{18\eta}{d^2 \rho_p C_c}$$

Aus den Grenzbedingungen $x(0) = x_0$ und $x'(0) = v_{p0}$ ergeben sich die Konstanten a und b

$$a = \frac{c_1 \cdot v_f + g_e}{c_1^2} - \frac{v_{p0}}{c_1},$$

$$b = x_0 - a,$$

wobei g_e das Verhältnis der Summe aller zeitunabhängigen externen Kräfte (z.B. elektrostatische- und Gewichtsraft) zur Partikelmasse umfasst.

Damit ergibt sich als Lösung

$$x(t) = a \cdot (e^{-c_1 t} - 1) + (a \cdot c_1 + v_{p0}) \cdot t + x_0 \tag{26}$$

Handelt es sich nicht um sphärische Partikel, ist in Gleichung 25 der massenäquivalente Durchmesser von dem mobilitätsäquivalenten Durchmesser zu unterscheiden. Nimmt man fraktalähnlich strukturierte Agglomerate an und setzt Gleichung 13 in Gleichung 24 ein, ergibt sich als Lösung Gleichung 26 mit der Konstanten

$$c_1 = \frac{18\eta d_{me}}{d_m^3 \rho_p C_c} = \frac{18\eta d_{me} f}{d_0^3 \left(\frac{d_{me}}{d_0 h_{KR}}\right)^{d_f} \rho_p C_c} \tag{27}$$

Mit den aus der Simulation des Trägergases erhaltenen Geschwindigkeiten v_f an den Knotenpunkten des Rechengitters kann so für jedes Volumenelement die Partikeltrajektorie nach Gleichung 26 bestimmt werden. Sind die Partikel jedoch zu klein, bzw. wird das Verhältnis aus mittlerer freier Weglänge des Gases und dem Partikeldurchmesser (Knudsen Zahl) zu groß, dann nimmt die Diffusion einen entscheidenden Einfluss auf die Partikeltrajektorien. Zur Simulation der Trajektorien unter Berücksichtigung der Diffusion ist es erforderlich die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen mit der ein Partikel in eine bestimmte Richtung von der ursprünglichen Trajektorie abweicht. Wenn $w(x_0, x, t)dx$ die Wahrscheinlichkeit angibt, dass ein Partikel, welches sich zum Zeitpunkt $t = 0$ bei x_0 befindet, nach der Zeit t innerhalb von x und $x + dx$ zu finden ist, dann muss $w(x_0, x, t)$ die Fokker-Planck-Gleichung erfüllen. Für ein isotropes Medium lässt sich diese vereinfacht darstellen als

$$\frac{\partial w}{\partial t} = -\frac{\partial (V_x w)}{\partial x} + D\frac{\partial^2 w}{\partial x^2}$$

[Fuchs, 1964]. V_x beschreibt dabei die Geschwindigkeit des Partikels entlang der X-Richtung. Wirken keine äußeren Kräfte und befindet sich das Partikel in einem stationären Fluid, so wird V_x null und die Gleichung vereinfacht sich zur Diffusionsgleichung (Zweites Ficksches Gesetz). In diesem Fall ergibt sich w aus

$$w(x_0, x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D t}} \cdot e^{-(x-x_0)^2/4Dt}. \tag{28}$$

Demnach entspricht die Wahrscheinlichkeit der Bewegung eines Partikels in den Bereich $x + dx$ in einer Dimension, ohne Einwirkung äußerer Kräfte und in einem ruhenden Fluid, einer Gaußverteilung. Die Bewegung solcher Partikel kann daher durch eine gaußsche Zufallsvariable mit der Standardabweichung $\sqrt{2Dt}$ und dem Erwartungswert x_0 simuliert werden.

Befindet sich das Partikel dagegen in einem bewegten Fluid verliert Gleichung 28 ihre Gültigkeit. Ein in diesem Fall häufig angewendetes Verfahren zur Simulation der Partikeltrajektorien ist die Beschreibung des Partikelverhaltens mit der Langevingleichung. Dabei wird die Diffusion über eine fluktuierende externe Kraft in der Bewegungsgleichung berücksichtigt. Diese oft als brownsche Kraft bezeichnete Komponente wird dabei als Zufallsprozess, der einem gaußschen weißen Rauschen entspricht, modelliert [Li and Ahmadi, 1992]. Auf diese Weiße kann unter anderem mit Fluent DPM die brownsche Bewegung von Partikeln beschrieben werden [Robinson et al., 2007]. Ansys CFX enthält dagegen kein Transportmodell, welches die Partikeldiffusion berücksichtigt. Im Fall geringer Geschwindigkeitsdifferenzen lassen sich allerdings Partikeltrajektorien diffundierender Partikel annähernd durch das Verhalten diffundierender Partikel mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit simulieren. Für konstante Strömungsgeschwindigkeiten ergibt sich w als

$$w(x_0, x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot e^{-(x-x_0-V_x t)^2/4Dt} \tag{29}$$

Die Partikeltrajektorien können damit, wie im Fall ruhender Partikel, durch eine gaußsche Zufallsvariable simuliert werden. Im Gegensatz zum ruhenden Partikel ist jedoch für den Erwartungswert $x_0 + V_x t$ anzuwenden. Aufgrund der Differenzen zwischen den Partikel- und Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb einer nicht konstanten Strömung verliert Gleichung 31 prinzipiell ihre Gültigkeit. Die geringen Relaxationszeiten von Nanopartikeln im Bereich von 10^{-8} s und die niedrigen axialen Geschwindigkeitsdifferenzen innerhalb typischer Expositionskammern rechtfertigen allerdings die Annahme einer konstanten Strömungsgeschwindigkeit während eines Simulationsschritts. In Kombination mit Gleichung 26 können daher die Trajektorien mit

$$x(t) = a \cdot (e^{-c_1 t} - 1) + (a \cdot c_1 + v_{p0}) \cdot t + 2DtG_i + x_0 \tag{30}$$

simuliert werden. G_i entspricht dabei einer gaußschen Zufallsvariable mit einer Standardabweichung von 1 und dem Erwartungswert 0.

Nach Gleichung 29 ergibt sich der mittlere quadratische Versatz eines konstant bewegten Partikels aus

$$\overline{(x - x_0)^2} = \int_{-\infty}^{\infty} (x - x_0)^2 w(x_0, x, t) dx = V_x^2 t^2 + 2Dt \tag{31}$$

und entspricht damit der Summe der Quadrate des Versatzes durch die gerichtete, konstante Bewegung des Partikels und dem brownschen Versatz [Fuchs, 1964]. Das gleiche Ergebnis ergibt sich für das quadratische Mittel aus Gleichung 30 über eine unendliche Anzahl von Partikeln bei einer konstanten Strömungsgeschwindigkeit die mit der Partikelgeschwindigkeit identisch ist.

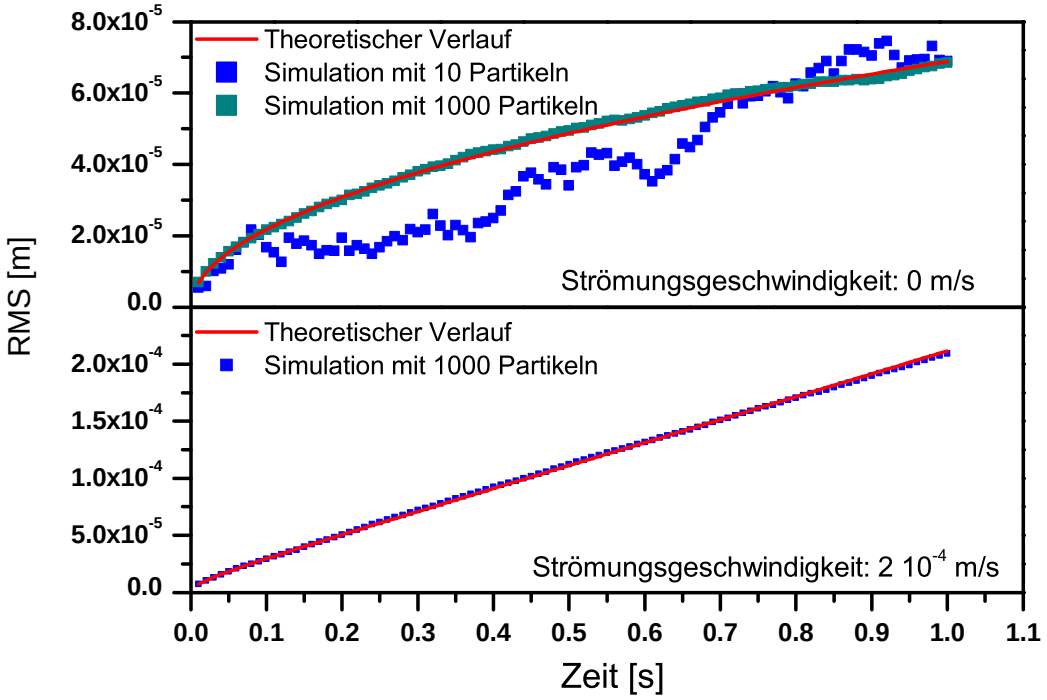


Abbildung 8: Vergleich des mittleren quadratischen Versatzes der nach Gleichung 30 simulierten Partikel mit dem aus Gleichung 31 theoretisch zu erwartenden Verlauf für 50 nm Partikel. Bereits für eine Simulation mit 1000 Partikeln erkennt man eine gute Übereinstimmung des theoretischen und simulierten Verlaufs sowohl für ein ruhendes (A), als auch ein konstant bewegendes Partikel (B).

4 Aufbau, Modellierung und Versuchsdurchführung

Zur Durchführung von Expositionsversuchen wurde eine ALI Depositionsanlage (ALIDA) aufgebaut. Die Anlage umfasst die Erzeugung und Charakterisierung der notwendigen Aerosole sowie eine Einheit zur Zellexposition unter physiologischen Bedingungen. Im folgenden Abschnitt werden der experimentelle Aufbau sowie die zu dessen Charakterisierung durchgeführten Simulationen, Experimente und Expositionsversuche beschrieben.

4.1 Aerosolerzeugung und Charakterisierung

Wie in Abschnitt 3.2 bereits erwähnt wurde, ist die Erzeugung und Charakterisierung geeigneter Aerosole ein wesentlicher Bestandteil bei der Durchführung von ALI Experimenten. Sie sind einerseits notwendig zur Durchführung der Expositionsversuche und andererseits erforderlich zur Charakterisierung der Expositionsanlage. Prinzipiell kann jede Aerosolquelle in Verbindung mit dem in den folgenden Abschnitten beschriebenem Expositionssystem betrieben werden. Um jedoch Artefakte in den toxikologischen Untersuchungen zu vermeiden, wurde versucht die Partikelsynthese von der Aerosolerzeugung zu trennen. Als Ausgangsmaterial dienten dazu verschiedene kommerzielle Partikelsuspensionen (Tabelle 2) sowie die industriell relevanteren, kommerziellen und nicht kommerziellen, gasphasensynthetisierten Partikelpulver (Tabelle 3). Aus den in Abschnitt 4.1 genannten Gründen dienten zur Resuspendierung dieser Partikel ein Elektrospray (TSI, 3480) und ein Atomizer (Topas, ATM 220) mit einem Vordruck von 1 Bar. Deren Anwendung erforderte die Überführung der jeweiligen Partikelpulver bzw. Suspensionen in eine flüssige und stabile Suspension mit geeigneten Konzentrationen und einer für das Elektrospray geeigneten Leitfähigkeit. Im Fall des Atomizers wurde dafür aufbereitetes Wasser (Barnstead, Nanopure Infinity Base Unit) mit einer Leitfähigkeit von ca. 18 MΩ/cm angewendet. Für das Elektrospray wurde dagegen eine 20 mM Ammoniumacetat- (pH 8, 0.2 S/m) und 5 mM Salpetersäurelösung (pH 2.3, 0.2 S/m) getestet. Wie in Abschnitt 5.1 gezeigt wird, erwies sich die Salpetersäurelösung aufgrund des geringeren Residualpartikelanteils als geeignetere Lösung und wurde daher zur Dispergierung der gasphasensynthetisierten Partikel angewendet. Sie wurden dazu mit einer Konzentration von 0.03 mg/ml und 1 mg/ml in 15 ml suspendiert und für 15 Minuten mit einem 200 W Ultraschallfinger (Branson, Sonifier 250) behandelt. Da die nach der Ultraschallbehandlung teilweise noch immer sehr großen Agglomerate häufig zum Verstopfen der Kapillaren führten, wurden neben den standardmäßigen Quarzglaskapillaren von TSI mit einem Innendurchmesser von 40 μm 25 cm lange Kapillaren von Polymicro Technologies mit einem Innendurchmesser von 70 μm eingesetzt.

Bezeichnung	Durchmesser[1] [nm]	Konzentration[1]		Material	Lieferant
		[#/ml]	[mg/ml]		
Ludox AS40	22[2]	2E16[2]	518	SiO_2	Grace
SiO_2 70	70	7E13	25	SiO_2	Postnova
SiO_2 100	100	4.8E13	50	SiO_2	Postnova
SiO_2 200	200	6E12	50	SiO_2	Postnova
SiO_2 1600	1580	9.7E9[3]	40	SiO_2	Postnova
PS 100	102	1.9E13[3]	10[3]	Polystyrol	Postnova
PS 2000	2000	2.6E9[3]	11[3]	Polystyrol	Postnova

Tabelle 2: Zur Charakterisierung der Expositionskammer verwendete kommerzielle Partikelsuspensionen sowie deren Eigenschaften.

[1] Herstellerangabe
[2] Errechnet für sphärische Partikel aus den Angaben zur Massenkonzenzentration und BET Oberfläche
[3] Errechnet für sphärische Partikel aus den Angaben zur Massenkonzenzentration und Partikelgröße

Um ähnliche Tröpfchengrößen zu gewähreleisten, wurde der Druckabfall über den größeren Kapillaren von ca. 25.5 kPa auf ca. 1.5 kPa reduziert. Eine radioaktive Polonium-210 Quelle (TSI, P-2021) erzeugte eine definierte bipolare Ladungsverteilung gemäß Fuchs [1963] aus den hochgeladenen Tröpfchen des Elektrosprays. Zur Charakterisierung der so erzeugten Aerosole dienten ein CPC (TSI, 3025), DMA (TSI, 3081 & 3085) und APS (TSI, 3321). DMA und CPC wurden zusammen als SMPS mit einem Verhältnis zwischen Proben- und Schleierluft von 1:10 betrieben. In Abhängigkeit der relevanten Partikelgröße wurde eine Aero-

Bezeichung	Aerosil 200	SiO_2 40	TiO_2 20	Fe_2O_3 10	SiO_2 MWP	Printex 90
Monomergröße Ø [nm]	-	40	20	9	10	14
BET [m^2/g]	200		105	177	-	300
Kristallstruktur	amorph	amorph	Anatase/Rutile	-	amorph	amorph
Material	SiO_2	SiO_2	TiO_2	Fe_2O_3	SiO_2	C
Precursor	-	TEOS	TTIP		Silan	-
Syntheseprozess	-	FS	FS	MWP	MWP	-
Hersteller	Evonik	EBI	EBI	ITC	ITC	Evonik

Tabelle 3: Verwendete Nanopartikelpulver aus der Flammen- (FS) und Mikrowellenplasmasynthese (MWP). Die BET Oberfläche für die SiO_2 40, TiO_2 20 und Fe_2O_3 Partikel wurde am Engler Bunte Institut (EBI) des Karlsruher Instituts für Technologie bestimmt. Anstatt auf Filtern erfolgte die Abscheidung der SiO_2 MWP Partikel am Institut für Technische Chemie (ITC) in der Flüssigphase.

solflussrate von 0.3 lpm oder 1.5 lpm verwendet. Auf diese Weise konnte durch den DMA ein Messbereich mit mobilitätsäquivalenten Durchmessern von minimal 2 nm und maximal 737 nm abgedeckt werden. Die Messungen mit dem APS erfolgten dagegen bei einem Probefluss von 5 lpm mit einem Messbereich aerodynamischer Durchmesser zwischen 0.5 μm und 19.8 μm. Zusätzlich zur direkten Charakterisierung der Aerosole wurden die Partikel in den Expositionskammern aus dem Aerosol heraus elektrostatisch auf Formvar beschichteten Kupfer TEM Netzen (Plano, SF162-6) deponiert und die Struktur der Partikel bzw. Agglomerate an einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, t109) analysiert. Eine weitere Charakterisierung der Nanopartikelpulver, wie z.B. der BET Oberfläche, der kristallinen Struktur und der Primärpartikelgröße, wurde am Engler Bunte Institut des Karlsruher Instituts für Technologie durchgeführt und deren Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Insofern vorhanden wurden weiterhin die Angaben der Hersteller zur Charakterisierung der Aerosole herangezogen.

4.1.1 Erzeugung stabiler Partikelsuspensionen

Die Präparation der Suspensionen ist die Grundlage zur Erzeugung geeigneter Aerosole für ALI Experimente. Wie in Abschnitt 3.2.1 erläutert wurde, ermöglicht eine aus monodispersen Partikeln bestehende, stabile Suspension die Erzeugung eines Aerosols mit definierten Agglomeratanteilen. Auf die kommerziellen Partikelsuspensionen aus Tabelle 2 trifft das weitgehend zu, so dass in deren Fall nur eine Anpassung der Leitfähigkeit und Konzentration ohne eine Destabilisierung der Suspension erforderlich war. Die Agglomerate und zum Teil möglicherweise sogar Aggregate der Nanopartikelpulver aus der Gasphasensynthese erwiesen sich dagegen als äußerst stabil und zeigten unabhängig von der verwendeten Methode zur Resuspendierung einen großen Agglomeratanteil. Zur Deagglomeration wurden daher neben der Ultraschallbehandlung verschiedene Lösungsmittel (Wasser, Ethanol, Methanol) und Lösungsvermittler (Tween80, Dipalmitoylphosphatidylcholine, SDS, DPPA) getestet, sowie eine Behandlung in konzentrierter Salpetersäure durchgeführt. Die Anwendung von Lösungsvermittlern erwies sich dabei als ungeeignet zur Verkleinerung der Agglomeratanteile und führten zu Residualanteilen im Aerosol die die eigentlichen Partikelkonzentrationen deutlich überstiegen, weshalb nicht näher auf die Resultate dieser Behandlung eingegangen wird. Auch mit der Verwendung anderer Lösungsmittel konnte kein stabiles Aerosol aus kleineren Partikeln erzeugt werden. Lediglich die Behandlung mit konzentrierter Salpetersäure zeigte einen reproduzierbaren Einfluss auf die Fe_2O_3 10 Partikel. Diese wurden dabei jeweils mit 10 mg des Nanopartikelpulvers in 100 μl 65%iger Salpetersäure (MERCK, Suprapur®) für die Dauer von 5 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Anschliessend wurde die Suspension in 250 ml Wasser verdünnt. Die TiO_2 20 und nicht flüssig abgeschiedenen SiO_2 Partikel aus der Mikrowellenplasmasynthese zeigten dagegen keine Veränderung

gegenüber den unbehandelten Suspensionen. Am Beispiel der TiO_2 20 Partikel wurden zur Charakterisierung der suspendierten Partikel nach der Ultraschallbehandlung zusätzlich DLS Messungen durchgeführt und mit den Ergebnissen der SMPS Messung verglichen. Dazu wurden 0.03 ml der Ausgangssuspension in weiteren 2 ml der 5 mM Salpetersäurelösung verdünnt. Zum Entfernen größerer Partikelagglomerate wurde eine weitere Suspension vor der DLS Messung für 6 Minuten bei einer Umdrehungszahl von 6000 rpm zentrifugiert (Hettich, EBA 20).

Flüssigabscheidung gasphasensynthetisierter Partikel

Da es weder mit Ultraschall noch mit einer chemischen Behandlung gelungen ist die Partikelagglomerate vollständig in ihre Monomere zu deagglomerieren, wurde ein alternatives Sammelverfahren zur Vermeidung der Agglomeratbildung getestet. Dafür wurde versucht SiO_2 Partikel aus der Mikrowellenplasmasynthese anstatt auf Filtern direkt in einer stabilisierenden Flüssigkeit abzuscheiden, um die aufwändige Deagglomeration der Partikel zu vermeiden. Aufgrund ihrer geringen Residualanteile und der hohen Stabilität der mit ihr verdünnten kommerziellen SiO_2 Suspensionen wurde dafür ebenfalls eine 5 mM Salpetersäurelösung verwendet. Die Synthese der SiO_2 Nanopartikel erfolgte mit dem von Baumann et al. [2005] beschriebenen Aufbau. Dazu wurde Silan als Precursor mit einer Ausgangskonzentration von 500ppm in einer 131±14 mBar Heliumatmosphäre mit einem Sauerstoffvolumenanteil von 0.5% und einem Gesamtfluss von 5 lpm durch das Mikrowellenplasma geleitet. Die dort entstehenden Partikel wurden anschliessend durch eine 3 cm hohe Flüssigkeitssäule geleitet. Um die hohen Flüssigkeitsverluste durch den niedrigen Druck auszugleichen wurde das Flüssigkeitslevel während des Versuchs regelmäßig über ein Reservoir ausgeglichen. Ein Gefrieren der Suspension während der Synthese aufgrund der verdampfenden Flüssigkeit wurde mit thermostatisiertem Wasser einer Temperatur von 12° C verhindert. Aufgrund der turbulenten Durchmischung der Suspension und damit einhergehenden Tröpfchen- bzw. Partikelverluste ist von einer zeitabhängigen Abscheiderate auszugehen. Nimmt man ausschliesslich Partikelverluste durch die Emission kleiner und schnell verdampfender Tröpfchen an, ergibt sich die Abscheiderate aus

$$\frac{dN}{dt} = QWn_A - \frac{N}{V_W}\frac{dV_T}{dt}, \tag{32}$$

wobei W die Abscheideeffizienz, n_A die Konzentration des Aerosols nach dem Mikrowellenplasma, V_W das Wasservolumen und V_T das durch die emittierten und verdampften Tröpfchen verlorengehende Suspensionsvolumen darstellt. Da sich V_T linear proportional zur Zeit verhält und V_W konstant gehalten wird,

ergibt sich mit den Randbedingungen die abgeschiedene Partikelkonzentration n_S aus

$$n_S = \frac{QWn_A}{dV_T/dt}\left(1 - e^{-\frac{1}{V_W}\frac{dV_T}{dt}t}\right) \tag{33}$$

Die Lösung mit den abgeschiedenen Partikeln wurde nach einer Stunde entnommen und mit dem Elektrospray versprüht. Zur Auswertung der Primärpartikel- und Agglomeratgröße sowie elementaren Zusammensetzung der Partikel wurden sie auf TEM Netzen gesammelt und unter einem Transmissionelektronenmikroskop sowie Rasterelektronenmikroskop analysiert.

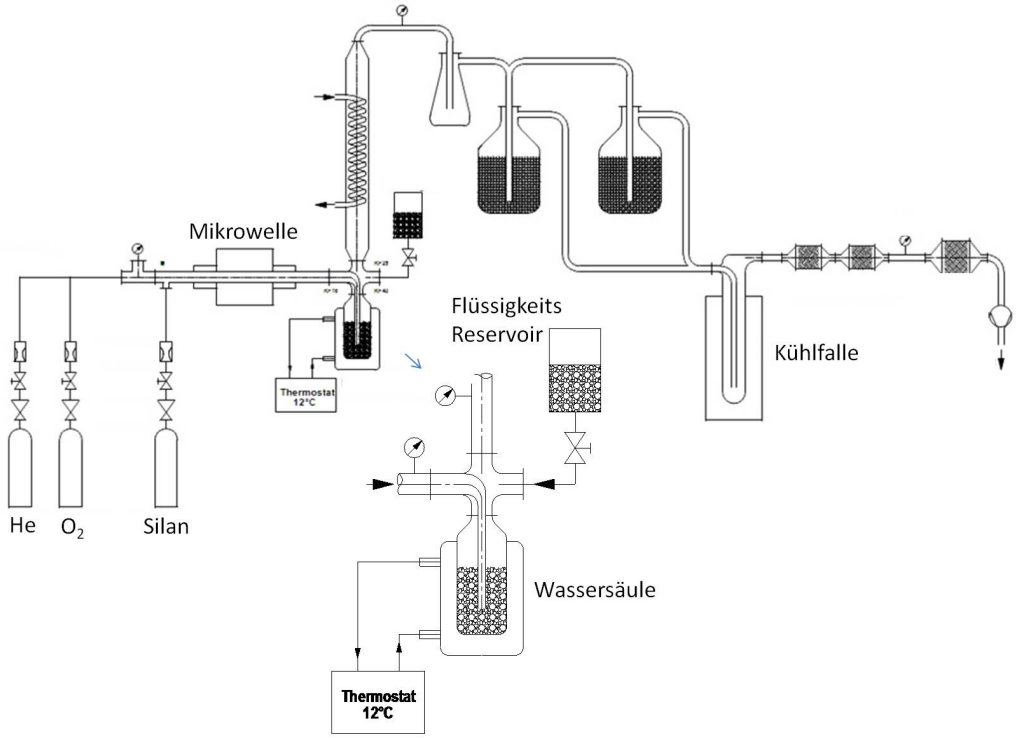


Abbildung 9: Schematischer Aufbau zur Flüssigabscheidung Mikrowellenplasmasynthetisierter Nanopartikel

4.1.2 Synthese von SiO_2 Partikeln zur direkten Exposition

Für die bisher gezeigten Verfahren zur Aerosolerzeugung konnten unabhängig von der verwendeten Partikelsuspension Konzentrationen von nicht viel mehr als 10^6 Partikeln/cm^3 in den Aerosolen erreicht werden (Abschnitt 5.1). Bereits für relativ große SiO_2 Partikel mit einem Durchmesser von 50 nm liegt die damit maximal mögliche Depositionsrate für 100% Depositionseffizienz und einem Fluss von

100 ml/min nur bei 150 $\frac{ng}{cm^2 h}$. Durch Ansätze die Depositionseffizienz zu maximieren (Abschnitt 5.5) kann dieser Wert nicht verbessert werden. Der Vergleich mit der NOEL Konzentration von mindestens 3.1 μg/cm^2 (Tabelle 1) zeigt jedoch, dass eine Zellantwort in diesem Fall jedoch nur beobachtet werden könnte, wenn die Zellen an der Luft Flüssigkeits Grenzschicht wesentlich sensitiver auf die Partikel reagieren. Um höhere Dosen zu erreichen ist die Verwendung eines höher konzentrierten Aerosols erforderlich. Als alternative Aerosolquelle ohne einen aufwendigen Deagglomerationsprozess wurden daher SiO_2 Nanopartikel mit dem von Ostraat et al. [2008] beschriebenen Verfahren synthetisiert (Abbildung 10). Dafür wurde Stickstoff bei einer Temperatur von 45° C mit Tetraethylorthosilikat (Fluka, purum 98%) gesättigt und anschliessend mit reinem Stickstoff verdünnt. Die Konzentration an Tetraethylorthosilikat und der Gesamtfluss wurden über die Teilflüsse mit zwei Durchflussreglern festgelegt. Das Gas wurde anschliessend in eine Quarzglasröhre mit einem Innendurchmesser von 4 mm durch einen Rohrofen einer Länge von 18,5 cm (Ströhlein Instruments, D-02 GTE) geleitet. Die

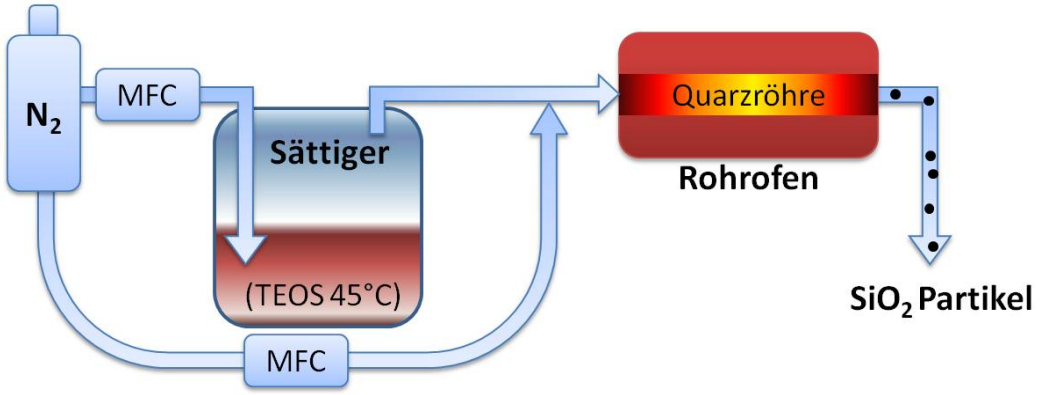


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Synthese von SiO_2 Nanopartikeln unter Atmosphärendruck. Zur Dosierung des Precursors (TEOS) wurde ein Teil des Stickstoffstroms abgezweigt, durch einen Sättiger geleitet und anschliessend in den Gesamtstrom zurückgeführt. Über 2 Flussregler (MFC) konnte der Gesamtfluss und die Precursorkonzentration eingestellt werden.

Verweilzeiten innerhalb der Röhre betrugen je nach Gesamtfluss zwischen 70 ms und 140 ms. Die dort gebildeten SiO_2 Partikel wurden zur Analyse in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt und anschliessend mit dem SMPS hinsichtlich der Anzahlgrößenverteilung charakterisiert. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Anzahlgrößenverteilung von der Precursorkonzentration wurde bei 800°C der Volumenanteil an TEOS gesättigtem Stickstoff zwischen 0.3% und 4.9% bei einem konstanten Gesamtfluss von 1100 cm^3 variiert. Unter ansonsten gleichen Bedingungen wurde die Abhängigkeit des Gesamtflusses bei einem konstanten Anteil an TEOS gesättigtem Stickstoff von 4% für Flüsse zwischen 1100 cm^3 und 1600 cm^3 untersucht. Da eine Bestimmung des Agglomeratanteils aus der Anzahlgrößenverteilung des SMPS allein nicht möglich war, wurden exemplarisch bei einem

Gesamtfluss von 1630 cm^3, einem Anteil an TEOS gesättigtem Stickstoff von 2.6% und bei 900°C synthetisierte Partikel hinsichtlich ihres Agglomeratanteils am TEM ausgewertet.

4.1.3 Charakterisierung der Agglomerat- und Residualanteile

Wie in Abschnitt 3.1.1 bereits erwähnt wurde, spielt der Agglomeratzustand der Partikel eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung mit biologischen Systemen, weshalb die verschiedenen Aerosole auf den Anteil an Agglomeraten hin untersucht wurden. Mit den stabilisierten kommerziellen Partikelsuspensionen aus Tabelle 2 konnten die Monomermode und Agglomeratmoden im SMPS Spektrum weitgehend getrennt voneinander aufgelöst werden. Zur Bestimmung der verschiedenen Partikelanteile wurden die unterschiedlichen Moden durch einen Fit mit maximal 5 Moden aus logarithmischen Normalverteilungen beschrieben. Die Primärpartikel-, Agglomerat- und Residualpartikelkonzentration wurden schliesslich durch Integration der aus den Fits erhaltenen Moden bestimmt. Der angegebene Agglomeratanteil entspricht dabei dem Verhältnis aller Agglomerate zur Gesamtpartikelzahl abzüglich der Residuen. Im Fall der gasphasensynthetisierten Partikel konnte für keines der Materialien die Primärpartikelmode in den Anzahlgrößenverteilungen mit dem SMPS aufgelöst werden. Aus diesem Grund wurden zur Beurteilung des Agglomeratzustands zusätzlich TEM Aufnahmen elektrostatisch deponierter Partikel herangezogen. Weiterhin wurde die Struktur der Agglomerate anhand von TEM Aufnahmen zur Bestimmung der angebotenenen und deponierten Massendosis charakterisiert. Für die mit dem Elektrospray erzeugten Aerosole der TiO_2 20 und SiO_2 MWP Partikel wurde dafür die fraktale Dimension durch die Auswertung von jeweils 10 Agglomeraten mit dem von Brasil et al. [1999] beschriebenen und Wentzel et al. [2003] angewendete Verfahren abgeschätzt. Für kompaktere Agglomerate wurde dagegen versucht eine fraktale Dimension über die spezifische Oberfläche und Messungen mit einem Diffusion Charger zu bestimmen. Wie in Abschnitt 5.2 genauer erläutert wird, erwies sich dieses Verfahren jedoch als ungeeignet, weshalb auf dessen Ergebnisse nicht genauer eingegangen wird.

Neben dem Agglomeratzustand der Aerosole ist die in ihnen enthaltene Residualmenge eine wichtige Größe um Artefakte in der biologischen Wirkung durch Residuen ausschliessen zu können. Die Residualpartikelanteile wurden dafür wie die Agglomeratanteile aus den gefitteten Moden der Anzahlgrößenverteilung bestimmt. Diese beinhalten dabei allerdings nur die Anteile der nicht auf den Partikeln ausgetrockneten Kontaminationen. Insbesondere für die mit dem Atomizer erzeugten Aerosole beinhalteten jedoch fast alle Tröpfchen mindestens ein Partikel, so dass keine isolierte Residualmode beobachtet werden konnte. In diesem Fall wurde als maximaler Residualanteil die Residualmenge des Nanopure Was-

sers bzw. der reinen Ammoniumacetat- und Salpetersäurelösungen angenommen. Die Stammlösungen wurden dafür ohne darin suspendierte Partikel versprüht und die daraus resultierende Residualmenge aus der mit dem SMPS bestimmten Größenverteilung bestimmt. Nicht berücksichtigt wurden dabei wiederum die von den jeweiligen Partikeln selbst verursachten Kontaminationen.

4.2 Aufbau der Expositionseinheit

Zur Konditionierung des Aerosols auf die für das Überleben der Zellen notwendigen Bedingungen wurde es durch eine von thermostatisiertem Wasser umspülte Nafionmembran mit einem Innendurchmesser von 12 mm und einer Wandstärke von 1 mm geleitet (Abbildung 11). Die Abhängigkeit der erreichten Feuchte vom verwendeten Aerosolfluss und der Wassertemperatur wurde mit einem Taupunktspiegel (Michell, S4000) bei einer Temperatur von 37° C und einem Aerosolfluss von 1200 ml/min bestimmt. Zur Aufrechterhaltung der relativen Feuchte bis zur Zelloberfläche wurde das Aerosol direkt nach der Befeuchtung in einen temperierten Thermostaten (Memmert) geleitet (Abbildung 12). Da der Thermostat eine Variabilität der Temperatur von 4% des Mittelwerts aufwies erfolgte die Temperaturregelung mit einem Sollwert von 38.5°C und der Wandtemperatur des Thermostaten als Regelgröße über eine externe Regeleinheit (Isopad, TD 05 N). Im weiteren Verlauf erfolgte eine Aufteilung des Aerosols in 8 Zweigströ-

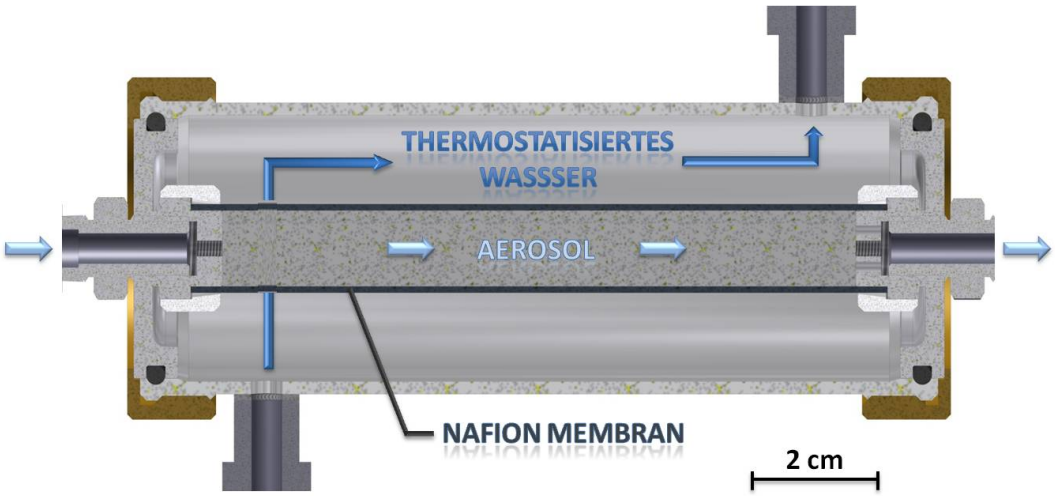


Abbildung 11: Darstellung des in der Depositionsanlage angewendeten Aerosolbefeuchters. Eine NAFION Membran wird von thermostatisiertem Wasser umspült, über dessen Temperatur die relative Feuchte geregelt wird.

me. Um das gleiche Angebot zu gewährleisten und elektrostatische Verluste zu minimieren wurden sechs der Teilströme über 50 cm lange und elektrisch leitfähige Schlauchstücke mit einem Innendurchmesser von 4.83 mm (TSI) bei einer Flussrate von 100 ml/min zur Expositionskammer geleitet. Die übrigen Teilströme dienten zur Kontrolle der relativen Feuchte mit einem kapazitiven Feuchtesensor (Driesen&Kern, DKRF400) und wurden zur weiteren Charakterisierung unter Raumtemperatur wieder getrocknet und den peripheren Geräten zur Aerosolcharakterisierung zugeführt. Das überschüssige Aerosol wurde gefiltert und über einen Flussmesser (TSI, 4140) zur Abluft geleitet. Die eigentliche Deposition der Nanopartikel erfolgte in zwei kommerziell erhältlichen Expositionskammern

(VITROCELL®, PT-CF Stainless Steel) mit je drei Einsätzen für Zellkulturschalen (Corning, 6 Well Plate). Zwei der sechs Einsätze dienten als Negativkontrolle und wurden über zwei autoklavierbare HEPA Filter (Whatman, Hepa-Vent) dem partikelfreien Trägergas ausgesetzt. Der Aerosolfluss wurde über jeder Zellkulturschale mit Durchflussreglern (Bronkhorst, EL-Flow) und einer Membranpumpe (LABOPORT®, N 86 K_.18) auf 100 ml/min geregelt. Zuvor wurde es durch HEPA Filter gereinigt und mit Diffusionstrocknern (Topas, DDU 570/L) getrocknet. Um eine schnelle Einstellung einer konstanten Temperatur der Expositionskammern zu gewährleisten wurden sie mit thermostatisiertem Wasser einer Temperatur von 37.5° C durchspült. Die Temperatur innerhalb und außerhalb der Expositionskammer wurde mit dem Feuchtesensor und zwei Typ K Temperaturfühlern (NiCr-Ni) über einen AD Wandler (Advanteq, USB-4718) kontrolliert. Über eine mit LabView erzeugte Steuersoftware konnten die Durchflussregler, Wasserthermostate und relative Feuchte geregelt, sowie die Temperaturen, der gesamte Aerosolfluss und die Teilflüsse über den Zellen erfasst und dokumentiert werden.

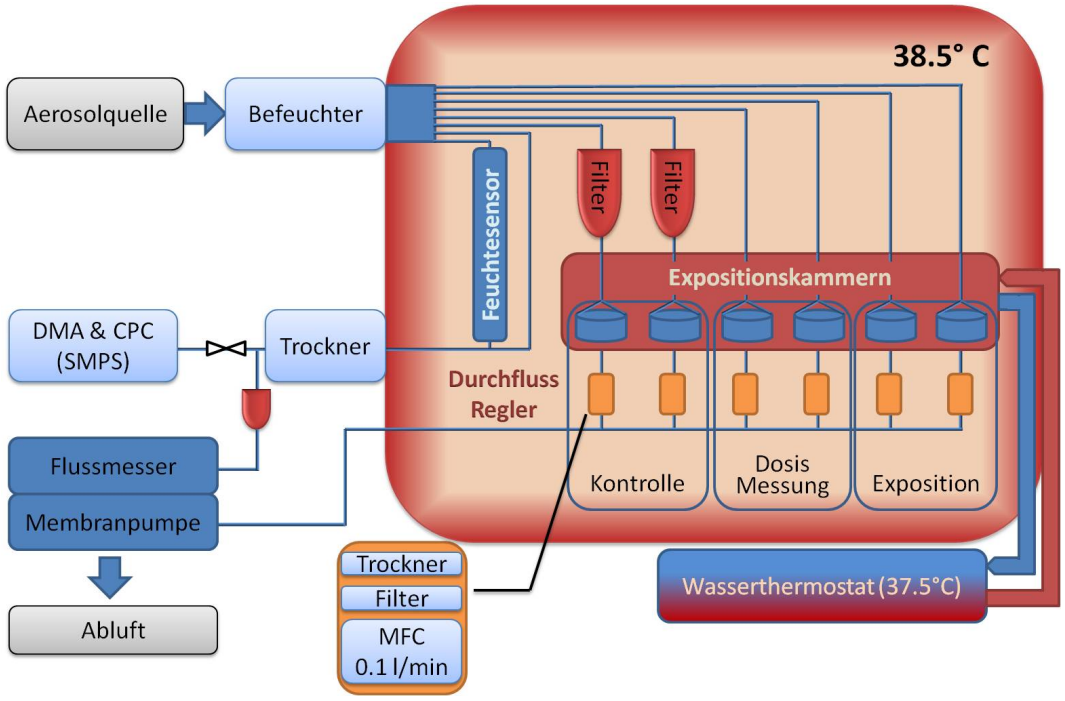


Abbildung 12: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus ALIDA (Air Liquid Interface Deposition Apparatus) zur Exposition von Lungenzellen mit luftgetragenen Partikeln an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht.

4.2.1 Modifikation der Expositionskammer zur elektrostatischen Deposition von Nanopartikeln

Zur Erzeugung eines elektrischen Feldes innerhalb der Expositionskammer wurde ein Elektrodeneinsatz für die verwendeten Expositionsmodule entworfen (Abbildung 13). Eine Erdung des leitfähigen Nährmediums über die Stahlkammern wurde durch einen isolierenden PEEK Einsatz mit einer Höhe von 25.5 mm, einem Durchmesser von 36.7 mm und einer Wandstärke von 1 mm verhindert. Als Gegenelektrode diente ein feinmaschiges Drahtnetz am Ende der geerdeten Aerosolzufuhr. Der zu erwartende Feld- und Potentialverlauf wurde qualitativ mit

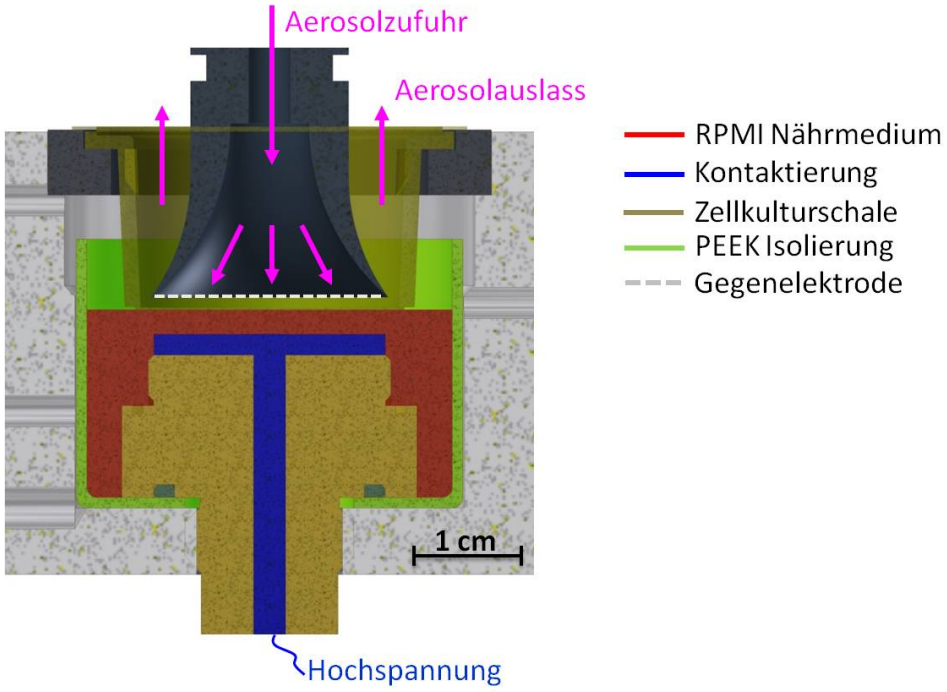


Abbildung 13: Aufbau der Elektrode zur elektrostatischen Abscheidung geladener Partikel auf Lungenzellen.

SimIon (SIS, Verion 8) durch Lösen der Laplace Gleichung für die Geometrie der Expositionskammer modelliert (Abschnitt 5.5). Als Randbedingung wurde das Nährmedium mit der angelegten Spannung als ebene Äquipotentialfläche auf Höhe der Zellkultur angenommen. Die Gegenelektrode, Aerosolzufuhr und Expositionskammer als geerdete Bauteile entsprachen den Äquipotentialflächen von 0 V. Die dielektrischen Eigenschaften des zur Isolierung verwendeten PEEK Materials konnten mit SimIon nicht berücksichtigt werden.

4.2.2 Messung der Depositionseffizienz

Zur experimentellen Bestimmung der Depositionseffizienz sphärischer Partikel in den Expositionskammern wurden TEM Grids auf den Transwelleinsätzen an verschiedenen Positionen platziert und jeweils einem der in Abschnitt 5.1, Abbildung 28 gezeigten Größenverteilungen für die Dauern von 5 h (SiO_2 50, SiO_2 100, SiO_2 200, PS 100), 6 h (PS 2000) und 19 h (SiO_2 1500) exponiert. Die angebotene Partikelkonzentration und Größenverteilung ist simultan mit dem SMPS bei einer zeitlichen Auflösung von 10 Minuten gemessen worden. Für Partikelgrößen oberhalb von 500 nm wurde das SMPS durch das APS ersetzt. Um den für das APS nötigen Gesamtfluss von 5 lpm zu gewährleisten, wurde das Aerosol direkt nach dem Atomizer mit gefilterter Luft verdünnt. Damit Partikelverluste vor den Expositionskammern vernachlässigt werden konnten, wurden die 100 ml/min unmittelbar am Aerosoleinlass abgezweigt. Die Verluste in der restlichen Strecke von 50 cm zum Eingang des APS bei dem Gesamtfluss von 5 lpm können für die verwendeten Partikelgrößen ebenfalls vernachlässigt werden. Zur Bestimmung des Gesamtpartikelangebots N_{ges} wurden die mit dem SMPS und APS gemessenen Anzahlkonzentration mit dem Aerosolfluss von 100 ml/min multipliziert und über die gesamte Versuchsdauer integriert. Die Anzahl an deponierten Partikeln wurde mit dem Transmissionselektronenmikroskop detektiert. Mit einem globalen Schwellwert wurden die Aufnahmen in ein Binärbild transformiert (National Instruments, IMAQ Treshold). Zusammenhängende Pixel mit Grauwerten unterhalb des vorgegebenen Schwellwerts wurden als Partikel identifiziert (National Instruments, IMAQ Particle Analysis) und über die Projetkionsfläche in Größenintervalle eingeteilt. Die Beladungsdichten ergaben sich aus der Gesamtfläche der Aufnahme und der Anzahl an Partikeln innerhalb eines Größenintervalls. Die

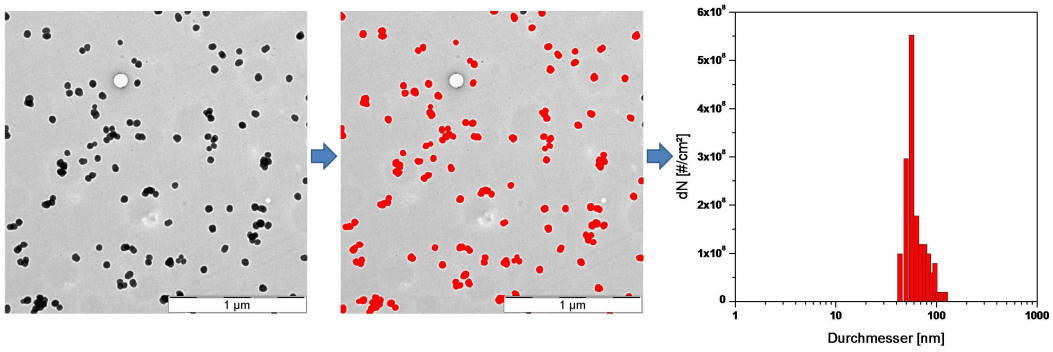


Abbildung 14: Bestimmung der Größenverteilung und Beladungsdichte deponierter Partikel aus TEM Aufnahmen. Das Ausgangsbild (links) wurde mit einem Grauwert als globalen Schwellwert in zwei Segmentgruppen eingeteilt. Die rot gekennzeichneten Flächen (mitte) mit Grauwerten unterhalb des vorgegebenen Schwellwerts entsprechen den erkannten Partikeln. Über die Pixelzahl zusammenhängender, hier rot dargestellter, Bereiche wurden die Partikel über den projektionsflächenäquivalenten Durchmesser in Größenklassen eingeteilt (rechts).

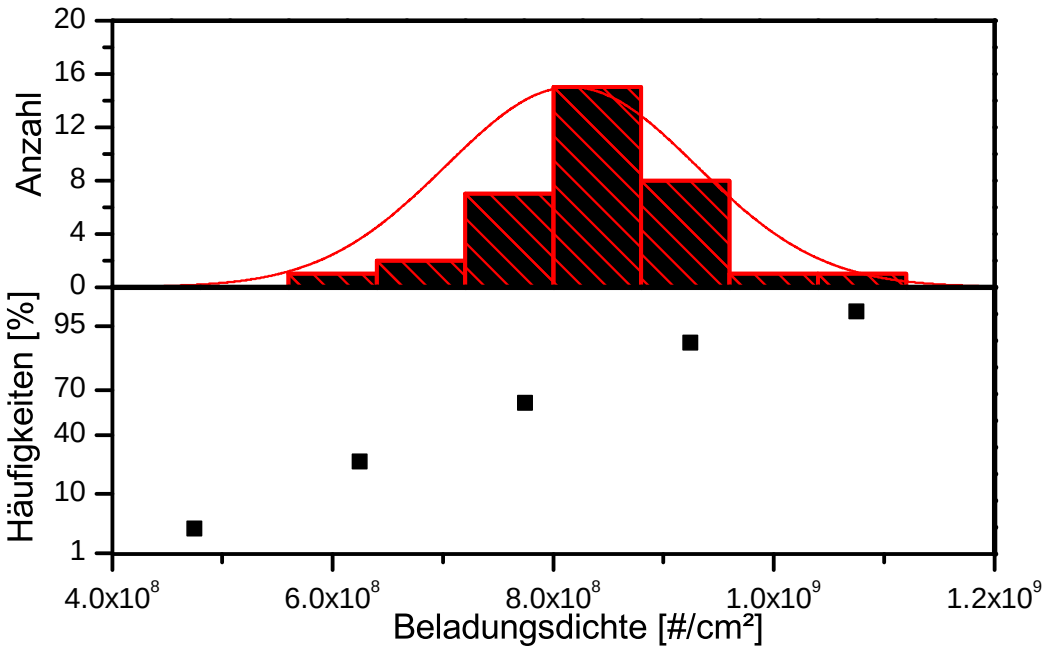


Abbildung 15: Die Wahrscheinlichkeit eine Beladungsdichte innerhalb eines bestimmten Intervalls für ein festgelegtes Größenintervall zu messen folgt annähernd einer Normalverteilung, so dass zur Bestimmung der Unsicherheit eine normalverteilte Grundgesamtheit angenommen wurde. Die gezeigte Verteilung stammt aus 37 TEM Aufnahmen deponierter Ludox AS40 Partikeln innerhalb des Größenintervalls (32.5 ± 5) nm

Auswertung erfolgte jeweils an mindestens 25 Bildern für jedes TEM Netz. Die Vergrößerung am TEM wurde so gewählt, dass möglichst viele Partikel (mindestens 5) mit einer gleichzeitig ausreichenden Auflösung zur Größenbestimmung in dem Bildausschnitt vorhanden waren. Sich am Rand der Aufnahme vorhandenen Partikel sind beim Unterschreiten einer vorgegebenen Pixelzahl nicht in die Auswertung einbezogen worden. Die angegebenen Beladungsdichten eines Größenintervalls entsprechen dem arithmetischen Mittel aus allen Aufnahmen. Die zugehörigen Fehlerwerte ergaben sich aus der Standardabweichung des Mittelwerts mit einem Vertrauensbereich von 68.3% unter Annahme einer normalverteilten Grundgesamtheit (Abbildung 15). Die Depositionseffizienz wurde schliesslich aus der auf diese Weise experimentell bestimmten Beladungsdichte n(r) und dem gesamten Partikelangebot N_{ges} mit Gleichung 16 berechnet.

4.2.3 Simulation der Depositionseffizienz

Zur Bestimmung der Depositionseffizienz wurde das Strömungsfeld innerhalb der Expositionskammer mit ANSYS CFX Version 12 simuliert. Dazu wurde ein den Aerosoleinlass, die Transwellschale und den Aerosolauslass umfassendes Model der Expositionskammer mit dem Ansys Design Modeler erstellt. Für die Simula-

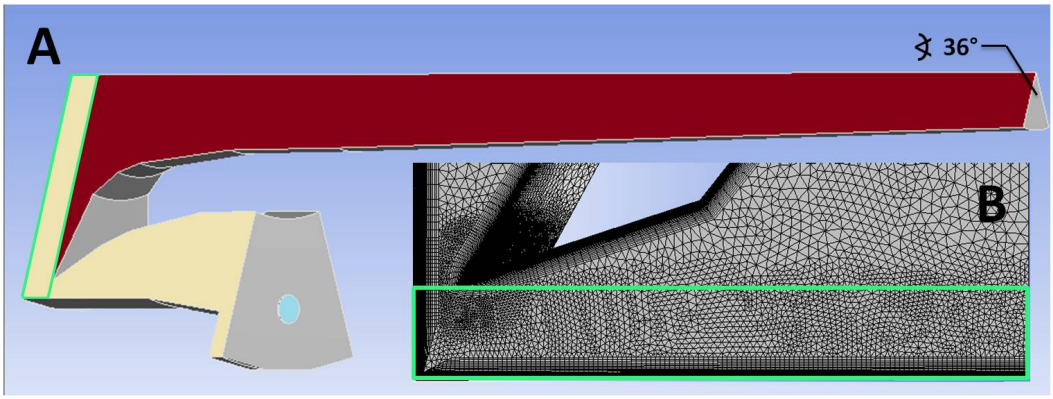


Abbildung 16: **A)** Die zur Simulation des Strömungsfelds innerhalb einer Expositionskammer (vgl. Abbildung 13) verwendete Geometrie bestehend aus dem Aerosoleinlass (rot), der Transwellschale (gelb) und dem Aerosolauslass (blau).
B) Ausschnitt des zur Diskretisierung verwendeten Rechengitters im Bereich der Zellen. Innerhalb des grün umrandeten Bereichs wurden die Partikeltrajektorien extern mit einem 2 dimensionalen Gitter simuliert (siehe Text).

tion wurde das Modell über zwei Symmetrieflächen auf eine alle 36° wiederkehrende Struktur beschränkt. Zur Volumendiskretisierung wurde ein Gitter, bestehend aus 6580626 Zellen und 1869709 Knoten, erstellt (Ansys, CFX Meshing Tool). In wandnahen Bereichen wurde eine Inflationsschicht aus Prismen erzeugt, um die Geschwindigkeitsgradienten senkrecht zur Oberfläche, insbesondere im Bereich der Zellkultur, möglichst genau aufzulösen. Zur Simulation der Strömung wurde von einem konstanten Fluss Q (100 ml/min), Druck am Einlass (1 atm) und einer konstanten Temperatur (37° C) über den Zeitraum eines Expositionsversuchs ausgegangen. Anfangseffekte wurden vernachlässigt und eine stationäre Strömung angenommen $\left(\frac{\partial v_f}{\partial t} = 0\right)$. Als Randbedingung verwendete ich sowohl für das Trägergas als auch die Partikel ein vollständig ausgebildetes Hagen-Poiseuille Strömungsprofil am Eingang des Expositionsmoduls.

$$v(r) = \frac{2Q}{\pi R^4} \cdot (R^2 - r^2) \tag{34}$$

Aufgrund der kleinen Strömungsgeschwindigkeiten bzw. Reynoldszahlen (ca. 26 am Aerosoleinlass) wurde von einer laminaren Strömung ausgegangen. Die Druckdifferenz über der Expositionskammer war experimentell nicht zugänglich und

wurde unter der vereinfachenden Annahme einer zylindrischen Geometrie mit einem Radius von 3 mm auf $3{\cdot}10^{-7}$ Bar abgeschätzt. Zwischen dem Aerosoleinlass und dem Ende der Aerosolzufuhr wurden die Partikeltrajektorien mit dem in CFX implementierten Partikeltransportmodel ohne Berücksichtigung der Diffusion simuliert. Zur weiteren Simulation der Partikeltrajektorien im Bereich der Zellkultur wurde eine ideal rotationssymmetrische Strömung angenommen und ein zweidimensionales Gitter verwendet. Dazu wurden die auf der Symmetrieebene des Modells simulierten Strömungsgeschwindigkeiten zwischen der Zellkultur und dem Ende der trompetenförmigen Aerosolzufuhr (Abbildung 16) exportiert. Anschliessend wurden sie über ein von Renka and Cline [1984] entwickeltes Verfahren mit OriginPro (OriginLab Co., v8.1) in ein gleichmäßiges, 2 dimensionales Gitter, bestehend aus 2000 x 2000 Zellen, überführt. Das entspricht einem Abstand zwischen 2 Gitterpunkten in horizontaler Richtung von 6.1 μm und in vertikaler Richtung von 1 μm. Unter Verwendung von Gleichung 26 und 30 wurden die Trajektorien der als punktförmig angenommenen Partikel mit einem Zeitschritt von 10^{-5} s simuliert. Zur Erzeugung der gaußschen Zufallsvariablen wurde die Box-Muller Transformation verwendet. Die Geschwindigkeit und der diffusive Versatz senkrecht zur Simulationsebene im Bereich der Zellen verursachen nur vernachlässigbar kleine Versätze in radialer Richtung und wurden daher nicht berücksichtigt. Weiterhin wird in radialer Richtung die Partikelbewegung durch die Strömung dominiert, so dass die Diffusion in dieser Richtung aufgrund der verhältnismäßig großen Péclet-Zahl der Partikel ebenfalls vernachlässigt werden konnte. Zur Berechnung der Depositionseffizienz W wurde die Depositionswahrscheinlichkeit D(r), dass ein Partikel mit einer Ausgangsposition zwischen r und r+dr deponiert, bestimmt. Dazu wurden jeweils 1000 Partikeltrajektorien für jede Ausgangsposition in 3.8 μm Intervallen simuliert. Alle Partikel, welche die Position der Zellen erreicht, haben wurden als deponiert gewertet. Über die Rotationsachse hinaus diffundierte Partikel wurden aufgrund der Rotationssymmetrie an der Rotationsachse gespiegelt und weiter simuliert. Alle übrigen Partikel, die den Simulationsbereich verlassen haben oder an der Wand deponierten, wurden als nicht deponiert gezählt. Die Unsicherheit für D(r) wurde dabei aus der Standardabweichung einer Bernoulli-Verteilung und der Anzahl der durchgeführten Simulationen bestimmt. Aufgrund des annähernd rotationssymetrischen Aufbaus ergab sich die Depositionseffizienz schliesslich aus

$$W(d,\rho,Q,s) = \frac{2\pi \int_0^R rD(r)n(r)v(r)dr}{2\pi \int_0^R rn(r)v(r)dr} \tag{35}$$

wobei $n(r)$ die Partikelkonzentration, R den Radius am Eingang des Expositionsmoduls und v(r) die Partikelgeschwindigkeit am Einlass angeben. Der Nenner in Gleichung 35 entspricht der Gesamtzahl der in einem Zeitintervall dt in das Expositionsmodul eintretenden Partikel, wohingegen der Zähler die Anzahl der im gleichen Zeitintervall auf der Zelloberfläche deponierten Partikel angibt. Für

die weitere Berechnung wurde die Partikelkonzentration als konstant und das in Gleichung 34 angegebene Geschwindigkeitsprofil angenommen. Für Partikel deren Durchmesser d_p wesentlich größer gegenüber der mittleren freien Weglänge λ des Gases ist wurde als weitere Vereinfachung ohne Berücksichtigung der Diffusion eine Stufenfunktion für die Depositionswahrscheinlichkeit verwendet.

$$D(r) = \begin{cases} 1 \forall r < R' \\ 0 \forall r \geq R' \end{cases},$$

mit R' als maximalen Abstand zur Symmetrieachse am Eingang des Expositionsmoduls, von dem aus ein Partikel gerade noch auf der Zelloberfläche deponiert. Gleichung 35 lässt sich so vereinfacht darstellen als

$$W(d, \rho, Q, s) = \frac{\int_0^{R'} rv(r)dr}{\int_0^{R} rv(r)dr} = \frac{2R^2R'^2 - R'^4}{R^4} \approx \frac{2R'^2}{R^2} \tag{36}$$

Im Fall von Partikeln mit Durchmessern von über 1 μm wurde die Simulation auf eine einzige Partikeltrajektorie pro Ausgangsintervall zur Bestimmung von R' beschränkt und die Depositionseffizienz mit Gleichung 36 berechnet. Die Unsicherheit der Depositionseffizienz ergibt sich in diesem Fall aus der Größe der Ausgangsintervalle Δr und der Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes auf Gleichung 36 als

$$\Delta W(d, \rho, Q, s) = \left| \frac{\partial W}{\partial R'} \right| \cdot \Delta r = \frac{4}{R^4}(R^2R' - R'^3) \cdot \Delta r$$

Die Unsicherheit für kleinere Partikel wurde dagegen durch Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes auf Gleichung 35 bestimmt, wobei die Depositionswahrscheinlichkeit als einzige fehlerbehaftete Größe angenommen wurde.

Abbildung 17: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Simulation der Depositionseffizienz. Mit Ansys CFX wurde das Strömungsfeld innerhalb der gesamten Expositionskammer und die Partikeltrajektorien in der Aerosolzufuhr simuliert. Davon ausgehend wurden die Partikeltrajektorien im Bereich der Zellkultur extern zweidimensional unter Berücksichtigung der brownschen Molekularbewegung simuliert und aus der Depositionswahrscheinlichkeit die Depositionseffizienz berechnet

4.3 Durchführung der Expositionsversuche

Zur Kontrolle der Zellverträglichkeit und Funktionsweise der beschriebenen Anlage wurden verschiedene Expositionsversuche mit partikelfreier Luft, TiO_2 Partikeln, SiO_2 Partikeln und Kohlenstoffpartikeln an menschlichen A549 Lungenepithelzellen durchgeführt. Vor jedem Versuch wurden die Expositionskammern mit Isopropanol und anschliessend mit Wasser gereinigt. Danach wurden die Kammern mit dem in Tabelle 4 beschriebenem Nährmedium so gefüllt, dass die Membranen der Transwelleinsätze gerade so benetzt worden sind. Für die Kammern

Komponente	*RPMI 1640*	*Penicillin*	*Streptomycin*	*Hepes*
Zusammensetzung	*500 ml*	*100 U/ml*	*100 mg/ml*	*10 mM*

Tabelle 4: Zusammensetzung des zur Exposition verwendeten Nährmediums nach Panas [2011]

ohne Elektroden entsprach das einem Volumen von 15 ml und mit Elektroden von 10 ml. Die mit TEM Netzen versehenen Kammern zur Dosisbestimmung wurden auf die gleiche Weise mit Wasser gefüllt. Die am Institut für Toxikologie und Genetik vorbereiteten Zellkulturschalen [Panas, 2011] beinhalteten $1.3 \cdot 10^5$ Zellen/cm^2. Sie wurden unmittelbar nach deren Ankunft in die Expositionskammer eingesetzt und mit 100 ml/min befeuchteter synthetischer Luft versorgt. Die Temperatur des Befeuchters wurde so geregelt, dass die relative Feuchte während der gesamten Expositionsversuche zwischen 80% und 90% lagen. Sobald sich nach dem Schliessen der Anlage eine weitgehend stabile Temperatur und Feuchte eingestellt hat, wurde das Aerosol hinzugefügt. Zur Kontrolle des Partikelangebots während der Exposition wurde in 10 min Abständen die Partikelanzahlgrößenverteilung mit dem SMPS gemessen. Anschließend wurde die zytotoxische und inflammatorische Wirkung der Exposition auf die Zellen anhand der Membranintigrität, metabolischen Aktivität, IL-8 Freisetzung, COX-2 Induktion und p38 Aktivierung bewertet [Panas, 2011]. Abgesehen von der Dieselrußexposition wurden alle Versuche für jeden Endpunkt mindestens einmal wiederholt. Als Kontrolle dienten zwei Zellkulturschalen, die dem gefilterten Aerosol (Whatman, Hepa-Vent) ausgesetzt wurden. Für alle mit Elektrode durchgeführten Versuche wurde eine Spannung von 1 kV angelegt und eine weitere Kontrolle ohne elektrisches Feld mit dem gefilterten Aerosol behandelt. Alle Expositionsversuche erfolgten mit einem Abstand von 2 mm zwischen der Zelloberfläche und dem Ende der trompetenförmigen Aerosolzufuhr bzw. Gegenelektrode.

4.3.1 Blindversuche mit Partikelfreier Luft

Die Zellen wurden für die Dauern von 2 h, 4 h und 5 h mit befeuchteter synthetischer Luft bei CO_2 Volumenkonzentrationen von 0%, 5% und 10% behandelt.

Parallel wurden äquivalente Zellkulturschalen in einem Brutschrank bei 80% bis 90% relativer Feuchte und 5% CO_2 gehalt aufbewahrt. Als Kontrolle dienten weitere Zellkulturschalen die auf einer 37° C warmen Platte innerhalb der 6 Well Plate Schale (Corning) unter ALI Bedingungen inkubiert wurden. Zur Auswertung der Zellverträglichkeit der Anlage wurden die Membranintegrität und die metabolische Aktivität mit denen der Kontrolle und den im Brutschrank inkubierten Zellen verglichen. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss des elektrischen Feldes auf die Zellen untersucht. Dafür wurden gleichzeitig jeweils 3 Zellkulturschalen mit einer angelegten Spannung von 0 kV und 1 kV für 5 h behandelt.

4.3.2 Exposition mit SiO_2 Nanopartikeln

Zur Untersuchung der zytotoxischen und inflammatorischen Wirkung von SiO_2 Partikeln wurden die Zellen SiO_2 Partikeln unterschiedlicher Primärpartikel- und Agglomeratgröße ausgesetzt. Als gasphasensynthetisiertes Material wurden Aerosil200 und SiO_2 MWP Partikel eingesetzt (Tabelle 3). Zum Vergleich wurden die mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten 70 nm SiO_2 Partikel von Postnova (Tabelle 2) mit zwei verschiedenen Agglomeratanteilen angeboten.

SiO_2 70 Partikel mit Fluoreszenzmarkierung

Zur Aerosolerzeugung wurden die Suspensionen wie in Abschnitt 4.1 beschrieben mit dem Elektrospray und Atomizer versprüht. Die Konzentration der verwendeten Suspensionen betrugen 7 mg/ml für das Elektrospray und 3.25 mg/ml für den Atomizer. Der Versuch mit dem Elektrospray wurde mit Elektrode bei einer angelegten Spannung von 1 kV über die Dauer von 5 h durchgeführt. Der Verlauf der Anzahlgrößenverteilung und insgesamt angebotenen Partikelkonzentration in Abhängigkeit der Zeit sind in Abbildung 18 dargestellt. Zur Dosisbestimmung wurden 2 TEM Netze auf einer Transwellschale platziert und die deponierte Menge mit der in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Methode bestimmt. Die Massen- und Oberflächendosis wurde unter der Annahme sphärischer Primärpartikel einer Dichte von 2 g/cm^3 aus der Partikalanzahl bestimmt

Die Expositionen gegenüber der mit dem Atomizer erzeugten SiO_2 70 Aerosole erfolgten ebenfalls mit Elektroden bei einer angelegten Spannung von 1 kV. Im Gegensatz zum Elektrospray betrug die Versuchsdauer jedoch 7 h. Aufgrund des hohen Agglomeratanteils und der daraus resultierenden Dosis war eine Auswertung der belegten TEM Netze für die gesamten Versuchsdauern nicht mehr möglich. Sie wurden daher nur für eine Dauer zwischen 40 min und 1 h belegt. Die Menge an deponiertem Material wurde in Abhängigkeit des Partikelangebots bestimmt. Die gesamte deponierte Dosis wurde anschliessend aus dem Gesamtpartikelangebot extrapoliert. Da die Primärpartikel nicht vollständig aus den

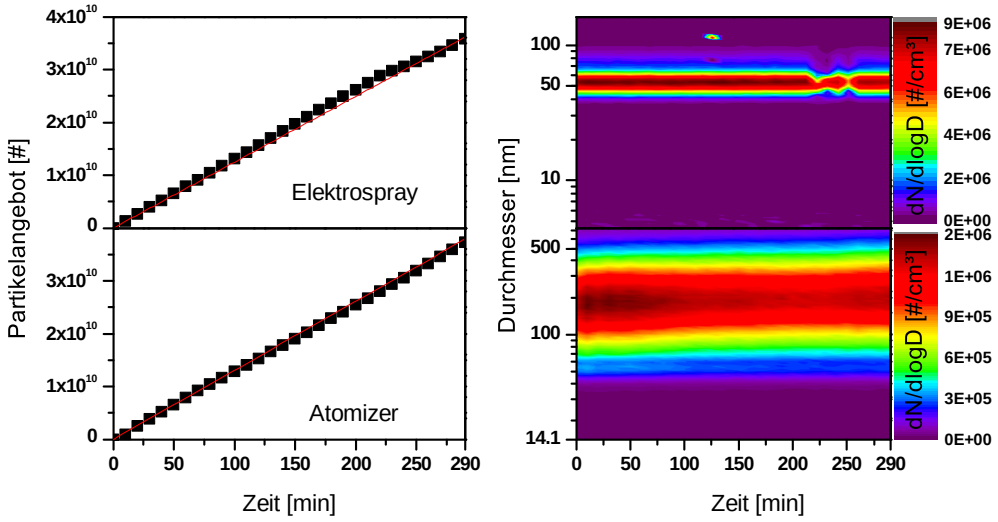


Abbildung 18: Typischer zeitlicher Verlauf des Partikelangebots (links) und der Größenverteilungen (rechts) während einer Exposition von A549 Zellen mit den FITC markierten SiO_2 70 Partikeln. Die angebotenen Anzahlkonzentrationen mit dem Elektrospray (oben) und dem Atomizer (unten) sind nahezu identisch, wohingegen die Anzahl der im Aerosol enthaltenen Primärpartikel und somit auch die Massenkonzentration im Fall des Atomizers aufgrund des großen Agglomeratanteils wesentlich höher ist.

verhältnismäßig großen Agglomeraten aufgelöst werden konnten, wurden sphärische Agglomerate zur Bestimmung der Partikelmasse angenommen. Aus der so bestimmten deponierten Masse wurde die gesamte Partikeloberfläche und Primärpartikelzahl unter der Annahme sphärischer Primärpartikel mit Gleichung 22 bestimmt. Zur Validierung der Extrapolation und der Gültigkeit der vereinfachenden Annahme sphärischer Agglomerate wurden zusätzlich Transwellschalen über verschiedene Zeiträume dem gleichen Aerosol ausgesetzt und anschliessend mit 0.8 ml Wasser gefüllt. Die Menge des darin deponierten Materials wurde über die Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzspektrometer (Bio-Tec, FL600) bestimmt. Zur Kalibration wurden parallel 0.8 ml Suspensionen in Transwellschalen mit Konzentrationen von 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml und 1 mg/ml eingesetzt. Die Anregung erfolte bei einer Wellenlänge von 485 $\pm$ 10 nm und die Emission wurde bei 530 $\pm$ 12.5 nm detektiert.

Aerosil200

Aerosil200 wurde mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser suspendiert und mit dem Atomizer versprüht. Die Expositionsversuche wurden sowohl mit, als auch ohne Elektrode durchgeführt. In beiden Fällen erfolgte die Dosisbestimmung wie im Fall der Postnovapartikel über die Auswertung zweier exponierter TEM Netze. Wegen der mit elektrischem Feld hohen Partikeldosis wurde die Menge an deponiertem Material wiederum aus einer 1 h Exposition extrapoliert.

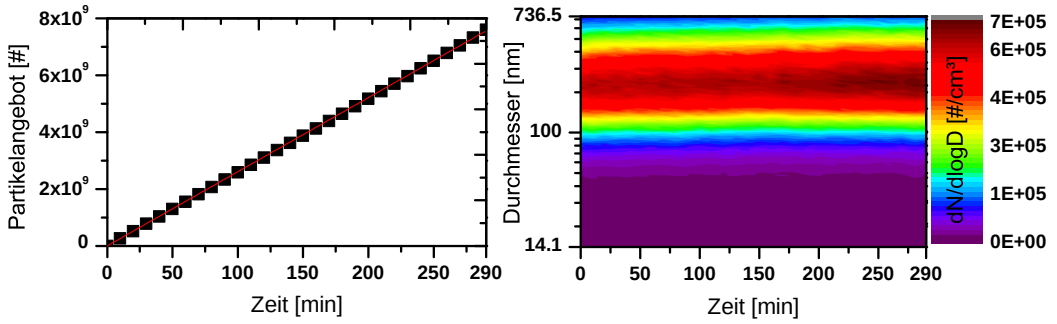


Abbildung 19: Typischer zeitlicher Verlauf der angebotenen Partikelmenge (links) und Anzahlgrößenverteilung (rechts) während einer Exposition der A549 Zellen mit Aerosil200 Partikeln.

Für die Berechnung der Massendosis wurden ebenfalls sphärisch geformte Agglomerate angenommen. Die Oberflächendosis wurde aus der Massendosis und der vom Hersteller angegebene BET Oberfläche bestimmt. Da das Aerosil keine sphärischen Primärpartikel mit schmaler Größenverteilung aufweist und weitgehend agglomerierte sowie aggregierte Primärpartikel enthält (Abschnitt 5.1.2) konnte keine Primärpartikeldosis bestimmt werden.

SiO_2 MWP

Die im Flüssigabscheider gesammelten Partikelsuspensionen (Abschnitt 4.1) wurden unbehandelt mit dem Elektrospray versprüht. Die Expositionen erfolgten über 5 h ohne elektrisches Feld. Die deponierte Anzahldosis wurde mit der Depositionseffizienz für SiO_2 Partikel nach Gleichung 38 aus den angebotenen Anzahlgrößenverteilungen bestimmt. Zur Berechnung der Massendosis wurde Gleichung 13 verwendet. Die Primärpartikel- und Oberflächendosis wurden aus der Primärpartikelverteilung mit Gleichung 22 und 23 bestimmt.

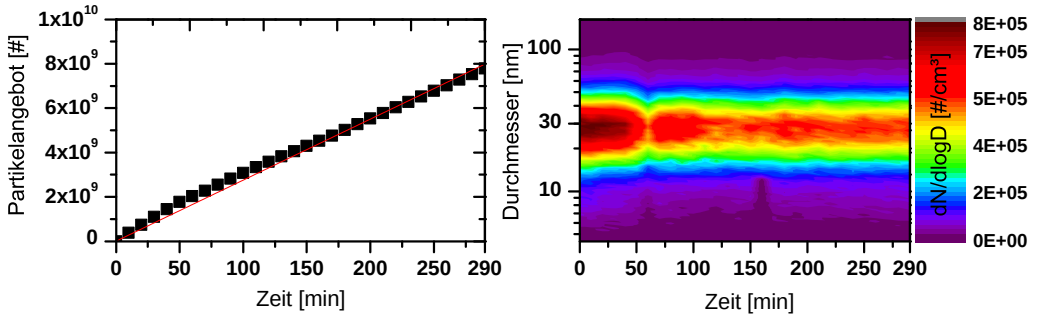


Abbildung 20: Typischer zeitlicher Verlauf der angebotenen Partikelmenge (links) und Anzahlgrößenverteilung (rechts) während einer Exposition von A549 Zellen mit flüssig abgeschiedenen SiO_2 Partikeln aus der Mikrowellenplasmasynthese.

4.3.3 Exposition mit TiO_2 Nanopartikeln

Die Exposition der TiO_2 Partikel erfolgte ohne elektrisches Feld für die Dauer von 5 h. Die Ausgangssuspension wurde mit der 5 mM Salpetersäure nach dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Verfahren mit einer Konzentration von 1 mg/ml erzeugt und mit dem Elektrospray versprüht. Die Dosisbestimmung erfolgte über die Depositionseffizienz mit Gleichung 38. Zur Berechnung der Massendosis wurde eine fraktale Dimension der Partikel aus TEM Aufnahmen abgeschätzt und der massenäquivalente Durchmesser der deponierten Partikel mit einer effektiven Dichte von 2 g/cm^3 (Abschnitt 5.2) über das in Abschnitt 3.2.2 beschriebene Verfahren mit Gleichung 13 bestimmt. Die Berechnung der Primärpartikeldosis erfolgte aus der so bestimmten Massendosis mit Gleichung 22.

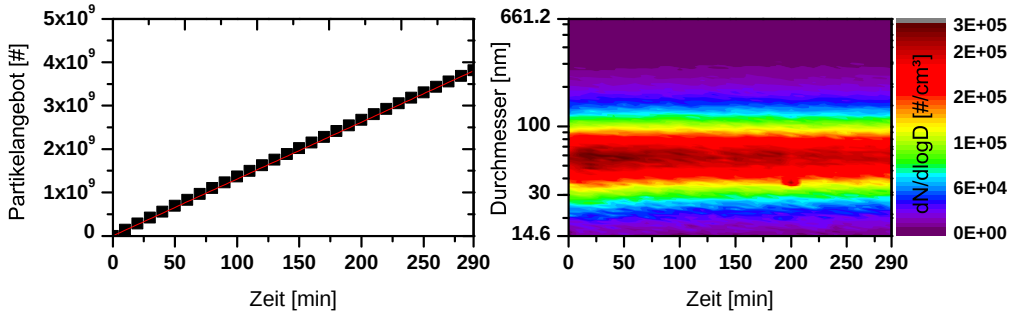


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der angebotenen Partikelmenge (links) und Anzahlgrößenverteilung (rechts) während einer Exposition von A549 Zellen mit 20 nm TiO_2 Partikeln aus der Flammensynthese.

4.3.4 Exposition mit Kohlenstoffpartikeln

Obwohl der Fokus der Arbeit auf der toxischen Wirkung von Metalloxidnanopartikeln liegt, wurden zum Vergleich Versuche mit 2 Arten an Kohlenstoffpartikeln durchgeführt. Kohlenstoffpartikel stellen ein hinsichtlich der toxischen Wirkung sowohl in submers, als auch ALI Experimenten, bereits gut charakterisiertes Material dar. Zur Exposition mit Kohlenstoffpartikeln wurde Printex90 von Evonik mit einem Primärpartikeldurchmesser von 14 nm sowie Dieselruß aus einem mobilen Motorteststand verwendet.

Printex 90 Partikel

Die Exposition der Printex 90 Kohlenstoffpartikel erfolgte ohne Elektrode für die Dauer von 5 h. Die Ausgangssuspension ist mit einer Konzentration von 0.4 mg/ml angesetzt und mit dem Atomizer versprüht worden. Im Gegensatz

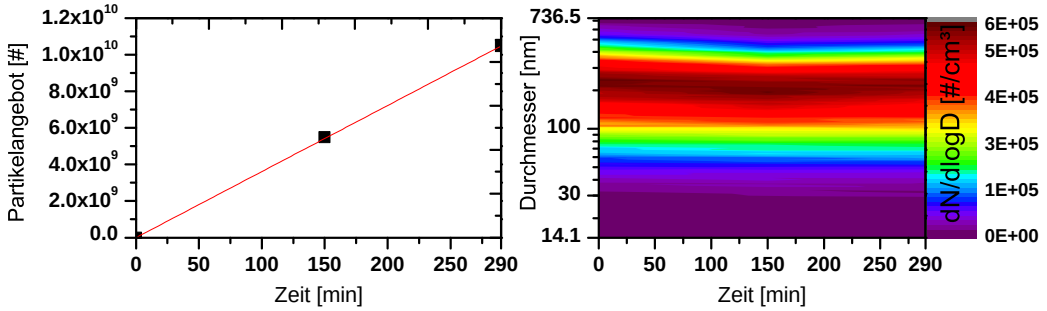


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der angebotenen Partikelmenge (links) und Anzahlgrößenverteilung (rechts) während einer Exposition von A549 Zellen mit Printex 90 Kohlenstoffpartikeln mit einem Primärpartikeldurchmesser von 14 nm.

zu den anderen Expositionen wurden nur 3 SMPS Spektren des angebotenen Aerosols über den gesamten Expositionszeitraum aufgenommen. Die Dosisbestimmung erfolgte zum einen über die Depositionseffizienz nach Gleichung 38 mit einer Partikeldichte von 2.3 g/cm^3. Zum Vergleich habe ich zusätzlich zwei TEM Netze während der Exposition mit den Partikeln beladen. Zur Bestimmung der Partikelgröße aus den TEM Aufnahmen ist wiederum der projektionsflächenäquivalente Durchmesser verwendet worden. Wie im Fall des Aerosils und der SiO_2 70 Partikel bildeten die Printex 90 Partikel kompakte Agglomerate hoher fraktaler Dimensionen. Eine Auflösung der Primärpartikelanzahl und Bestimmung der fraktalen Dimension aus den TEM Aufnahmen wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben war daher nicht möglich. Die Bestimmung der Masse erfolgte deswegen wie für die Aerosil200 Partikel über den projektionsäquivalenten Durchmesser unter der Annahme kompakter Agglomerate.

Dieselruß

Die Exposition gegenüber Dieselruß erfolgte im Rahmen der SOOT11 Kampagne an der AIDA Aerosol- und Wolkensimulationskammer [Wagner et al., 2006]. Als Partikelquelle diente ein 2.0 l Common Rail Volkswagen Dieselmotor auf einem mobilen Teststand vom Institut für Kolbenmaschinen des Karlsruher Instituts für Technologie. Der Motor wurde bei einer Umdrehungszahl von 2000 rpm mit einer Last von 195 Nm betrieben. Die Aerosolentnahme erfolgte vor dem Partikelfilter. In dem Abgas vorhandene Stickoxide und Kohlenwasserstoffe wurden wie von Saathoff et al. [2003] beschrieben mit einem Molekularsieb, Aktivkohlefilter und Kobaltoxiddenuder entfernt. Anschliessend wurde eine Edelstahlkammer mit einem Füllvolumen von 3.7 m^3 mit dem Aerosol befüllt. Von dort wurde es mit einem Volumenstrom von 1 lpm zur Depositionskammer geleitet. Die Exposition erfolgte über den Zeitraum von 5 h. Der Versuch wurde mit Elektroden bei einer

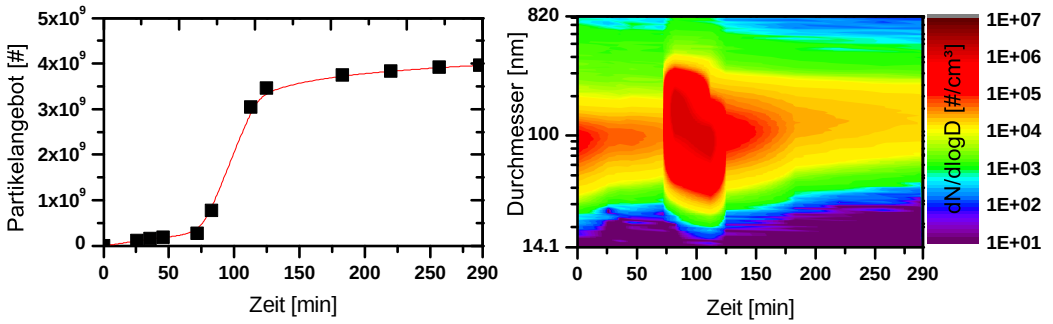


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der angebotenen Partikelmenge (links) und Anzahlgrößenverteilung (rechts) während der Exposition von A549 Zellen mit Dieselrußpartikeln aus einem 2.0l Common Rail VW Diesel Motor. Der plötzliche Anstieg der Konzentration nach 72 min wurde durch die erneute Befüllung des NAUA Behälters mit Dieselrußpartikeln verursacht. Durch Koagulation der Partikel und geringfügige Wandverluste innerhalb des Behälters stieg der modale Partikeldurchmesser während des Versuchs von 88 nm auf 126 nm an.

Spannung von 1 kV durchgeführt. Um die Konzentration während der Exposition aufrecht zu erhalten wurde die Kammer für 50 min neu befüllt. Für die Dosisbestimmung wurden 2 TEM Netze über den gesamten Versuchszeitraum exponiert und zur Massenbestimmung wiederum eine Primärpartikeldichte von 2.3 g/cm^3 angenommen. Als fraktale Dimension diente ein für Dieselrußpartikel typischer Wert von 1.8 [Luo et al., 2005]. Die Berechnung der Primärpartikeldosis erfolgte über Gleichung 20 mit den von Brasil et al. [1999] angegebenen Werten für α und k_a.

Partikel		Aerosil 200	SiO_2 MWP	SiO_2 50		TiO_2 20	C Diesel	Printex 90
				ES	ATM			
Versuchsdauer	h	5	5	5	7	5	5	5
Mode	nm	241 ± 7	29 ±2	53 ± 1	194±10	60 ± 2	93 ± 6	220 ± 20
Geom. Standardabweichung	-	1.8	1.6	1.2	1.8	1.7	1.5	1.8
Angebotene Anzahldosis	E9 #	8 ± 3	8.4±0.2	41 ± 4	40 ± 10	3.9 ± 0.9	4 ± 0.1	10 ± 1
Versuchszahl pro Endpunkt	#	4	2	2	3	3	1	1

Tabelle 5: Übersicht über die durchgeführten Expositionsversuche und die Eigenschaften der dafür verwendeten Aerosole.

5 Resultate

Für erfolgreiche Untersuchungen zur toxikologischen Wirkung von Nanopartikeln auf Lungenzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht ist die Erzeugung luftgetragener Nanopartikel und die Quantifizierung der deponierten Dosis die wichtigste Vorraussetzung. Im Folgenden werden einerseits die dafür erforderlichen Eigenschaften verschiedener Aerosole charakterisiert. Ein Schwerpunkt liegt insbesondere in der Bestimmung der Gesamtpartikelkonzentrationen und dem Anteil an Agglomeraten sowie deren Struktur zur Quantifizierung der deponierten Anzahl-, Massen- und Oberflächendosis. Andererseits wird auf die Ergebnisse aus den in den Abschnitten 4.2.2 und 4.2.3 beschriebenen Simulationen und Experimenten zur Bestimmung der Depositionseffizienz mit und ohne Elektrode eingegangen. Zur Bestätigung der Zellverträglichkeit der gesamten Anlage wird der Einfluss von partikelfreier Luft auf A549 Zellen demonstriert. Abschliessend wird am Beispiel verschiedener Partikel die Funktionsweise der Anlage demonstriert und die daraus resultierende biologische Wirkung ausgewählter Aerosole präsentiert. Insofern nichts anderes beschrieben wurde, entsprechen alle angegebenen Werte den Mittelwerten und der Standardabweichung aus mehreren Versuchen bzw. Messungen.

5.1 Residual- und Agglomeratanteil der Aerosole

Eine wichtige Rolle bei der Durchführung von Expositionsversuchen spielt der Agglomerat- und Residualpartikelanteil. Um eine fälschlicherweise durch Residuen verusachte biologische Wirkung ausschliessen zu können ist insbesondere der Residualpartikelanteil zu minimieren. Abbildung 24 zeigt die Größenverteilungen nach dem Versprühen der zur Suspendierung und Verdünnung verwendeten Stammlösungen. Für die verdünnte Salpetersäurelösung ergeben sich nur sehr geringe Partikelkonzentrationen von $(1.4 \pm 0.8)\cdot 10^5$ Partikeln/cm^3 mit Größen unterhalb von 7 nm. Der Volumenanteil an Residuen aus dem Wasser und der Salptersäure gegenüber Nanopartikeln mit Größen oberhalb von 10 nm ist somit vernachlässigbar klein. Im Gegensatz dazu weißt der mit Nanopure Wasser betriebene Atomizer eine deutliche Mode mit $(1.5 \pm 0.5)\cdot 10^5$ Partikeln/cm^3 bei (26 ± 4) nm mit einer geometrischen Standardabweichung von 1.7 ± 0.04 auf. Das ergibt ein Residualvolumen von $(7 \pm 3)\cdot 10^9$ nm^3/cm^3. Die Residuen liegen damit in der gleichen Größenordnung wie die Monomere relevanter Nanopartikel vor und können einen großen Anteil der exponierten Partikeldosis ausmachen. Der Grund für die größere Residualpartikelmenge gegenüber dem Elektrospray ist der verhältnismäßig große Durchmesser der erzeugten Tröpfchen. Eine ebenfalls deutliche Residualpartikelmode zeigt sich für die Ammoniumacetatlösung mit einer Konzentration von $(1.6 \pm 0.2)\cdot 10^6$ Partikeln/cm^3 bei (6 ± 1) nm und einer geometrischen Standardabweichung von 1.37 ± 0.06. Daraus resultiert ein

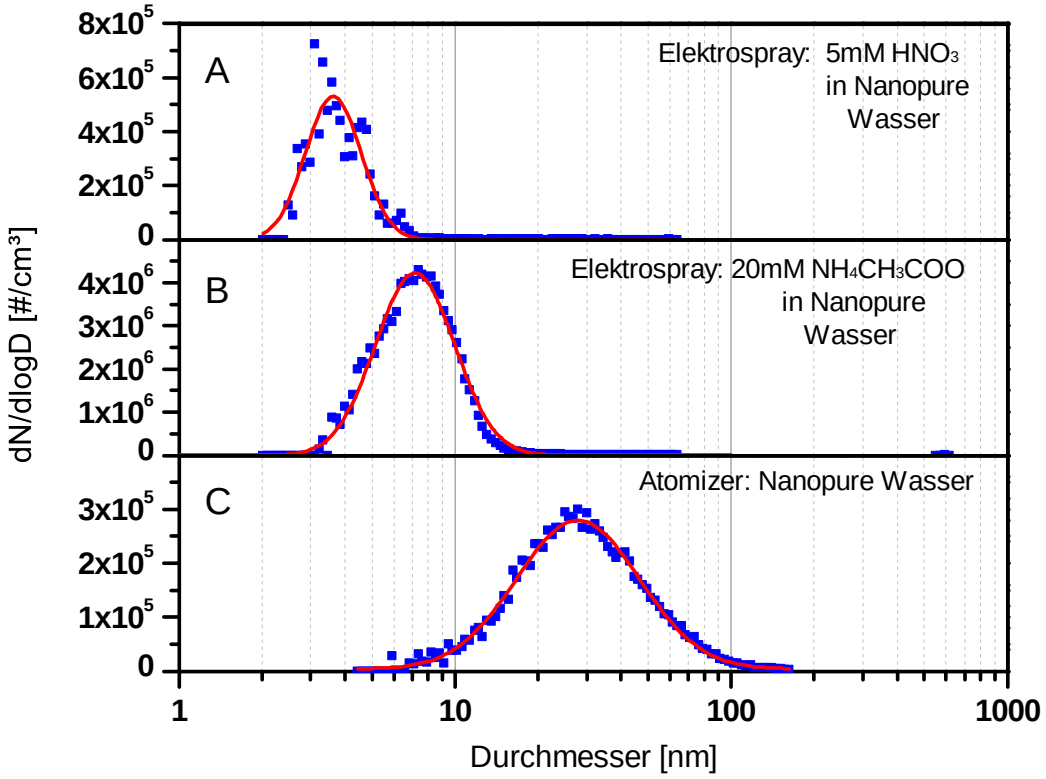


Abbildung 24: Die sich mit dem Elektrospray ergebenden Größenverteilungen für die 5 mM Salpetersäure (**A**) und 20 mM Ammoniumacetatlösung (**B**) bei einer Primärtröpfchengröße von 250 nm. Die Ammoniumacetatlösung zeigt trotz der äquivalenten Tropfengröße ein um einen Faktor 60 größeres Residualvolumen gegenüber der verdünnten Salpetersäure. Eine noch stärkere Residualmode weißt der mit Wasser betriebene Atomizer (**C**) mit einem Residualvolumen von $7{\cdot}10^9$ nm^3/cm^3 auf. Die Symbole entsprechen den Werten einer Messung und die Linien dem fit mit einer logarithmischen Normalverteilung.

um ein Faktor 15 bis 85 größeres Residualvolumen gegenüber der verdünnten Salpetersäure. Nach Gleichung 9 ergibt sich sowohl für die Ammoniumacetat- als auch die Salpetersäurelösung unter Verwendung der Permitivität des Wassers eine Tropfengröße von 250 nm. Die starken Unterschiede in der Residualpartikelkonzentration und Größe können daher nur von einer höheren Konzentration an gelösten Salzen in der Ammoniumacetatlösung stammen. Im Folgenden wird eine Abschätzung der Residualpartikel- und Agglomeratanteile für verschiedene Partikelsuspensionen gegeben.

5.1.1 Stabilisierte kommerzielle Suspensionen

Die auf 0.4% verdünnten Ludox AS40 Suspensionen zeigen mit dem Elektrospray für beide Lösungen deutlich zwei Moden bei 29 nm und 37 nm mit einer geometrischen Standardabweichung von 1.17 ± 0.01 (Abbildung 25). Diese können den SiO_2 Monomeren und Dimeren zugeordnet werden. Abgesehen von den SiO_2 Mo-

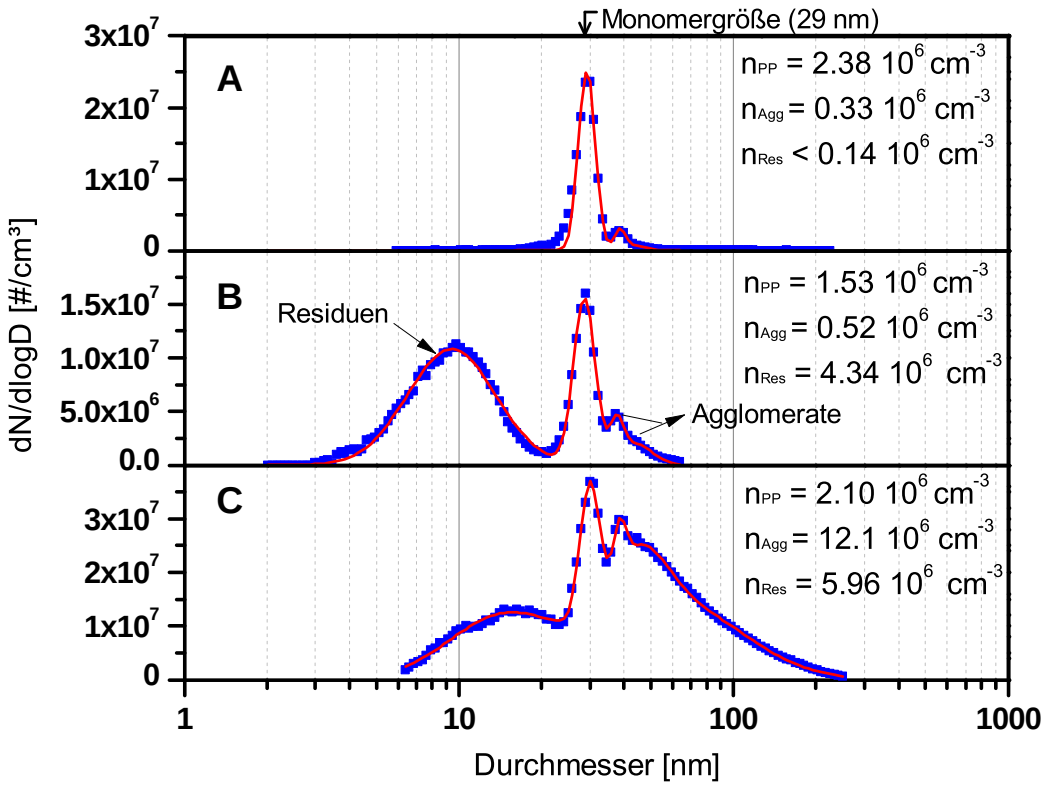


Abbildung 25: Mit dem Elektrospray erzeugte Anzahlgrößenverteilung einer 0.4%igen Ludox AS40 Suspension in 5mM Salpetersäurelösung **(A)** und 20 mM Ammoniumacetatlösung **(B)**. Für die Salpetersäurelösung ergibt sich mit 14% ein leicht geringerer Agglomeratanteil gegenüber der Ammoniumacetatlösung mit 32%. Die mit Ammoniumacetat erzeugte Suspension weißt zusätzlich eine Residualmode mit einem Volumenanteil von 8% auf. Diese ist ebenfalls in der mit dem Atomizer erzeugten Größenverteilung **(C)** zu finden. Aufgrund des hohen Agglomeratanteils von 85% liegt der Volumenanteil in diesem Fall jedoch nur bei 0.5%. Die Symbole entsprechen den Werten einer exemplarischen Messungen und die Linien einem Fit mit bis zu 5 Moden logarithmischer Normalverteilungen.

den weißt die mit der Ammoniumacetatlösung verdünnte Suspension zusätzlich eine Residualmode bei 10 nm auf. Aus der gezeigten Größenverteilung ergibt sich unter Annahme kompakter sphärischer Partikel und Agglomerate ein Volumenanteil der Residualpartikel von 8%. Aus den Fits der Größenverteilungen ergeben sich Agglomeratanteile von $(14 \pm 1)\%$ und $(32 \pm 3)\%$ für die Salpetersäure- und Ammoniumacetatlösung. Trotz des geringeren Zetapotentials beim Wechsel der SiO_2 Partikel in eine saure Umgebung ist keine Abnahme der Partikelstabilität oder eine daraus resultierende Zunahme des Agglomeratanteils zu erkennen. Die ungewöhnliche Stabilität von SiO_2 Partikeln bei diesen nah am isoelektrischen Punkt liegenden pH Werten wurde bereits von anderen Gruppen beschrieben [Kobayashi et al., 2005]. Als Ursache vermuten Kobayashi et al. [2005] eine Schicht kurzer, polymerähnlicher Kieselsäuresegmente an der Partikeloberfläche, welche

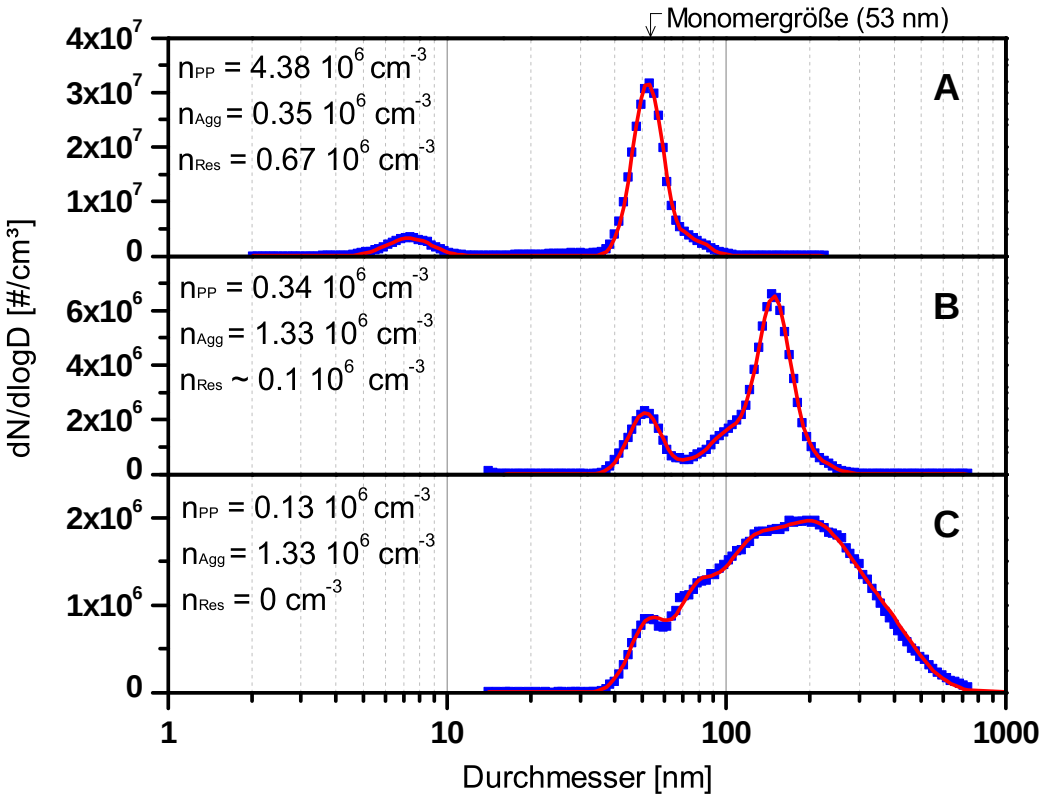


Abbildung 26: Mit dem Elektrospray erzeugte Anzahlgrößenverteilung einer SiO_2 70 Suspension in 5mM Salpetersäurelösung bei einer Ausgangskonzentration von $2{\cdot}10^{13}$ Partikeln/cm^3 **(A)**. Die Größenverteilung weißt eine deutlich stärkere Residualmode gegenüber der Stammlösung mit einem Volumenanteil von 0.036% auf. Der Agglomeratanteil liegt bei 7%. Für höhere Ausgangskonzentrationen treten Instabilitäten des Taylor Cones auf. Die unverdünnte Suspension mit einer Ausgangskonzentrationen von $7{\cdot}10^{13}$ Partikeln/cm^3 **(B)** ergibt daher eine bimodale Größenverteilung mit einem Agglomeratanteil von 79%. Der Atomizer zeigt bereits bei einer Ausgangskonzentration von $9.1{\cdot}10^{12}$ Partikeln/cm^3 die typische polydisperse Größenverteilung mit einem Agglomeratanteil von 92% **(C)**.

eine zusätzliche repulsive Komponente verursachen. Mit der in Tabelle 2 angegebenen Partikelkonzentration der Ausgangssuspension ergibt sich eine mittlere Partikelzahl von 1.5 pro Tropfen. Nach Gleichung 8 entspricht das einem theoretischen Agglomeratanteil von 57%. Die starke Abweichung zwischen dem theoretisch und experimentell bestimmten Wert kommt im Wesentlichen durch die ungenaue Abschätzung der Primärpartikelgröße aus der BET Oberfläche zustande. Bei Verwendung der gemessenen Primärpartikelgröße von 29 nm ergibt sich dagegen eine mittlere Partikelzahl von 0.66 pro Tropfen und somit ein Agglomeratanteil von 30%. Dieser zumindest mit der in Ammoniumacetatlösung verdünnten Suspension gut mit dem Experiment übereinstimmende Wert lässt eine weitgehend stabilisierte Suspension aus monodispersen verteilten Monomeren vermuten. Unklar ist dagegen die größere Abweichung gegenüber der in Salpatersäurelö-

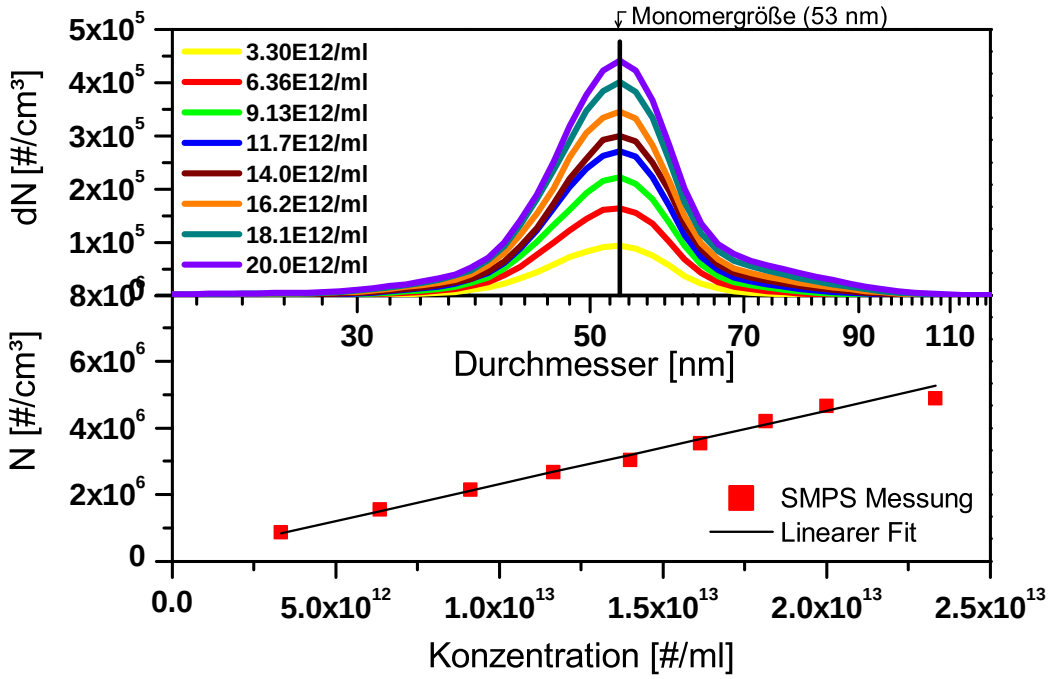


Abbildung 27: Die Abhängigkeit der Partikelkonzentration im Aerosol von der Ausgangssuspension am Beispiel von 53 nm großen SiO_2 Partikeln. Bis zu einer Ausgangskonzentration von $2{\cdot}10^{13}$ Partikeln/cm^3 zeigt sich eine lineare Abhängigkeit der Gesamtpartikelkonzentration. Zusätzlich weist die Größenverteilung mit zunehmender Ausgangskonzentration die Ausbildung einer Schulter der Primärpartikelmode zwischen 60 nm und 80 nm auf welche auf die Bildung von Agglomeraten mit Anteilen bis zu 7% zurückzuführen ist.

sung verdünnten Suspension. Die wahrscheinliche Hauptfehlerquelle ist dabei die Abschätzung der Tröpfchengröße, welche für den beobachteten Agglomeratanteil einen Durchmesser von 200 nm anstatt 250 nm erwarten lässt. Im Gegensatz zum Elektrospray erzeugt der Atomizer trotz der Stabilität der Ludoxsuspension aufgrund der größeren Tröpfchen neben den Primärpartikeln einen Agglomeratanteil von $(85 \pm 5)\%$. Als Folge der wesentlich größeren Agglomerate und des hohen Agglomeratanteils wird der Residualvolumenanteil trotz der starken Residualmode mit 0.5% vernachlässigbar klein.

Anders als das Ludox AS40 von Grace weisen die SiO_2 70 Partikel von Postnova einen klaren Residualpeak mit einer konzentrationsabhängigen Mode zwischen 5 nm und 8 nm auf (Abbildung 26). Dessen Größe ist proportional zur Konzentration der Suspension und liegt bei einem Anteil von $(12 \pm 2)\%$ der Gesamtpartikelzahl, macht aber nur einen geringen Anteil von $(0.036 \pm 0.007)\%$ des Gesamtvolumens aus. Die Gesamtpartikelkonzentration ist dabei linear proportional zur Ausgangskonzentration der Suspension (Abbildung 27). Die Größenverteilungen zeigen deutlich die Primärpartikelmode bei (53 ± 1) nm. Auffällig ist die deut-

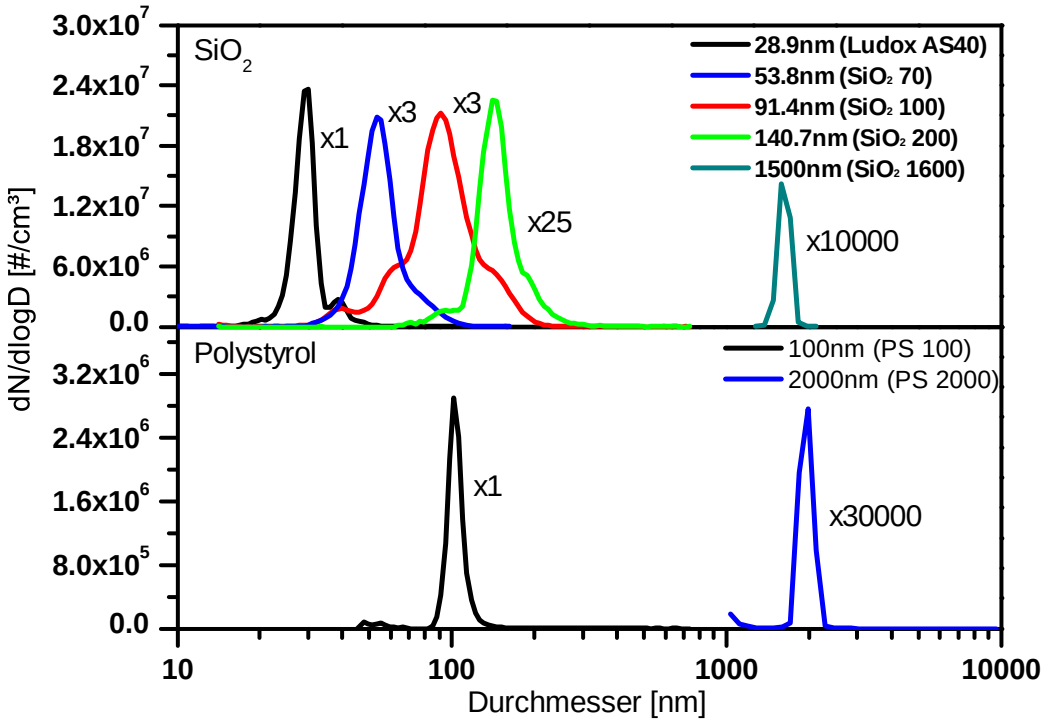


Abbildung 28: Anzahlgrößenverteilungen der aus den in Tabelle 2 dargestellten kommerziellen SiO_2- und Polystyrolsuspensionen erzeugten Aerosole und die sich daraus ergebenden modalen Partikelgrößen. Es zeigen sich deutliche Abweichungen der Primärpartikelmoden gegenüber den Herstellerangaben zur Partikelgröße. Die maximal erreichbaren Partikelkonzentrationen der SiO_2 Partikel nehmen mit zunehmender Partikelgröße ab. Insbesondere für die SiO_2 1600 Suspension lassen sich mit dem Atomizer bei einem kleinen Agglomeratanteil nur relativ geringe Partikelkonzentrationen erreichen. Die Polystyrolverteilungen entsprechen nicht der maximal möglichen Konzentration.

liche Abweichung gegenüber der Herstellerangangabe von 70 nm welche bereits von Al-Rawi et al. [2011] mit einem modalen Wert von 53 nm in DLS Messungen beobachtet wurde. Die mittlere Partikelanzahl pro Tropfen liegt für den verwendeten Konzentrationsbereich zwischen 0.01 und 0.16. Gleichung 8 ergibt dafür Agglomeratanteile zwischen 1.8% und 7.9%. Diese äußern sich in einer Schulter des Primärpartikelpeaks zwischen 60 nm und 100 nm sowie der Zunahme der geometrischen Standardabweichung von 1.14 auf 1.22. Die Fits für die Ausgangskonzentration von $2{\cdot}10^{13}$ Partikeln/cm^3 ergeben einen leicht geringeren Agglomeratanteil von 7% $\pm$ 0.4%. Für Ausgangskonzentrationen oberhalb von $2{\cdot}10^{13}$ Partikeln/cm^3 nimmt die Primärpartikelkonzentration nur noch unwesentlich zu. Stattdessen führen höhere Konzentrationen zu Instabilitäten des Cone-Jet Modus und damit zu einem deutlich höheren Agglomeratanteil von bis zu 80% bei einer Ausgangskonzentration von $7{\cdot}10^{13}$ Partikeln/cm^3 (Abbildung 26). Die bimodale Größenverteilung lässt dabei auf die Entstehung unterschiedlicher Tröpfchengrößen während der Instabilität des Taylorkegels schließen. Einen ähnlich großen

Agglomeratanteil von (92.4 ± 0.2)% weißt der Atomizer bereits bei einer Ausgangskonzentration von $9.1 \cdot 10^{12}$ Partikeln/cm^3 auf und liegt damit oberhalb des in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen optimalen Agglomeratanteils von 64% - 71% für eine maximale Primärpartikelkonzentration. Diese liegt für die in Abbilung 26 gezeigte Verteilung bei $1.3 \cdot 10^5$ Partikeln/cm^3 mit einer Gesamtpartikelkonzentration von $1.45 \cdot 10^6$ Partikeln/cm^3. Im Gegensatz zu der bimodalen Verteilung des Elektrosprays ergibt der Atomizer eine breite Größenverteilung mit einem Maximum bei (190 ± 10) nm und einer geometrischen Standardabweichung von 1.8 ± 0.1. Während der Primärpartikelpeak bei 53 nm noch deutlich erkennbar ist, kann keine Residualmode beobachtet werden. Im Wesentlichen enthalten die Tröfpchen daher mindestens ein Partikel auf denen die Residuen verbleiben. Abgesehen von den in der Ausgangssuspension enthaltenen Verunreinigungen kann deren Anteil maximal der in Abbildung 24 dargestellten Residualmenge entsprechen. Der maximale Residualvolumenanteil liegt damit bei 0.05%.

Die Größenverteilungen weiterer Aerosole aus den kommerziellen SiO_2- und Polystyrolpartikelsuspensionen (Tabelle 2) die zur Charakterisierung der Expositionsanlage verwendet wurden, werden in Abbildung 28 dargestellt. Wie für die SiO_2 70 Suspension ergeben sich deutliche Abweichungen der SiO_2 Primärpartikelmoden gegenüber den Herstellerangaben zur Partikelgröße. Die maximal möglichen Partikelkonzentrationen für einen stabilen Betrieb des Elektrosprays im Cone Jet Modus nehmen mit zunehmender Partikelgröße ab. Für Partikel mit Durchmessern in der Größenordnung der Tröpfchen des Elektrosprays war kein stabiler Betrieb mehr möglich. Die SiO_2 1600 Suspension wurde daher mit dem Atomizer erzeugt. Das Generieren eines monodispersen Aerosols aus Primärpartikeln dieser Größenordnung war in diesem Fall nur in relativ geringen Anzahlkonzentrationen möglich.

5.1.2 Resuspendierte Metalloxide aus der Gasphasensynthese

Mit den in Abschnitt 5.1.1 durchgeführten Versuchen konnte für das Elektrospray eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den theoretisch und experimentell bestimmten Agglomeratanteilen mit stabilisierten kommerziellen Partikelsuspensionen bestätigt werden. Im Gegensatz zu diesen Suspensionen liegen die in der Gasphase synthetisierten Nanopartikel nach ihrer Abscheidung als weitgehend agglomeriertes Pulver vor. Da die Gültigkeit von Gleichung 8 auf vollständig deagglomerierte Partikelsuspensionen aus monodispersen Primärpartikeln beschränkt ist, ist ein höherer Agglomeratanteil für nicht vollständig deagglomerierte Partikelsuspensionen zu erwarten. Die Abweichungen der in Tabelle 3 genannten Nanopartikelpulver nach den in Abschnitt 4.1 beschriebenen Deagglomerationsschritten gegenüber den für vollständig deagglomerierte Suspensionen zu erwartenden Agglomeratanteilen werden im Folgenden dargestellt.

TiO_2 20 Partikel

Der Fit einer logarithmischen Normalverteilung an die in Abbildung 29 A gezeigten, aus rasterlektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmten, Primärpartikelgrößenverteilung liefert eine Monomergröße von (21.4 ± 0.1) nm mit einer geometrischen Standardabweichung von 1.35 ± 0.01 (σ = 0.299 ± 0.006). Mit Gleichung 22 und der Konzentration von 1 mg/ml ergibt sich somit eine mittlere Primärpartikelzahl von 0.25 pro Tropfen. Der Agglomeratanteil der mit dem Elektrospray versprühten Partikel sollte demnach für eine vollständig deagglomerierte Suspension 12% betragen. Die Größenverteilung lässt jedoch keine Primärpartikelmode erkennen (Abbildung 29 C). Stattdessen zeigt sich eine Polydisperse Größenverteilung mit einer Mode bei 60 nm und geometrischen Standardabweichung von 1.7. Eine noch größere Abweichung der Partikelgröße ergibt sich aus den DLS Messungen mit einer Mode des hydrodynamischen Durchmessers bei (120 ± 10) nm (Abbildung 29 B). Kleinere Partikel der Größenverteilung werden mit dieser Methode aufgrund der größenabhängigen Streuintensität stark unterschätzt. Daher konnte erst nach dem Entfernen größerer Partikel durch Zentrifugieren der Suspension der Anteil kleinerer Partikel beobachtet werden. Diese weisen ebenfalls eine Mode bei (62 ± 6) nm auf. Insofern große, adsorbierende Moleküle die Mobilität der flüssig suspendierten Partikel nicht entscheidend ändern, ist ein direkter Vergleich des mobilitätsäquivalenten- und hydrodynamischen Durchmessers möglich. Dennoch kann wegen der unbekannten Anteile der in der Zentrifuge abgeschiedenen Partikel keine Aussage über die genaue Größenverteilung der in der Ausgangssuspension vorliegenden Partikel gemacht werden. Die Größenverteilungen lassen allerdings in jedem Fall auf einen hohen Agglomeratanteil als Grund für die fehlende Primärpartikelmode im Aerosol schliessen. Zu dem gleichen Ergebnis kommen verschiedene Gruppen mit P25 TiO_2 Partikeln

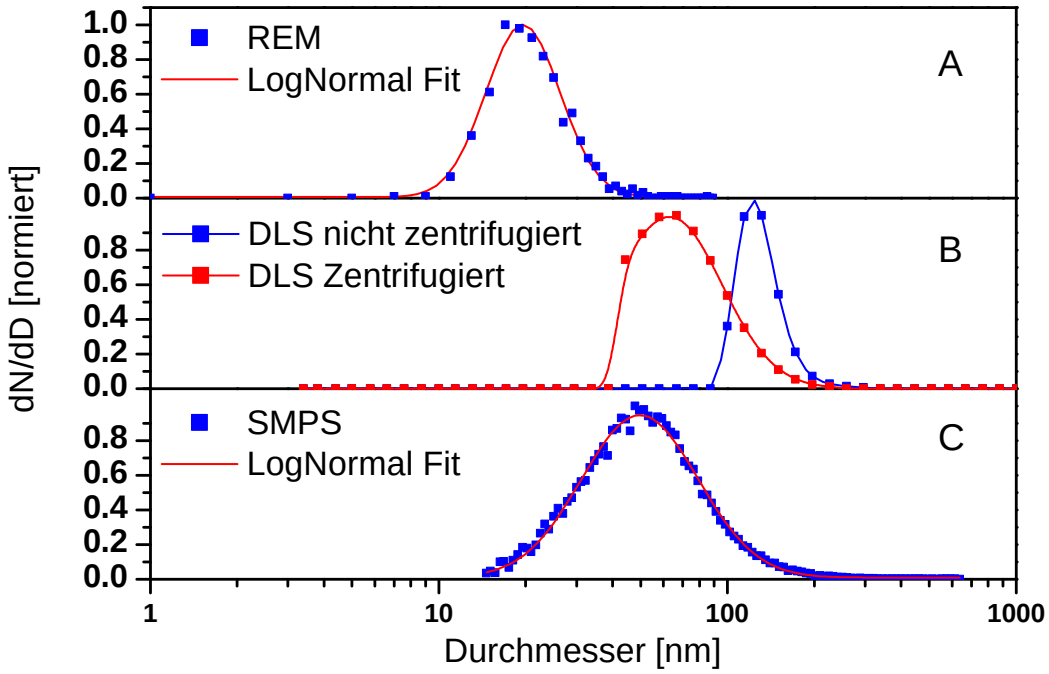


Abbildung 29: **A** Die von O. Nalcaci am Engler Bunte Institut mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmte Primärpartikelgrößenverteilung der TiO_2 20 Partikel. Aus dem Fit mit einer Lognormalverteilten Funktion ergibt sich ein modaler Wert von 21.4 nm bei einer geometrischen Standardabweichung von 1.35. Trotz der Ultraschallbehandlung weisen die flüssig suspendierten Partikel deutlich größere Durchmesser und somit große Agglomeratanteile auf (**B**). Entsprechend groß sind die Agglomeratanteile in dem mit dem Elektrospray erzeugten Aerosol, dessen Größenverteilung keine Primärpartikelmode erkennen lässt (**C**).

aus 21 nm Monomeren von Degussa. Insbesondere Kim et al. [2010] erreichten mit einem Elektrospray eine modale Größe von 60 nm. Ebenso geben Sato et al. [2008] für die gleichen Partikel in flüssiger Suspension Werte zwischen 48 nm und 69 nm mit einem Röntgenpartikelanalysator nach Ultraschallbehandlungen unter verschiedenen Leistungen und Dauern an. Offen ist ob die Ursache des hohen Agglomeratanteils eine unvollständige Deagglomeration oder schnelle Reagglomeration der Primärpartikel ist. Aufgrund der begrenzten Gültigkeit der klassischen DLVO Theorie für kleine Partikelabstände lassen sich zur Agglomerationsrate keine konkreten Aussagen treffen. Eine grobe Abschätzung mit Gleichung 1, 5 und 6 sowie den von [Leonga and Ongb, 2003] angegebenen Zetapotentialen zwischen 40 mV und 50 mV für Degussa P25 TiO_2 Partikel liefern einen Stabilitätsfaktor von 10^4 bis 10^7 bei einer Hamakerkonstante von 60 zJ in Wasser [Ackler, 1996]. Das entspricht nach Gleichung 4 einer Koagulationskonstante zwischen $5{\cdot}10^{-22}$ m^3/s und $5{\cdot}10^{-25}$ m^3/s, bzw. für die verwendete Primärpartikelkonzentration von $3{\cdot}10^{13}$ Partikeln/cm^3 einer Agglomerationszeit (Halbwertszeit) von 60 s bis 15 h. Eine Reagglomeration kann daher nicht als Ursache der in der Suspension vorhandenen Agglomerate ausgeschlossen werden. Allerdings weisen die Größen-

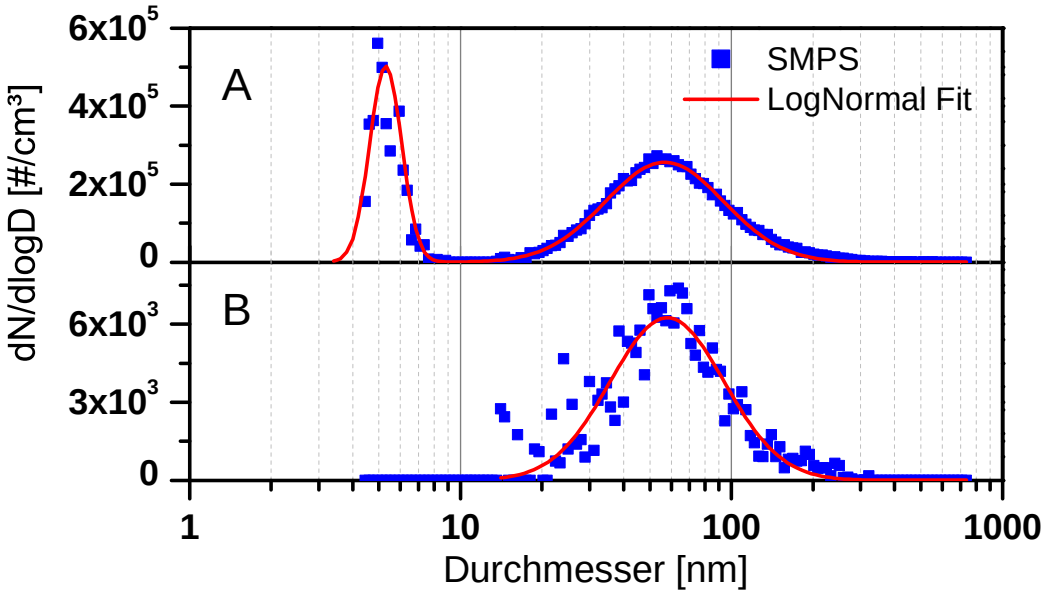


Abbildung 30: Anzahlgrößenverteilungen der mit dem Elektrospray erzeugten Aerosole aus TiO_2 20 Partikelsuspensionen bei einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml (**A**) und 0.03 mg/ml (**B**) in 5 mM Salpetersäurelösung. Die nahezu identischen Lage und Form der Größenverteilung lässt auf einen durch die Suspension vorgegebenen Agglomeratanteil schliessen. Die Lage und Größe des Residualpeaks ist vergleichbar mit der der Stammlösung und ergibt einen Residualvolumenanteil von 0.013%.

verteilungen bei einer Konzentration von 0.03 mg/ml bzw. $9{\cdot}10^{11}$ Partikeln/cm^3 die gleiche Mode und geometrische Standardabweichung von 60 nm und 1.7 auf (Abbildung 30). Lediglich die Gesamtkonzentration nimmt von $(1.45 \pm 0.05){\cdot}10^5$ Partikel/cm^3 auf $(3.3 \pm 0.3){\cdot}10^3$ Partikel/cm^3 ab. Das Konzentrationsverhältnis von 0.023 ± 0.003 entspricht damit nahezu dem der Ausgangskonzentrationen von 0.03. Die Differenz ergibt sich durch den leicht erhöhten Agglomeratanteil aufgrund der größeren mittleren Partikelzahl bzw. Agglomeratzahl pro Tropfen für die höher konzentrierte Suspension. Eine Reagglomeration nach der Ultraschallbehandlung kann somit als Ursache des hohen Agglomeratanteils ausgeschlossen werden. Stattdessen ist von einer unvollständigen Deagglomeration während der Ultraschallbehandlung auszugehen.

Abbildung 30 zeigt außerdem einen deutlichen Residualpeak für die 1 mg/ml Suspension mit einer Mode bei 5 nm. Die ähnliche Lage des Residualpeaks gegenüber dem der reinen Stammsuspension lässt auf unwesentliche Verunreinigungen durch das Partikelpulver schliessen. Aus dem Fit ergibt sich ein Residualvolumenanteil von $0.013\% \pm 0.003\%$.

Fe_2O_3 Partikel aus der Mikrowellenplasmasynthese

Ein ähnliches Verhalten wie das TiO_2 weisen die Fe_2O_3 10 Partikel aus der Mikrowellenplasmasynthese nach der Ultraschallbehandlung auf. Der Fit der an einem Rasterelektronenmikroskop bestimmten Primärpartikelverteilung ergibt eine Monomergröße von (13.1 ± 0.2) nm und geometrische Standardabweichung von 1.32 ± 0.01 (σ = 0.28 ± 0.01), woraus eine Primärpartikelkonzentration von $1.2{\cdot}10^{14}$ Monomeren/cm^3 bzw. 0.95 pro Tropfen resultiert (Abbildung 31 A). Die Anzahlgrößenverteilung des mit dem Elektrospray versprühten Aerosols

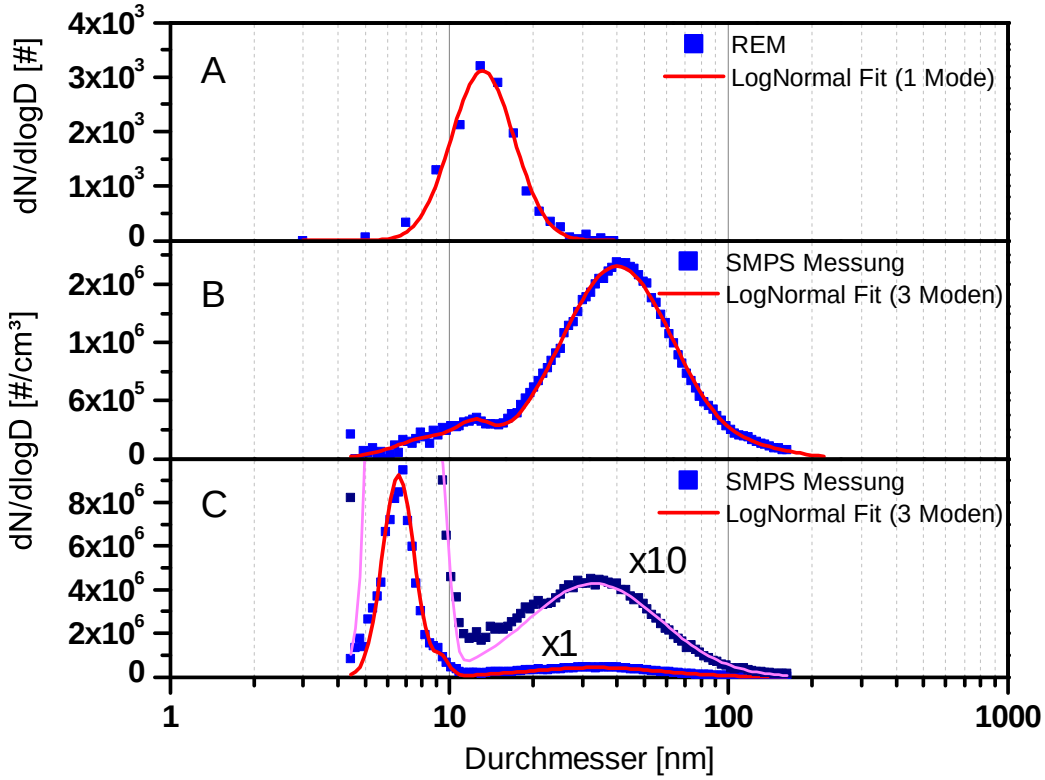


Abbildung 31: **A** Die von O. Nalcaci am Engler Bunte Institut mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmte Primärpartikelgrößenverteilung der Fe_2O_3 10 Partikel. Aus dem Fit mit einer Lognormalverteilten Funktion ergibt sich ein modaler Wert von 13.1 nm bei einer geometrischen Standardabweichung von 1.32. **B** Die Anzahlgrößenverteilung des mit dem Elektrospray erzeugten Aerosols nach der Ultraschallbehandlung. Gegenüber der Primärpartikelverteilung zeigt sich eine deutlich größere Mode bei 43 nm und lässt auf eine unvollständige Deagglomeration schliessen. **C** Anzahlgrößenverteilung des mit dem Elektrospray erzeugten Aerosols nach der 5 minütigen Säurebehandlung in 65%iger Salpetersäure. Anstatt eines höheren Primärpartikelanteils ergibt sich ein deutlich gestiegener Residualpartikelanteil durch gelöste Bestandteile der Eisenoxidpartikel.

weist dagegen eine Mode bei (43 ± 4) nm auf (Abbildung 31 B). Da keine Primärpartikelmode zu erkennen ist liegt der Agglomeratanteil mit nahezu 100% deutlich über dem theoretischen Anteil von 40% und lässt ebenfalls auf eine unvollständige Deagglomeration der Partikel schliessen. Im Gegensatz zu den TiO_2

20 Partikeln zeigt sich allerdings eine bimodale Größenverteilung nach der Behandlung in konzentrierter Salpetersäure. Die stärkere Mode bei (6.8 ± 0.5) nm ist zu klein um von Primärpartikeln verursacht zu werden und weißt auf die Bildung eines Residualpeaks aus z.B. Eisennitrat durch die von der Salpetersäure gelösten Partikelbestandteile hin. Die schwächere der beiden Moden liegt dagegen mit (32 ± 2) nm nur leicht unterhalb der ursprünglichen Mode einer nicht in Säure behandelten Suspension. Ein vollständiges Aufbrechen der Agglomeratbindungen konnte aber auch durch die Säurebehandlung nicht erreicht werden. Stattdessen ist von einer Veränderung der ursprünglichen Partikeleigenschaften und einem wesentlich größeren Residualpartikelanteil auszugehen.

SiO_2 Partikel

Die mit dem Elektrospray versprühten SiO_2 40 Partikel weißen eine Größenverteilung mit einer Mode bei (58 ± 3) nm und geometrischen Standardabweichung von 1.6 auf. Damit liegt ein weiter Bereich der Größenverteilung unterhalb der modalen Primärpartikelgröße von 40 nm. Aus TEM Aufnahmen deponierter Partikel lassen sich jedoch keine Primärpartikel nachweisen. Vielmehr entsteht der

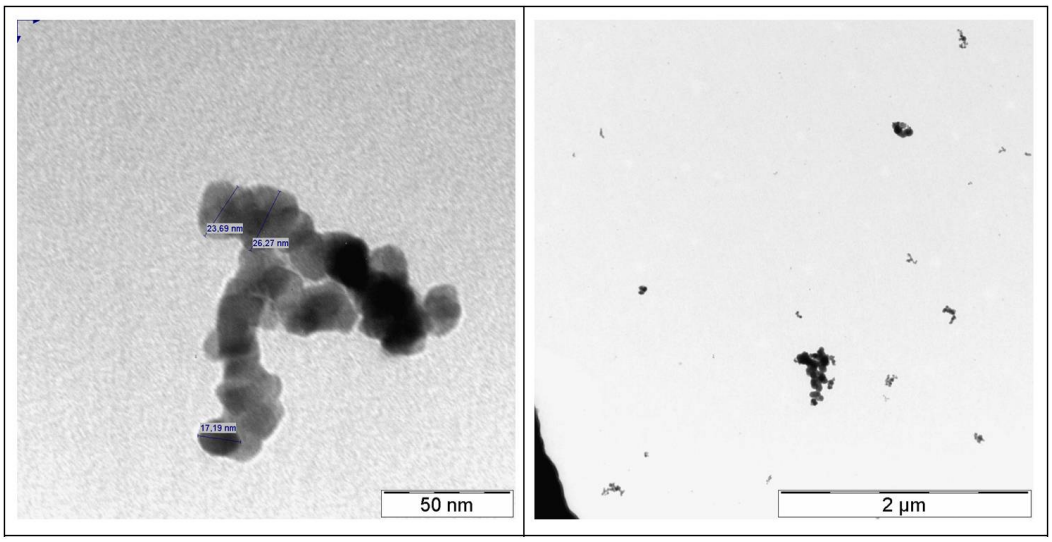


Abbildung 32: TEM Aufnahmen deponierter SiO_2 40 Nanopartikel aus der in Abbilung 33 gezeigten Anzahlgrößenverteilung. Der Anteil an Partikeln unterhalb von 40 nm entsteht durch Agglomerate aus kleineren Primärpartikeln ähnlich dem links dargestellten Partikel. Einzelne Primärpartikel dieser Größenordnung sind dagegen selbst bei geringeren Vergrößerungen, wie in der rechts dargestellten Aufnahme, nicht zu erkennen.

Großteil an Partikeln dieser Größenordnung durch Agglomerate oder Aggregate kleiner Primärpartikel der verhältnismäßig breiten Primärpartikelverteilung. Aus der am Engler Bunte Institut gemessenen Primärpartikelverteilung (Abbildung 33A) ergibt sich eine geometrische Standardabweichung von 1.43 ± 0.01

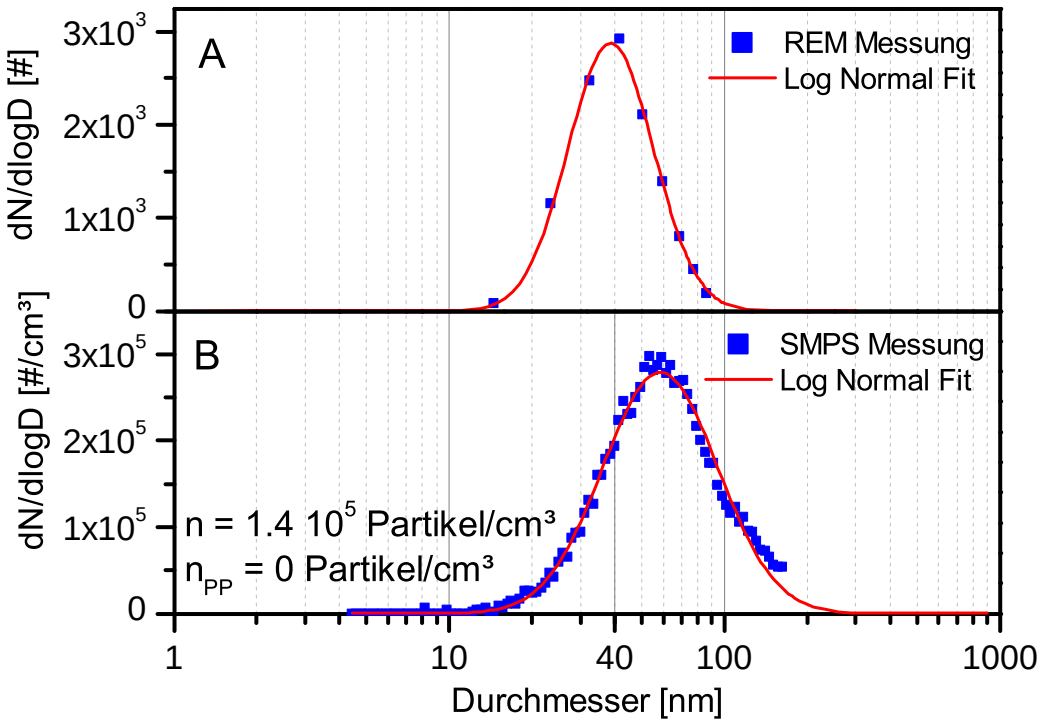


Abbildung 33: Anzahlgrößenverteilung des mit dem Elektrospray aus der SiO_2 40 Suspension erzeugten Aerosols (**B**). Die Größenverteilung überschneidet sich über einen weiten Bereich mit der von O. Nalcaci am Engler Bunte Institut bestimmten Monomerverteilung (**B**). Trotzdem lassen sich in den TEM Aufnahmen elektrostatisch deponierter Partikel keine Monomere nachweisen. Der sich mit der Monomermode überschneidende Bereich kann daher ausschliesslich von Agglomeraten kleinerer Primärpartikel stammen.

und ein modaler Durchmesser von (38.6 ± 0.4) nm.

Eine noch breitere Primärpartikelgrößenverteilung als die SiO_2 40 Partikel weist das Aerosil200 von Evonik auf. Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Partikeln handelt es sich bei diesem Material nicht um eine lognormalverteilte, sondern bimodale Größenverteilung der Monomere (Abbildung 34). Aufgrund der Agglomerat- und Aggregatgröße der Aerosil200 Partikel konnte das Elektrospray nicht stabil im Cone-Jet Modus betrieben werden. Wegen des schnellen Verstopfens der Kapillaren des Elektrosprays mit großen Agglomeraten wurde ein Aerosol dieser Partikel nur mit dem Atomizer erzeugt. Dabei ergibt sich mit der gleichen Ausgangskonzentration eine polydisperse Größenverteilung mit einer Mode bei (241 ± 7) nm und einer geometrischen Standardabweichung von 1.8. Obwohl der hohe Anteil kleiner Monomere in der in Abbildung 34A gezeigten Primärpartikelverteilung scheinbar unterschätzt wurde, kann auch hier ein Überlapp der Primärpartikel- und Anzahlgrößenverteilung der Aerosolpartikel beobachtet werden. Dennoch kann auch für das Aerosil kein signifikanter Anteil an Monome-

ren in den TEM Aufnahmen beobachtet werden (Abbildung 47). Der Agglomeratanteil liegt damit ebenfalls bei 100%, wenngleich die Agglomerate wesentlich größere mobilitätsäquivalente Durchmesser gegenüber den mit dem Elektrospray erzeugten Aerosolen aufweisen.

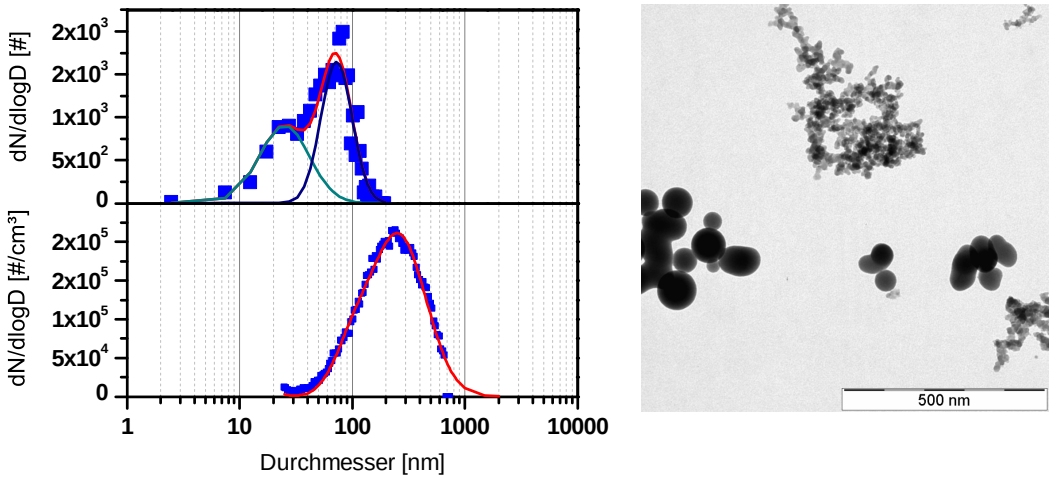


Abbildung 34: Die von O. Nalcaci charakterisierten Aerosil200 Partikel von Evonik ergeben eine bimodale Primärpartikelverteilung (**links oben**). Die **rechts** dargestellte TEM Aufnahme submers deponierter Partikel zeigt deutlich die unterschiedlichen Monomergrößen. Die sehr hohe Anzahl kleiner Monomere in verhältnismäßig großen Agglomeraten lässt einen unterschätzten Anteil an kleinen Monomeren vermuten. Wie TEM Aufnahmen belegen, stammt der dennoch vorhandene Überlapp zwischen Anzahlgrößenverteilung des mit dem Atomizer erzeugten Aerosols (**links unten**) und der Primärpartikelverteilung wie im Fall der SiO_2 40 Partikel nicht von Monomeren (Abbildung 47).

5.1.3 Flüssigabgeschiedene SiO_2 Partikel aus der Mikrowellenplasmasynthese

Weil eine Deagglomeration der gasphasensynthetisierten Partikel bis zur Primärpartikelgröße nicht möglich war, wurden Partikel anstatt auf Filtern in einer stabilisierenden Lösung gesammelt. Wegen des geringen Residualpartikelanteils der 5 mM Salpetersäure und der in Abschnitt 5.1.1 gezeigten Stabilität von darin suspendierten SiO_2 Partikeln, diente sie als Ausgangslösung für den Sammelprozess. Nach dem jeweiligen Sammelvorgang ergab sich eine milchig trübe Suspension aus der sich innerhalb weniger Minuten größere Partikel abgeschieden haben. Mit dem Elektrospray wurde aus dem verbleibenden Überstand die in Abbildung 35 dargestellte Anzahlgrößenverteilung mit einer Mode bei (28 ± 2) nm, einer geometrischen Standardabweichung von 1.6 ± 0.01 und Anzahlkonzentrationen von (2.2 - 3.9)·10^5 Partikeln/cm^3 erzeugt. Da die Referenzversuche ohne

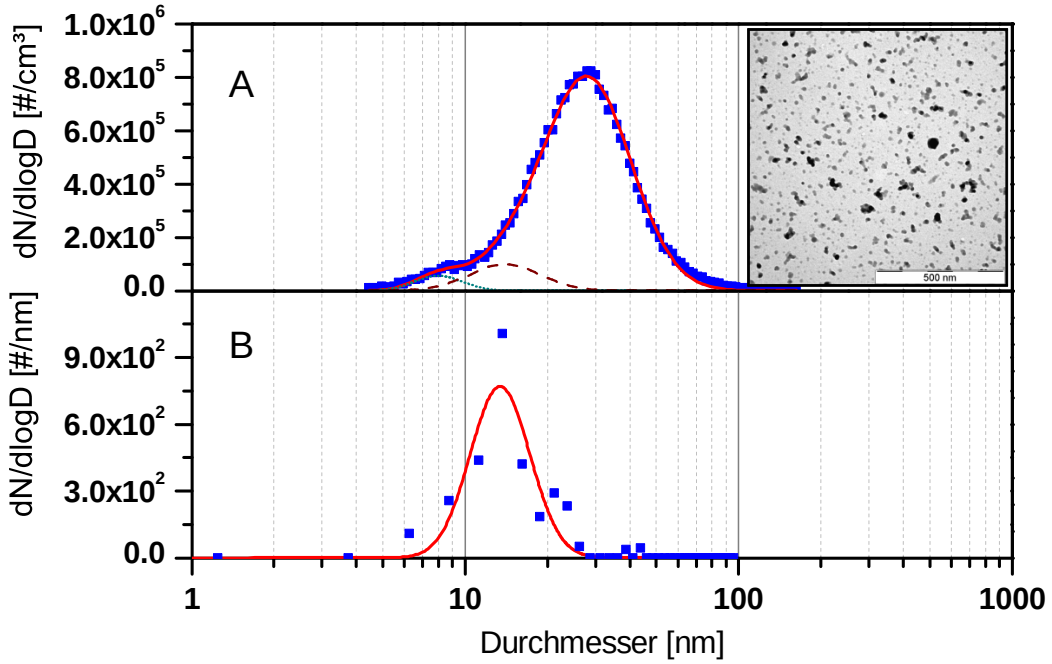


Abbildung 35: (**A**) Die mit dem SMPS gemessene Anzahlgrößenverteilung der resuspendierten SiO_2 MWP Partikel. Gegenüber der mit TEM Messungen bestimmten Primärpartikelmode (**B**) enthält das Aerosol mit einer Mode bei 28 nm deutlich größere Partikel. Obwohl die TEM Aufnahmen einen klaren Monomeranteil belegen, ist die Monomermode mit dem SMPS nicht auflösbar. Eine Abschätzung über einen Fit der Größenverteilung mit den Eigenschaften der Monomerverteilung (gestrichelt), einer Residualmode (gepunktet) und einer Agglomeratmode ergibt einen Agglomeratanteil von mindestens 88%.

Zugabe des SiO_2 Precursors (Silan) unter ansonsten gleichen Bedingungen mit (1.4 ± 0.7)·10^5 Partikel/cm^3 keinen wesentlich erhöhten Residualpartikelanteil gegenüber der Ausgangssuspension aufgewiesen haben, können Verunreinigungen als Ursache dieser Mode ausgeschlossen werden. Bestätigt wird diese Annahme

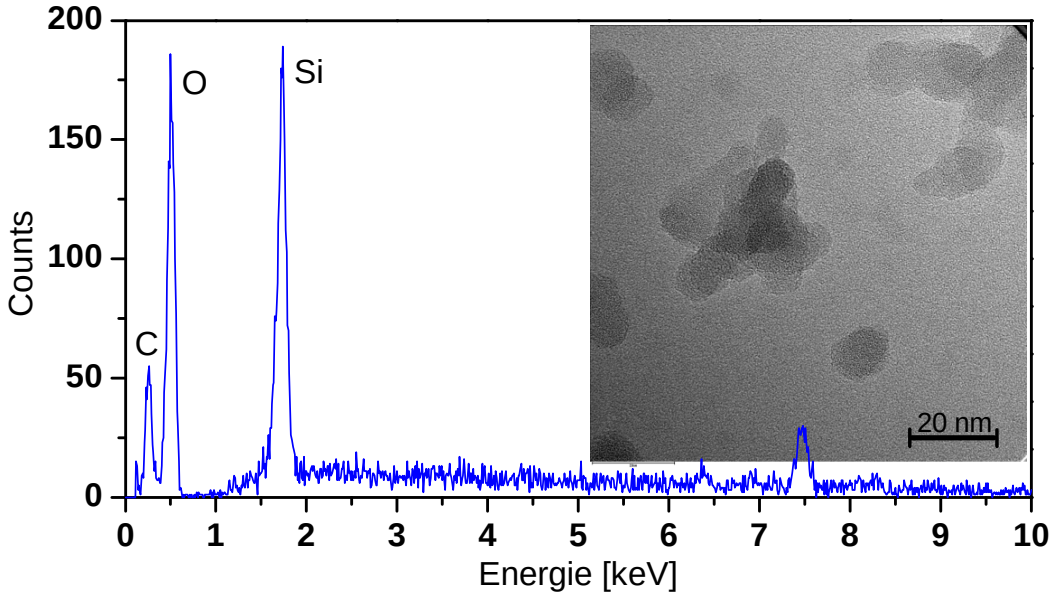


Abbildung 36: EDX Spektrum eines aus dem Aerosol heraus gesammelten Partikels bzw. Agglomerats. Die deutlich erkennbare Si K_α Linie bei 1.7 keV legt eine Zusammensetzung der Partikel aus SiO_2 nahe. Ebenfalls erkennbar ist eine starke Linie des Kohlenstoffs, welcher eine typische Kontamination durch organische Moleküle und die Beschichtung der TEM Netze darstellt. Die TEM Aufnahme zeigt das Agglomerat an dem die Messung durchgeführt wurde, sowie ein einzelnes, nicht agglomeriertes Primärpartikel. Die Messungen wurden am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des KIT von R. Schneider durchgeführt.

durch das in Abbildung 36 dargestellte EDX Spektrum deponierter Partikel. Der deutlich sichtbare Siliziumanteil ist ein weiteres Indiz für die Anwesenheit von SiO_2 Partikeln. Obwohl eine genaue quantitative Auswertung der elementaren Anteile nur schwer möglich ist, sind andere, aus dem Silanprecursor hervorgegangene, Siliziumverbindungen sehr unwahrscheinlich. Aus den TEM Aufnahmen ist weiterhin ein großer Agglomeratanteil zu erkennen. Da aus Gleichung 33 im Gleichgewicht für die Flüssigkeitsverluste von 115 ml/h mit Partikelkonzentrationen im Mikrowellenplasma von 10^9 bis 10^{11} Partikeln/cm^3 eine maximale Konzentration abgeschiedener Partikel von 10^{12} bis 10^{14} Partikel/ml folgt, ist eine Agglomeration der Partikel in der Suspension sehr unwahrscheinlich. Selbst bei 100 % Abscheideeffizienz liegt die Partikelkonzentration unterhalb der Ludox AS 40 Suspension. Tatsächlich ist von noch geringeren Abscheideeffizienzen auszugehen, so dass die Agglomerate höchstwahrscheinlich bereits während der Synthese oder auf dem Weg zum Abscheider entstehen. Auch nach dem Sammelvorgang kann innerhalb mehrerer Tage keine Veränderung der mit dem Elektrospray erzeugten Größenverteilung durch Agglomeration der suspendierten Partikel beobachtet werden (Abbildung 37). Im Gegensatz zu den Nanopulvern belegen die TEM Aufnahmen aber auch einen geringen Monomeranteil. Aus dem Fit der Primärpartikelverteilung in Abbildung 35 ergibt sich die Monomermode bei (13.5

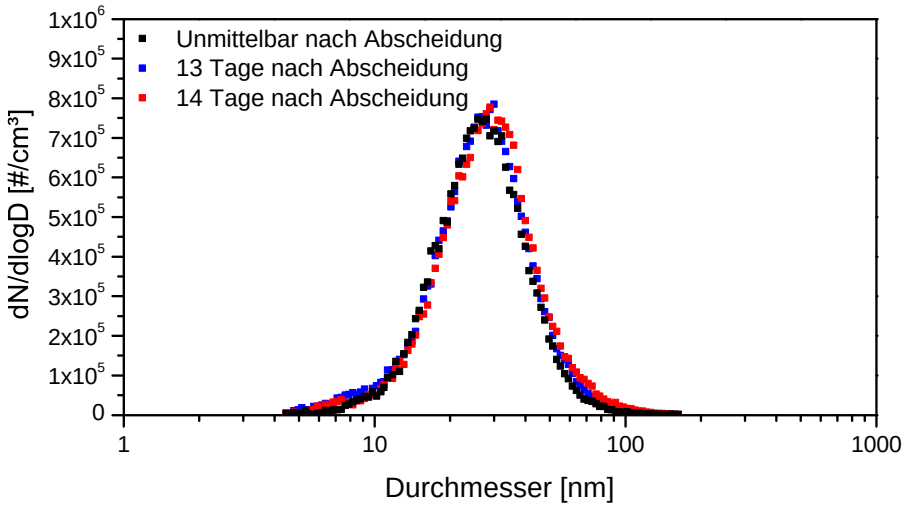


Abbildung 37: Die mit dem Elektrospray erzeugten Anzahlgrößenverteilungen aus einer Suspension an verschiedenen Zeitpunkten nach dem Sammelvorgang. Eine Veränderung durch Koagulation der Partikel in der Suspension, bzw. ein zunehmender Agglomeratanteil ist nicht zu sehen. Es kann daher von einer stabilen Suspension mit einem konstanten Agglomeratanteil über einen Zeitraum mehrerer Wochen ausgegangen werden.

$\pm$ 0.3) nm mit einer geometrischen Standardabweichung von 1.28 $\pm$ 0.03 (σ = 0.25 $\pm$ 0.02). Diese Mode lässt sich jedoch mit dem SMPS aufgrund der Überlagerung mit kleinen Agglomeraten ähnlicher Mobilität und der Residualmode nicht auflösen, so dass zusätzlich eine Abschätzung des Agglomeratanteils aus den TEM Aufnahmen deponierter Partikel erfolgte. Aus 300 Partikeln ergibt er sich mit (80 $\pm$ 10)%. Die Größenabhängigkeit der Depositionseffizienz der elektrostatisch abgeschiedenen Partikel (Abschnitt 5.5) mit maximal 5% verursacht einen Maximalfehler des Agglomeratanteils von 0.01% und kann daher vernachlässigt werden. Dagegen bildet die unmögliche Unterscheidung zwischen Residuen und kleinen Monomerpartikeln eine große Fehlerquelle. Nimmt man alle Partikel mit Durchmessern unter 10 nm als Residuen an, erhält man einen maximalen Agglomeratanteil von (96 $\pm$ 3)%. Trotz des nach wie vor hohen Agglomeratanteils ermöglicht das Sammelverfahren die Resuspendierung gasphasensynthetisierter Partikel mit wesentlich kleineren Agglomeratgrößen gegenüber den trocken abgeschiedenen Nanopulvern. Lediglich die Konzentration des Aerosols durch die vermutlich geringe Partikelkonzentration der Suspension liegt noch deutlich unter den mit einem Elektrospray maximal erreichbaren Konzentrationen für Partikel bzw. Agglomerate dieser Größe (z.B. Ludox AS 40). Aus ersten Versuchen, die Konzentration durch Eindampfen der Suspension in einem Rotationsverdampfer zu erhöhen, konnten keine reproduzierbar erhöhten Konzentrationen erzeugt werden. Eine Verlängerung des Sammelvorgangs erscheint dagegen unbrauchbar zur Erzeugung höher konzentrierter Suspensionen. Auch wenn eine experimentelle Bestätigung zur Rechtfertigung von Gleichung 33 fehlt, kann von einem schnellen

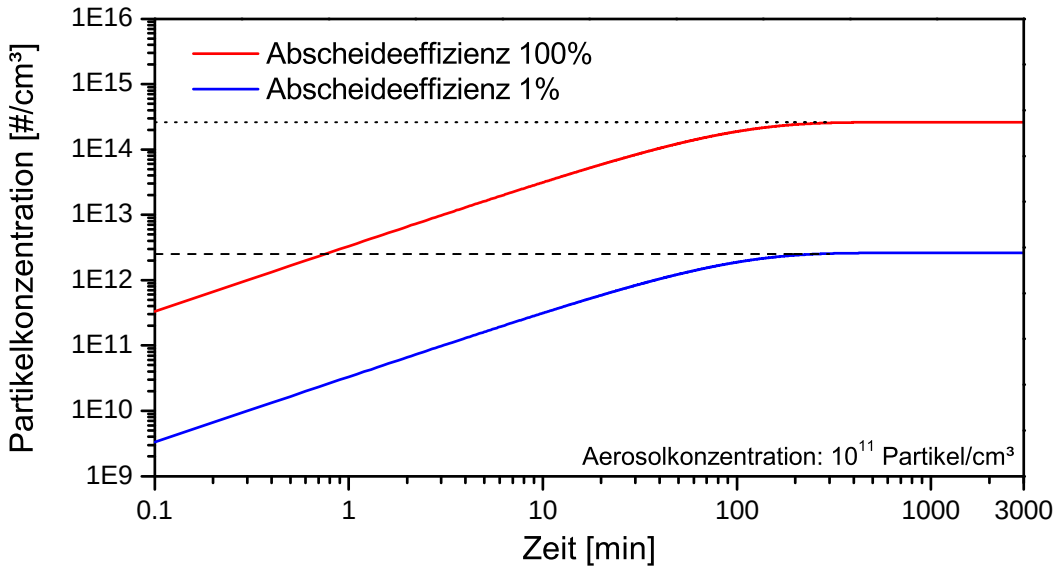


Abbildung 38: Abschätzung des zeitlichen Verlaufs der Partikelkonzentration im Flüssigabscheider nach Gleichung 33 für 2 verschiedene Abscheideeffizienzen. Zur Berechnung wurde V_T sehr groß gegenüber dem verdampften Wasservolumen ohne Partikel angenommen, so dass es dem aus dem Reservoir entnommenen Wasservolumen von 115 ml/h gleichgesetzt werden konnte. Weiterhin wurde eine Partikelkonzentration nach dem Mikrowellenplasma von 10^{11} Partikeln/cm^3 angenommen. Bereits nach ca. 1 h sind 50% der maximal möglichen Partikelkonzentration erreicht. Unabhängig von der Abscheideeffizienz kann davon ausgegangen werden, dass durch eine Verlängerung des Sammelvorgangs keine wesentlich höheren Partikelkonzentrationen erreicht werden können. Die Abscheideeffizienz gibt lediglich die Partikelkonzentration im Gleichgewicht vor.

Gleichgewicht zwischen Partikelabscheidung und Emission aufgrund der hohen Verluste durch emittierte Tröpfchen während der turbulenten Durchmischung der Suspension in dem Sammelbehälter ausgegangen werden (Abbildung 38).

5.1.4 Direkte Erzeugung von SiO_2 Nanopartikeln für Expositionsversuche

Als direkte Aerosolquelle zur Exposition von Nanopartikeln ohne Resuspendierung wurde der in Abschnitt 4.1 beschriebene Generator nach Ostraat et al. [2008] getestet. Im Gegensatz zu den resuspendierten Aerosolen ist die Entstehung einer Residualmode nicht möglich. Lediglich Verunreinigungen des Precursors, der Leitung und des Trägergases können zu Kontaminationen führen. Mit einem Reinheitsgrad von 98% (GC) kann von geringen Kontaminationen durch das TEOS ausgegangen werden. Der Betrieb des Ofens ohne Precursor liefert dagegen einen Hintergrund unterhalb von 10^6 Partikeln/cm^3 und beträgt damit weniger als 10% der Gesamtpartikelzahl. Bei Zugabe des Precursors variieren die Anzahlgrößenverteilungen stark mit den verwendeten Prozessparametern (Abbildung 39). Insbesondere durch die Variation der Precursorkonzentration und des Gesamtflusses kann die Partikelgröße beeinflusst werden. In Übereinstimmung mit Ostraat et al. [2008] zeigt sich mit zunehmender Precursorkonzentration ein ansteigender Partikeldurchmesser. Gleichzeitig ergibt sich für eine konstante TEOS Kon-

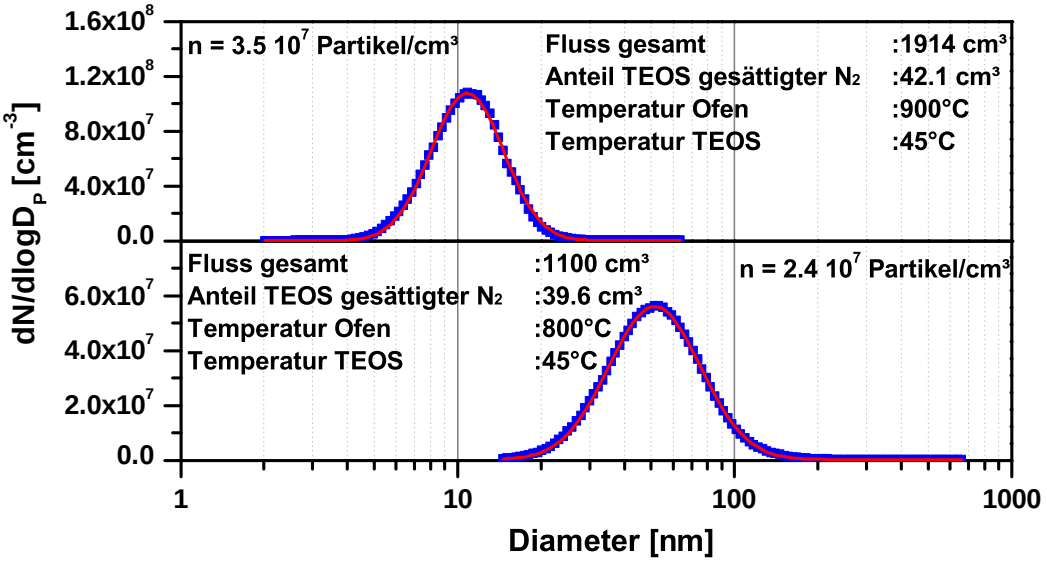


Abbildung 39: Zwei exemplarische Anzahlgrößenverteilungen für den unter verschiedenen Synthesebedingungen betriebenen Generator zur SiO_2 Partikelsynthese. Partikelgröße und Anzahlkonzentration können über die verwendeten Prozessparameter beeinflusst werden. Eine Aussage zum Agglomeratzustand der Partikel aus der Anzahlgrößenverteilung alleine ist allerdings nicht möglich.

zentration eine mit zunehmendem Gesamtfluss linear abnehmende Partikelgröße (Abbildung 40). Der Gesamtfluss beeinflusst allerdings nicht nur den Primärpartikeldurchmesser, sondern ebenso die Agglomeratgröße. Für die hohen Anzahlkonzentrationen in der Größenordnung von 10^8 Partikeln/cm^3 ergibt sich nach Gleichung 2 eine Koagulationskonstante von $3{\cdot}10^{-10}$ cm^3/s. Auch wenn die Verweilzeit des Aerosols bis zum Eingang des DMAs für die verwendeten Flüsse nur

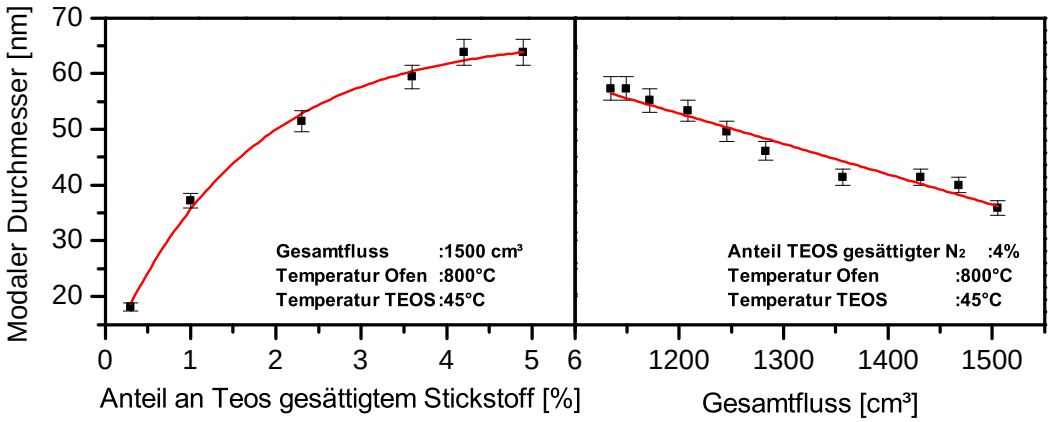


Abbildung 40: Die Abhängigkeit des modalen Partikeldurchmessers der Anzahlgrößenverteilung von der Precursorkonzentration bei konstantem Gesamtfluss (links) und konstanter Precursorkonzentration (rechts). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mehreren Messungen während eines Versuches.

1 bis 2 s beträgt, ist unter Annahme einer reinen Dimerbildung nach Gleichung 2 bereits ein Agglomeratanteil in der Größenordnung von 1% allein durch die Koagulation der Partikel zu erwarten. Für die bei einem Gesamtfluss von 1630 cm^3, einem Anteil an TEOS gesättigtem Stickstoff von 2.6% und bei 900°C synthetisierten Partikel ergeben sich die in Abbildung 42 dargestellte Primärpartikel- und Aerosolanzahlgrößenverteilung, sowie ein aus TEM Aufnahmen gewonnener Agglomeratanteil von (21 ± 4)%. Dieser Wert liegt deutlich über 1% und lässt

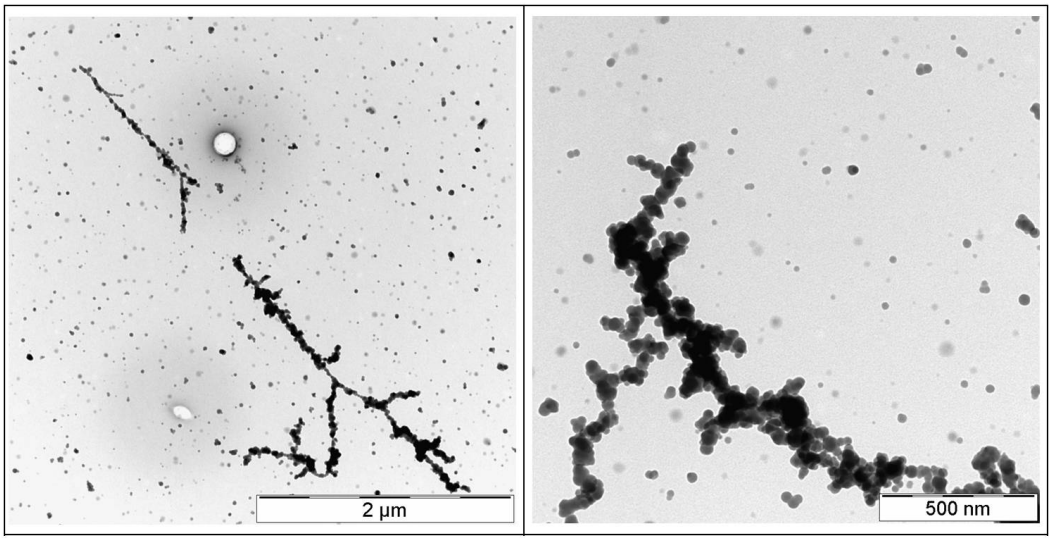


Abbildung 41: TEM Aufnahmen deponierter SiO_2 Partikel aus der im Text beschriebenen Synthese. Die wenigen Agglomerate bilden lediglich 20% der gesamt deponierten Partikelanzahl. Auffällig ist eine geringe Anzahl sehr großer Agglomerate nahezu kettenförmiger Struktur, die sehr wahrscheinlich Sammelartefakten zuzuordnen sind.

wie für die SiO_2 MWP Partikel eine Agglomerat- oder Aggregatbildung bereits

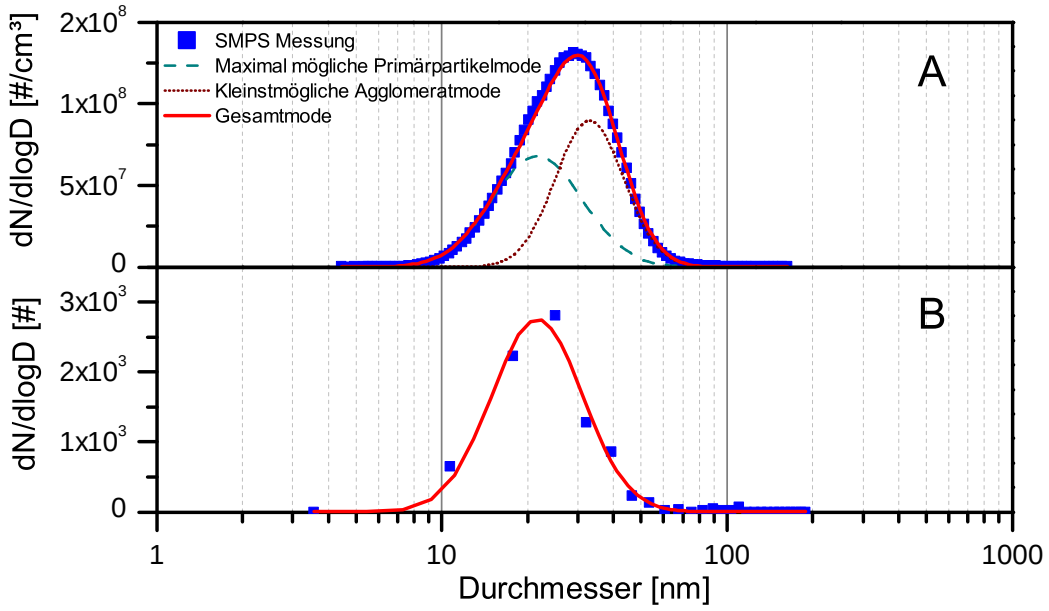


Abbildung 42: (**A**) Anzahlgrößenverteilung des SiO_2 Aerosols direkt nach der Synthese bei einer Ofentemperatur von 900°C, einem Gesamtfluss von 1630 cm^3 und einem TEOS gesättigten Stickstoffanteil von 2.6%. Aus dem Vergleich zu der in (**B**) gezeigten Primärpartikelverteilung ergibt sich ein Agglomeratanteil von mindestens 50%.

während der Synthese vermuten. Vergleicht man die Anzahlgrößenverteilung im Aerosol mit der Primärpartikelverteilung, ist jedoch selbst der den TEM Aufnahmen entnommene Agglomeratanteil unrealistisch klein. Der in Abbildung 42 gezeigte Fit der Primärpartikelmode liefert einen modalen Durchmesser von (22 $\pm$ 2) nm und eine geometrische Standardabweichung von 1.45 $\pm$ 0.01 (σ = 0.37 $\pm$ 0.01). Eine Realisierung der Aerosolanzahlgrößenverteilung mit dieser Primärpartikelgröße ist daher nur mit Agglomeratanteilen von mindestens (60 $\pm$ 10)% möglich. Die genaue Ursache für die Abweichung ist noch nicht geklärt. Eine mögliche und nicht berücksichtigte Fehlerquelle könnte in diesem Fall die Größenabhängige Depositionseffizienz der Partikel sein. Im Gegensatz zu den SiO_2 MWP Partikeln wurde das Aerosol vor der Abscheidung nicht entsprechend einer Fuchsverteilung geladen, so dass die in Abschnitt 5.5 beschriebenen Depositionseffizienzen nicht gültig sind. Derartig große Abweichungen der Depositionseffizienz in diesem Größenbereich als alleinige Ursache für die zu geringe Agglomeratanzahl ist allerdings unwahrscheinlich. Eine andere Ursache könnten Fehler in der bestimmten Primärpartikelverteilung sein, die sich jedoch nur schwer abschätzen lassen. Unabhängig von der genauen Ursache dieser Diskrepanz stellt diese Form der Synthese mit Agglomeratanteilen deutlich unterhalb von 100%, leicht variierbaren Partikelparametern und gegenüber den resuspendierten Aerosolen eine um einen Faktor 10 bis 100 erhöhte Anzahlkonzentration, eine praktische Alternative dar. Allerdings erschweren die verhältnismäßig großen geometrischen

Standardabweichungen zwischen 1.3 und 1.6 die Untersuchung der Wirkung des Partikeldurchmessers auf die biologische Antwort. Desweiteren ist eine Kontamination durch gasförmige Produkte der TEOS-Pyrolyse möglich, die ggf. den Einsatz eines Aktivkohledenuders zur Reinigung erfordert.

5.1.5 Reproduzierbarkeit und Stabilität der Aerosole

Die Reproduzierbarkeit der gezeigten Anzahlgrößenverteilungen ist abhängig von dem verwendeten Verfahren zur Aerosolerzeugung und ggf. der Reproduzierbarkeit der genutzten Ausgangsmaterialien und angesetzten Suspensionen. Für die mit dem Elektrospray erzeugten Aerosole ergaben sich aus unabhängigen Versuchen nur sehr geringe Abweichungen der Form und Lage der Anzahlgrößenverteilungen. Entsprechend geringe Abweichungen ergaben sich in Bezug auf die bestimmten Agglomeratanteile. Die Variationen der geometrischen Standardabweichung der Größenverteilungen lagen dabei im Bereich der Präzision der vom SMPS gelieferten Werte. Geringfügig größere Standardabweichungen ergaben sich für die Lage der Partikelmode. Die mit 7% größte Standardabweichung des modalen Partikeldurchmessers bzw. 3% des mittleren Durchmessers wiesen die SiO_2 MWP Partikel auf, obwohl in deren Fall die Aerosole aus der jeweils gleichen Ausgangssuspension erzeugt wurden. Deutlich geringere Standardabweichungen, von z.B. 2% für die Partikelmode der SiO_2 70 Partikel, ergaben sich mit den in Tabelle 2 genannten kommerziellen Partikelsuspensionen. Im Gegensatz zur Form und Lage der Größenverteilungen zeigten sich größere Variationen in der Anzahlkonzentration. Diese wiesen mitunter Standardabweichungen von bis zu 23% (TiO_2 20 Partikel) auf. Die Ursache der genannten Abweichungen im Fall des Elektrosprays sind, abgesehen von den geringfügigen Unterschieden der Ausgangssuspensionen, sehr wahrscheinlich Ablagerungen von Partikeln an der Kapillarspitze und Düse des Elektrosprays. Diese wirken sich unter anderem auf den Druckabfall über der Kapillare und somit auf die Tröpfchengröße, Anzahl und Stabilität des Taylorkegels (Abschnitt 3.2.1) aus. Im schlimmsten Fall verursachen sie ein Zusammenbrechen des Taylorkegels. Diese Instabilitäten erklären die kurzen Einbrüche der in Abbildung 18 und 20 dargestellten Partikelkonzentrationen während der Expositionsversuche. Aufgrund der nur geringen Dauer dieser Einbrüche sind die Standardabweichungen der insgesamt angebotenen Partikelkonzentrationen aus verschiedenen Expositionsversuchen (Tabelle 5) aber nahezu identisch mit den Konzentrationsunterschieden einzelner unabhängiger Messungen.

Ähnliche Standardabweichungen der Anzahlkonzentrationen in unabhängigen Versuchen ergaben sich für die mit dem Atomizer erzeugten Aerosole. Zusätzlich änderte sich allerdigs die Lage der Anzahlgrößenverteilungen während eines Versuchs kontinuierlich zu größeren Durchmessern. So stieg der mittlere Durchmesser

der SiO_2 70 Partikel während der Expositionsversuche um ca. 3 %/h. Damit einher gingen Veränderungen der im Aerosol enthaltenen Anzahlkonzentrationen, die sich jedoch nicht kontinuierlich in eine Richtung änderten (Abbildung 18 und 19). Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 erwähnt wurde, ist die Ursache für diese zeitlich abhängigen Eigenschaften der Anzahlgrößenverteilungen sehr wahrscheinlich auf Verluste des Lösungsmittels, aber auch Verunreinigungen an der Düse des Atomizers zurückzuführen. Im Gegensatz zum Elektrospray ergibt sich daher ein zeitlich zunehmender Agglomeratanteil und eine steigende Agglomeratgröße. Aufgrund der in dieser Arbeit ohnehin hohen Agglomeratanteile, der mit dem Atomizer für die Partikelexpositionen erzeugten Aerosole, liegen die Standardabweichungen des Agglomeratanteils aber unter 1%. Trotz der geringen zeitlichen Stabilität, der mit dem Atomizer erzeugten Aerosole, lagen die Standardabweichungen der insgesamt angebotenen Partikelkonzentrationen (Tabelle 5) aus verschiedenen Expositionsversuchen bei maximal 38% (Aerosil200).

Eine bessere zeitliche Stabilität im Vergleich zum Atomizer konnte für die durch pyrolytische Zersetzung von TEOS erzeugten SiO_2 Aerosolparitkel erreicht werden. Die maximalen Abweichungen vom Mittelwert der Anzahlkonzentration und des modalen Partikeldurchmessers betrugen über einen Zeitraum von 5 Stunden weniger als 10 %. Ostraat et al. [2008] zeigten mit ihrem Aufbau eine stabile Lage der Größenverteilungen für mehrere Monate. Zu berücksichtigen ist allerdings der anfänglich nicht statische Zustand der Synthese. In diesem Zeitraum, der teilweise über eine Stunde betragen kann, zeigen sich kontinuierliche Veränderungen der Form und Lage der Anzahlgrößenverteilung.

Abgesehen von der kommerziellen SiO_2 70 Partikelsuspension beziehen sich die obigen Aussagen auf Partikel aus einer einzigen Synthese. Die Reproduzierbarkeit für Partikel aus einer anderen Charge hängt in diesen Fällen zusätzlich von der Reproduzierbarkeit der Partikelsynthese ab. Auf diese wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht eingegangen, da für die Expositionsversuche jeweils eine einzige Partikelcharge verwendet wurde.

5.2 Agglomeratstruktur der Aerosolpartikel

Abgesehen von den mit dem Elektrospray versprühten, kommerziell erhältlichen Suspensionen, enthalten die in Abschnitt 5.1 diskutierten Aerosole sehr große Agglomeratanteile. Der Anteil an Agglomeraten alleine ist jedoch wenig Aussagekräftig. Viel entscheidender für die Dosisbestimmung und biologische Wirkung ist die Größe und Struktur der Agglomerate. Die mit dem Elektrospray erzeugten Aerosole aus den kommerziellen Suspensionen mit Agglomeratanteilen von nur wenigen Prozenten enthalten fast ausschliesslich Monomere oder Dimere. Der Anteil größerer Agglomerate ist sehr gering und liegt für die maximale Konzentration der SiO_2 70 Partikel bei nur bei 0.4%. Die Struktur dieser Agglomerate stimmt mit denen von Cho et al. [2007] beobachteten Agglomeratformen aus getrockneten SiO_2 Kolloiden weitgehend überein. Lediglich Agglomerate dritter und vierter Ordnung zeigen zusätzlich nahezu kettenförmige Strukturen. Eine mögliche Ursache dieser Strukturen ist die Koagulation verschiedener Agglomerate vor oder während der Deposition ohne eine anschliessende Restrukturierung der Primärpartikel. Für größere Tröpfchen, wie im Fall des Atomizers, ergeben sich Agglomerate wesentlich höherer Ordnungen. Sie besitzen eine sehr kompakte, sphärische Struktur die nicht genau aus den TEM Aufnahmen aufgelöst werden kann. Nach Manoharan et al. [2003] sollte sich unter der Annahme einer reinen Van der Waals Wechselwirkung zwischen den Partikeln eine polytetraedrische Struktur bilden und somit eine Packungsdichte von 0.64 bzw. einen Füllfaktor f von 1.56 [Anikeenko and Medvedev, 2007] besitzen. Andererseits beobachten Manoharan et al. [2003] leichte Abweichungen gegenüber der polytetrahedrischen Struktur für Agglomerate mit mehr als 12 Primärpartikeln.

Kompliziertere Agglomeratstrukturen weisen die in der Gasphase synthetisierten Partikel nach der Resuspendierung auf. Wie bereits in Abschnitt 5.1 erörtert entstehen deren Agglomerate bereits vor der Resuspendierung in ein Aerosol. Ihre grundlegende Struktur ist daher bereits in der Suspension vorgegeben solange die mittlere Agglomeratzahl pro Tröpfchen deutlich unterhalb von 1 liegt. Für das Elektrospray mit mittleren Primärpartikelzahlen von weniger als 1 pro Tropfen (Abschnitt 5.1.2) ist diese Bedingung erfüllt. Es kann daher von einem sehr geringen Anteil an mehreren Agglomeraten enthaltenden Tropfen im Falle des Elektrosprays ausgegangen werden. Insofern sich die Agglomeratstruktur während des Abtrocknens der Tröpfchen nicht mehr ändert, erhält man daher mit dem Elektrospray einen Einblick in die Struktur der Agglomerate die trotz der Ultraschallbehandlung nicht deagglomeriert werden konnten. Sowohl die Agglomerate der resuspendierten Partikel aus der Gasphasensynthese, als auch die der flüssigabgeschiedenen SiO_2 MWP Partikel weichen deutlich von den kompakten Strukturen der Agglomerate aus den kommerziellen Suspensionen ab.

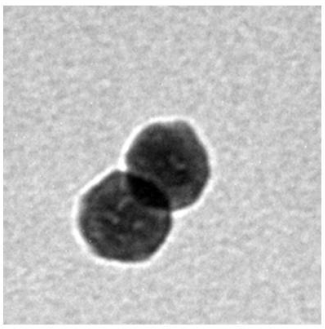
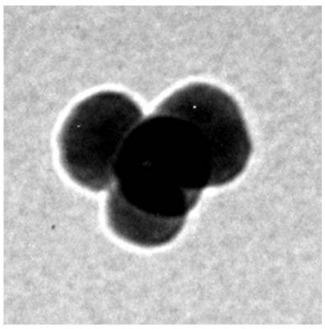
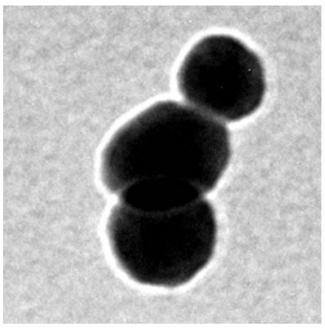
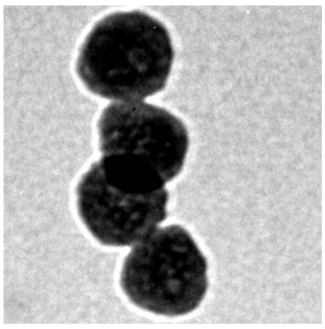
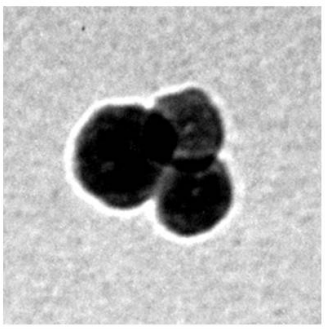
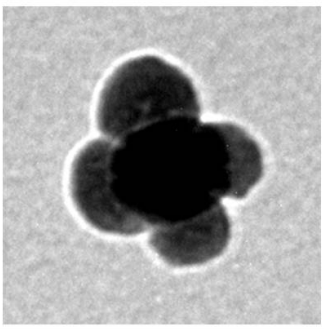
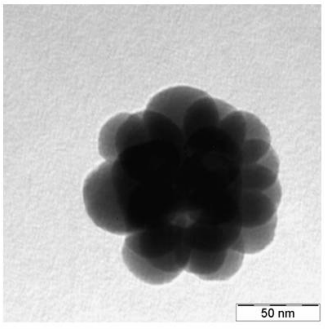
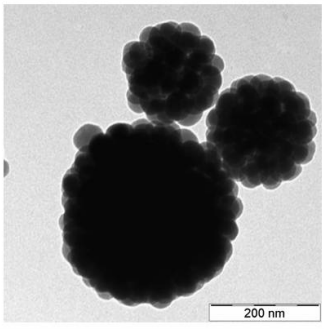
N		Struktur	N		Struktur
2		Dimer	4		Tetraeder
3		Monomer + Dimer (Kette)	4		Dimer + Dimer (Kette)
3		Dreieck	5		Quadr. Pyramide
		kompakte Cluster (N > 20)			Koagulat kompakter Cluster

Abbildung 43: Typische Agglomeratstrukturen der SiO_2 70 Partikel bei verschiedenen Primärpartikelzahlen (N) aus einem mit dem Elektrospray ($N \leq 5$) und Atomizer ($N > 5$) erzeugten Aerosol.

Die Formen ähneln dagegen fraktalähnlichen Agglomeratstrukturen. Der Versuch einer Bestimmung der fraktalen Dimension mit dem Verfahren nach Brasil et al. [1999] erwies sich für die TiO_2 20 und SiO_2 MWP Partikel als sehr fehlerbehaftet. Einerseits ist die Auswertung der Agglomerate aufgrund des schwachen

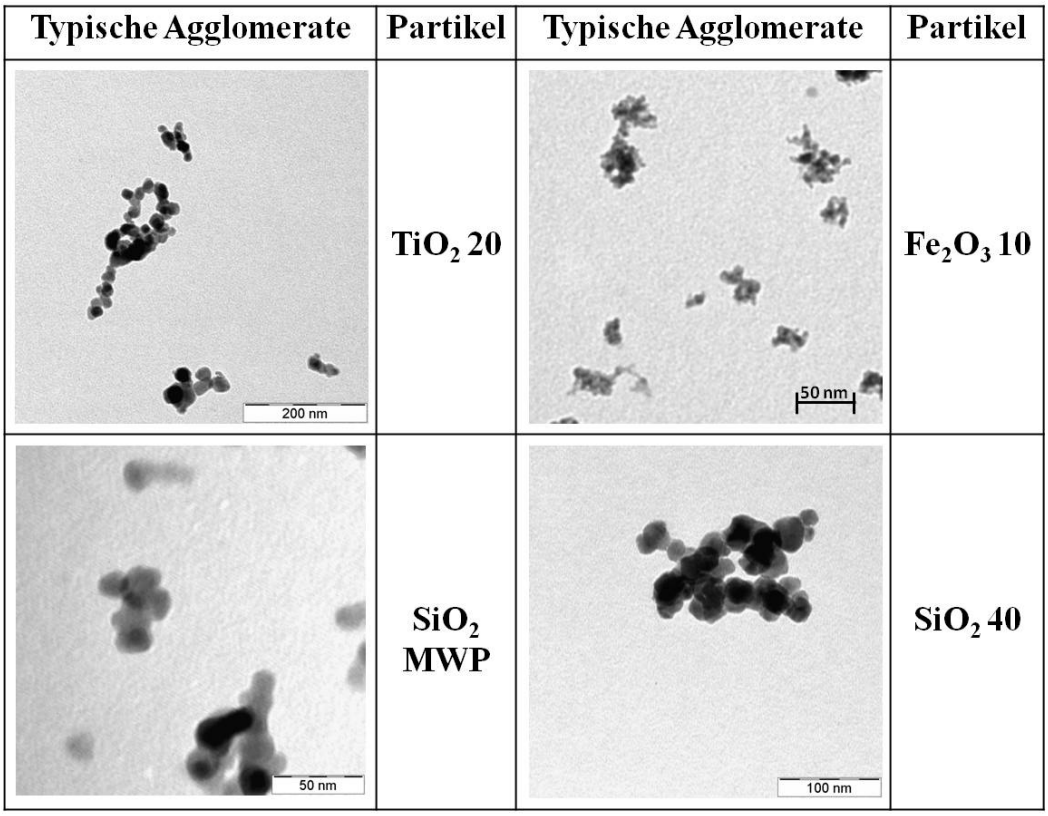


Abbildung 44: Agglomeratstrukturen verschiedener Partikel aus der Gasphasensynthese nach der Deposition aus einem mit dem Elektrospray erzeugten Aerosol.

Kontrastes der Partikel und teilweisen Überlagerung von Primärpartikeln nur schwer möglich. Andererseits enthalten insbesondere die SiO_2 MWP Partikel nur geringe Monomeranzahlen pro Agglomerat. Die Gültigkeit des fraktalen Konzepts mit entsprechend angepassten, simulierten Agglomeraten zeigt Brasil et al. [1999] allerdings nur bis zu einer minimalen Monomeranzahl von 8. Die geringen Monomeranzahlen bewirken zusätzlich stark von der Ausgleichsgeraden abweichende Werte (Abbildung 45). Deren Ursache ist die nicht exakt monodisperse Primärpartikelgrößenverteilung. Agglomerate aus nicht wesentlich mehr als 10 Monomeren können deutlich abweichende Primärpartikelverteilungen gegenüber dem Ausgangsmaterial aufweisen. Eine mögliche Ursache ist die Entstehung dieser Agglomerate in unterschiedlichen Bereichen der Flamme bzw. des

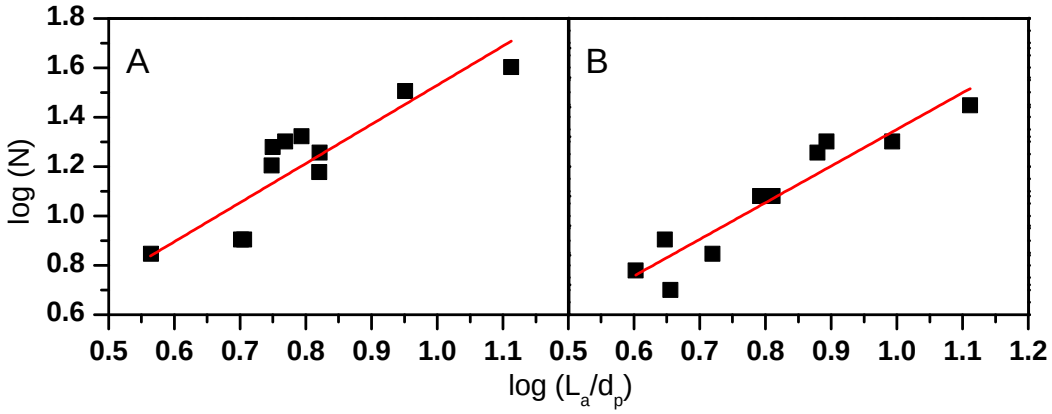


Abbildung 45: Abschätzung der fraktalen Dimension für Agglomerate der TiO_2 20 (**A**) und SiO_2 MWP Partikel (**B**) mit dem Verfahren nach Brasil et al. [1999].

Mikrowellenplasmas. Als Folge ergeben sich unterschiedliche Ausdehnungen L_a der Agglomerate bei gleicher Monomeranzahl. Eine Abschätzung aus jeweils 10 Agglomeraten liefert fraktale Dimensionen von 1.6 ± 0.2 für TiO_2 20 und 1.5 ± 0.2 für SiO_2 MWP (Abbildung 45). Die Werte sind damit ungewöhnlich klein und liegen sogar unterhalb typischer fraktaler Dimensionen für diffusionslimitierte Agglomerationsprozesse. Mit 1.6 ähnlich kleine Werte für TiO_2 Agglomerate aus 22.7 nm Primärpartikeln wurden über Röntgenkleinwinkelstreuung unmittelbar nach einer Flammensynthese von Hyeon-Lee et al. [1998] angegeben. Auch für SiO_2 Partikel wurden bereits von Hurd and Flower [1988] mit 1.49 ungewöhnlich kleine Werte der fraktalen Dimension beobachtet. Deren Daten lassen jedoch ebenfalls nur eine ungenaue Angabe zu. Häufiger wurden stattdessen Werte für d_f zwischen 1.7 und 2 beobachtet [Hurd et al., 1987],[Boldridge, 2010]. Es zeigt sich allerdings, dass der Einfluss der fraktalen Dimension auf die in den vorliegenden Aerosolen (Abbildung 29 und 35) enthaltene Massenkonzentration für Werte zwischen 1.5 und 1.8 sehr gering ist (Abbildung 46). Im Fall des TiO_2 20 ergibt sich eine Gesamtmassenkonzentration von $(7.1 \pm 0.8)\cdot10^{-5}$ $\mu g/cm^3$ mit $d_f = 1.6$ bzw. $(8 \pm 1)\cdot10^{-5}$ $\mu g/cm^3$ mit $d_f = 1.8$. Zusammen mit der Oberflächenkonzentration von $(3.1\pm 0.1)\cdot10^{-9}$ m^2/cm^3 folgt ein Oberflächen zu Massenverhältnis von (44 ± 6) m^2/g. Die Oberflächen- und Massenkonzentrationen für sehr kleine Agglomerate werden mit dem fraktalen Konzept aufgrund der Verwendung eines mittleren Primärpartikeldurchmessers überschätzt. Wegen des geringen Anteils an der Gesamtoberflächen- und Massenkonzentration dieser kleinen Agglomerate kann der dadurch entstehende Fehler allerdings weitgehend vernachlässigt werden. Entsprechend gut stimmt der sich aus der in Abbildung 29 gezeigten Primärpartikelgrößenverteilung ergebende Wert von (47 ± 17) m^2/g und die aus Gleichung 22 und 23 resultierende spezifische Oberfläche von (55 ± 3) m^2/g mit

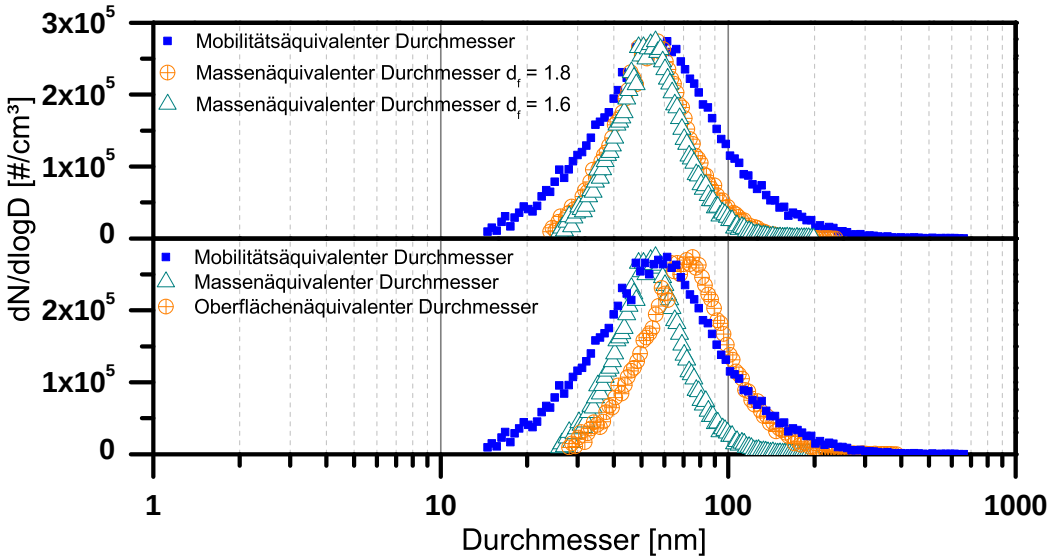


Abbildung 46: Größenverteilung des mit dem Elektrospray erzeugten TiO_2 20 Aerosols aufgetragen über verschiedenen Äquivalenzdurchmessern. Für deren Bestimmung wurde der in Abschnitt 3.2.2 beschriebene fraktale Formalsimus mit einer fraktalen Dimension d_f von 1.6 verwendet.

dem über das fraktale Konzept bestimmten Wert überein. Alle Werte weichen allerdings deutlich von der in Tabelle 3 angegebenen BET Oberfläche mit einem Wert von 105 m^2/g ab. Die Unsicherheiten wurden in diesem Fall über das Fehlerfortpflanzungsgesetz aus den in Abschnitt 5.1 angegebenen Unsicherheiten für d_0 und σ, bzw. der Intervallbreite von 2 nm der gemessenen Primärpartikelverteilung bestimmt. Nicht berücksichtigt wurde der unbekannte Wert für die Primärpartikeldichte, für welche der von Hyeon-Lee et al. [1998] verwendete Wert von 4.07 g/cm^3 angenommen wurde. Als Hauptfehlerquelle und Ursache für die große Abweichung gegenüber der BET Oberfläche ist allerdings die nicht korrekte Annahme kompakter sphärischer Primärpartikel wahrscheinlicher. Hurd et al. [1987] berichten über unterschiedliche spezifische Oberflächen bei gleichbleibender Primärpartikelgröße für porenfreie SiO_2 Partikel. Sie erklären dieses Phänomen mit unterschiedlichen Rauhigkeiten und einer fraktalähnlichen Struktur der Oberfläche der Primärpartikel. Derartige Effekte wurden bei der hier gemachten Annahme sphärischer Primärpartikel nicht berücksichtigt und können die Ursache für eine unterschätzte Oberfläche und somit zu kleine spezifische Oberfläche sein. Eine andere häufig gemachte Näherung zur Berechnung der Massen- und Oberflächenverteilung ist die Verwendung sphärischer Agglomerate. Da diese Annahme mit 10.5 m^2/g zu einer noch größeren Abweichung der spezifischen Oberfläche führt, wird trotz der diskutierten Fehlerquellen der fraktale Formalismus zur Abschätzung der Massendosis angewendet. Die Bestimmung der Oberflächendosis erfolgt dagegen aus der Massendosis über die experimentell bestimmten Werte

für die spezifische Oberfläche.
Aufgrund der geringeren Primärpartikelgröße ergeben sich für die SiO_2 MWP Partikel mit den gleichen Verfahren größere Werte für die spezifische Oberfläche. Mit dem fraktalen Formalsimus ergibt sich ein Wert von (150 ± 38) m^2/g bei einer fraktalen Dimension von 1.5 bzw. (148 ± 35) m^2/g bei einer fraktalen Dimension von 1.8. Beide Werte liegen nur leicht unterhalb der sich aus Gleichung 22 und 23 ergebenden spezifischen Oberfläche von (185 ± 36) m^2/g.

Von der ursprünglichen Agglomeratform abweichende Strukturen entstehen wenn mehrere Agglomerate in einem Tröpfchen enthalten sind. In diesem Fall bilden sich Cluster aus Agglomeraten mit einer kompakteren Struktur gegenüber den zugrundeliegenden Agglomeraten. Aufgrund der größeren Tröpfchen kann dieser Effekt bereits bei ähnlich konzentrierten Ausgangssuspensionen mit dem Atomizer beobachtet werden (Abbildung 47). Die fraktale Dimension dieser Cluster ist deutlich größer gegenüber den ursprünglichen Agglomeraten und kann daher nicht mehr über das Verfahren nach Brasil et al. [1999] bestimmt werden. Theoretisch ist die Bestimmung der fraktalen Dimension auch über die Partikeloberfläche möglich. Wie bereits für das TiO_2 20 diskutiert wurde, funktioniert das jedoch nur mit kugelförmigen Primärpartikeln. Eine fraktale Dimension, mit der sich die experimentell bestimmte spezifische Oberfläche ergibt, konnte daher nicht bestimmt werden. Des Weiteren ist die Gültigkeit des fraktalen Konzepts insbesondere für die Aerosil200 Partikel fragwürdig. Obwohl Ibaseta and Biscans [2010] eine Agglomeratgrößenabhängige fraktale Dimension zwischen 2 und 2.5 für trocken dispergierte Aerosil200 Partikel angeben, ist die Aussagekraft dieser Werte aufgrund der breiten und bimodalen Primärpartikelgrößenverteilung des Aerosil200 (Abbilung 34) in Frage zu stellen. Es ist außerdem nicht ausgeschlossen, dass die flüssig dispergierten Partikel noch kompaktere Strukturen als die von Ibaseta and Biscans [2010] trocken dispergierten Aerosole aufweisen. Eine wirklich aussagekräftige Bestimmung der im Aerosol enthaltenen Massenverteilung ist daher nur experimentell möglich und bleibt an dieser Stelle offen. Zur Abschätzung der Massendosis wird im weiteren Verlauf für derartige Cluster die gleiche Packungsdichte wie für die großen SiO_2 70 Agglomerate (Abbildung 43) angenommen.

Die Agglomeratstruktur der nicht resuspendierten SiO_2 Partikel aus der eigenen Synthese lässt sich am ehesten mit denen der kommerziellen Partikelsuspensionen nach der Resuspendierung über das Elektrospray vergleichen. Aus den in Abschnitt 5.1.4 diskutierten Agglomeratanteilen von maximal 70% gehen fast ausschliesslich Partikel mit 2 bis 4 Monomeren hervor. Lediglich die wenigen durch Sammelartefakte entstehenden Agglomerate enthalten eine deutlich größere Monomeranzahl (Abbildung 41). Verglichen mit den kommerziellen Partikelsuspensionen ergeben sich jedoch seltener die typischen kompakten Strukturen eines

Dreiecks, Tetraeders oder einer quadratischen Pyramide. Da die Agglomeratbildung im Gegensatz zum Elektrospray und Atomizer alleine durch Partikelstöße entstehen und nicht durch die schnell verdampfende Flüssigkeit beeinflusst wird, ergeben sich häufig offenere, kettenförmige Agglomerate. Des Weiteren zeigen einige Partikel die typische Form eines Agglomerats nicht sphärischer Gestalt, lassen aber keine klaren Primärpartikel erkennen.

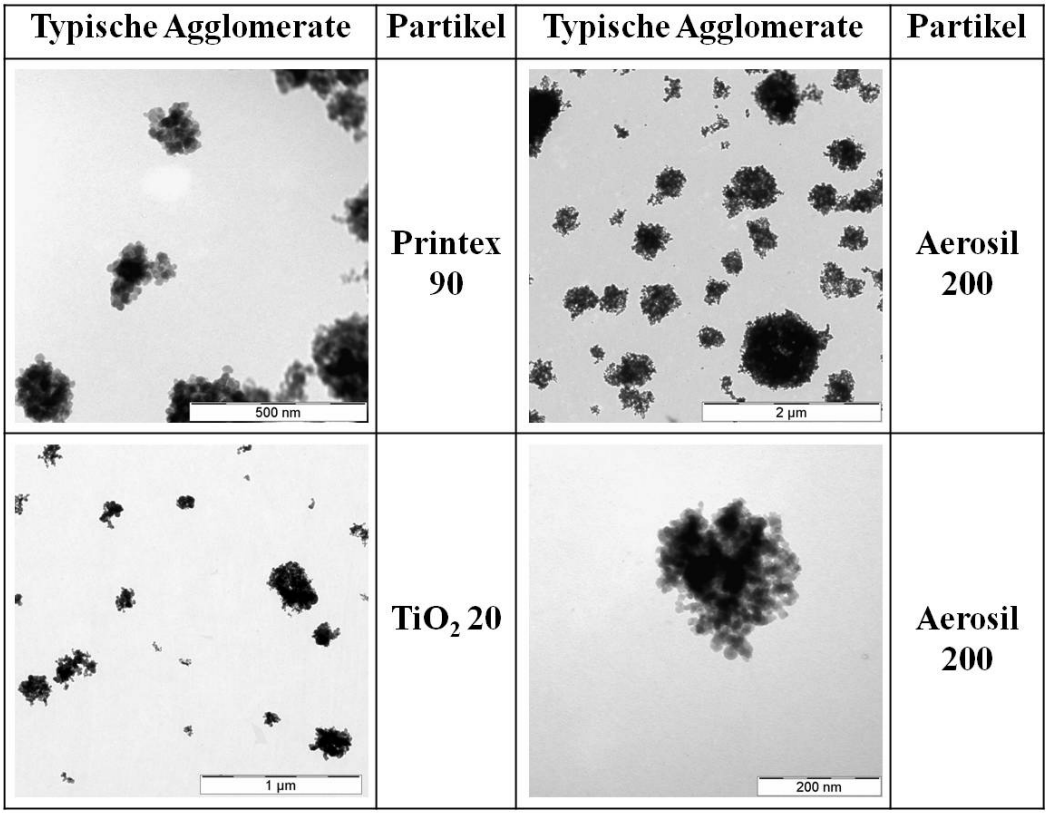


Abbildung 47: Agglomerate verschiedener gasphasensynthetisierter Partikel nach der Resuspendierung mit einem Atomizer. In den gegenüber dem Elektrospray größeren Tröpfchen sind zu großen Anteilen mehrere Agglomerate suspendiert. Nach dem trocknen der Suspensionsflüssigkeit bilden sie relativ kompakte Cluster hoher fraktaler Dimensionen. Der Vergleich mit den TiO_2 20 Agglomeraten aus dem Elektrospray (Abbildung 44) belegt eine wesentlich kompaktere Struktur dieser Cluster gegenüber den zugrundeliegenden Agglomeraten.

5.3 Zellverträglichkeit der Anlage

Am wichtigsten für die Zellverträglichkeit des Aufbaus ist die Sicherstellung einer relativen Feuchte von mehr als 80 % sowie einer Temperatur zwischen 36° C und 38° C. Mit dem in Abschnitt 4.2 beschriebenen Befeuchter konnten bei 37° C und typischen Flussraten von weniger als 2 lpm relative Feuchten bis zur Sättigung erreicht werden. Die für eine bestimmte Feuchte notwendige Wassertemperatur variiert dabei mit der Gesamtflussrate des Aerosols. Bei einem für das Elektrospray typischen Gesamtfluss von 1.2 l/min ergibt sich die in Abbildung 48 dargestellte Abhängigkeit zwischen relativer Feuchte und Wassertemperatur. Die relative

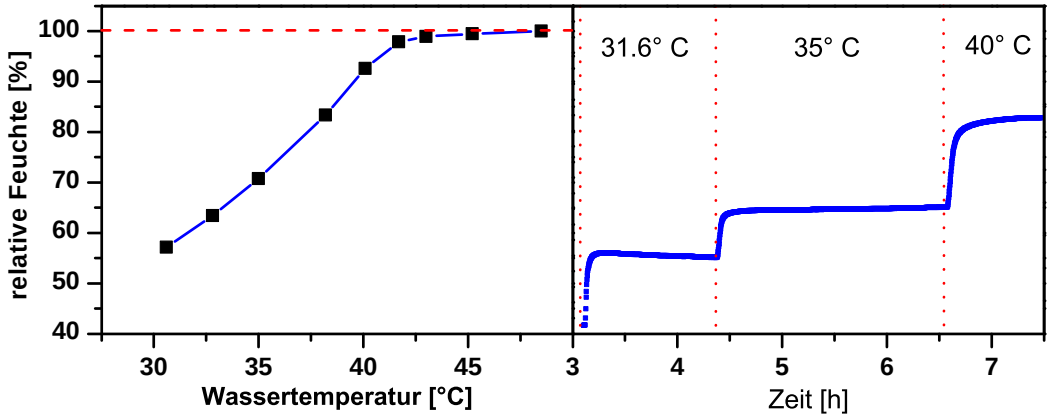


Abbildung 48: Links dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Feuchte von der Temperatur des Wasserthermostaten bei einem Aerosolfluss von 1.2 lpm und einer Temperatur von 37° C. Unter diesen Bedingungen ist eine Befeuchtung des Aerosols bis zur Sättigung möglich. Im rechten Teilbild ist der zeitliche Verlauf der relativen Feuchte bei einer Temperatur von 38° C nach schrittweiser Erhöhung der Wassertemperatur von 31.6° C auf 40° C dargestellt. nach jeweils 10 min hat sich ein weitgehend statischer Zustand eingestellt.

Feuchte erreicht dabei innerhalb weniger Minuten einen statischen Zustand und variiert bei konstanter Temperatur um nur 0.9 % des Mittelwertes. Einen ebenfalls stabilen Wert mit einer Variabilität von 1.5% weißt die Temperatur der Expositionsanlage mit der externen Regelung auf. Im Gegensatz zur relativen Feuchte dauert es mit ca. 1 h jedoch wesentlich länger bis sich ein annähernd statischer Zustand nach dem Schliessen der Kammer eingestellt hat (Abbildung 49). Innerhalb dieses Zeitraums ist nur eine grobe Regelung der relativen Feuchte möglich. Solange die relative Feuchte jedoch einen Wert von 80 % nicht über längere Zeiträume unterschreitet, kann keine Auswirkung auf die Vitalität oder Membranintegrität der Zellen beobachtet werden (Abbildung 50). Die Expositionsversuche wurden daher in der Regel bereits einige Minuten nach dem Schliessen der Kammer gestartet. Die zytotoxische Wirkung nach Behandlung der A549 Zellen mit synthetischer Luft unter verschiedenen CO_2 Konzentrationen in der Expositionskammer ist in Abbildung 50 dargestellt. Eine Freisetzung von LDH (Laktatdehydrogenase) ist ein Indikator für eine Schädigung der Zellmembran. Als Maß für Vitalität wurde

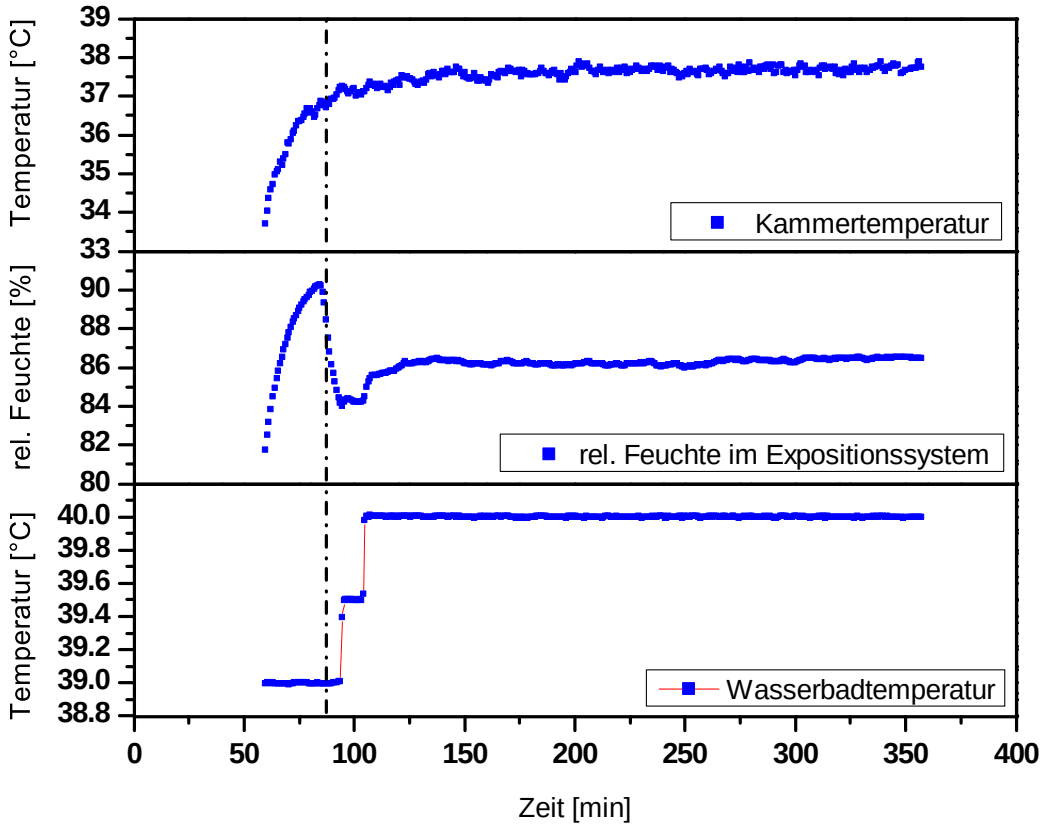


Abbildung 49: Typischer Verlauf von relativer Feuchte und Temperatur innerhalb der Expositionskammer während einer Zellexposition. Mit dem Einsetzen der Zellschalen sinkt die Temperatur stark ab und verursacht einen Anstieg der relativen Feuchte. Unmittelbar nach dem Schliessen der Kammer und Start der Datenaufzeichnung bei 60 min wird das gefilterte Aerosol den Zellen zugeführt. Aufgrund der langsam wieder zunehmenden Temperatur beginnt die relative Feuchte 24 min später wieder zu sinken. Nach unterschreiten eines Wertes von 84% wird dem durch Erhöhung der Wassertemperatur des Befeuchters entgegengewirkt. Ungefähr 1 h nach dem schliessen der Kammer hat sich ein annähernd statischer Zustand mit 86% relativer Feuchte und 37.6° C Kammertemperatur eingestellt. Der Beginn der Zellexposition bei 88 min wird gekennzeichnet durch die unterbrochene Linie.

die metabolische Aktivität bestimmt. Bei beiden Parametern wurden die Werte auf die Labortischkontrolle (d.h. Zellen, die bei 37°C unter ALI-Bedingungen mit Laborluft exponiert wurden) normiert. Als zweite Kontrolle wurden die Zellen bei 37°C unter ALI-Bedingungen im Brutschrank (5% CO2) inkubiert. Gegenüber den Kontrollen weißen die in der ALIDA behandelten Zellen keine erhöhte metabolische Aktivität oder geringere Membranintegrität auf, obwohl die Exposition mit 5% und 10% Kohlenstoffdioxidanteil eine Veränderung der Farbe des Nährmediums bewirkte, was auf eine Verringerung des pH-Wertes schliessen lässt. Bei einer Brutschrank-Kontrolle war die LDH-Freisetzung aus bisher nicht geklärten Gründen leicht erhöht, was jedoch die Aussage bezüglich der Zellverträglichkeit der ALIDA-Exposition nicht beeinträchtigt. Wie aus Abbildung 51 hervorgeht

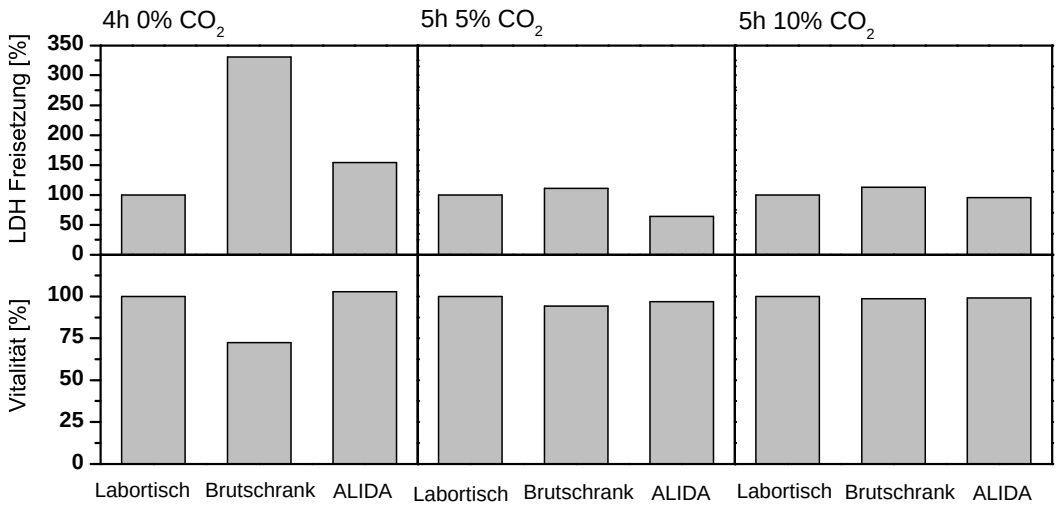


Abbildung 50: Zytotoxische Wirkung nach Behandlung von A549 Zellen mit synthetischer Luft in der ALIDA bei verschiedenen CO_2 Konzentrationen. Als Kontrollen dienten Zellen, die unter ALI-Bedingungen bei 37° C mit Laborluft (Labortisch) bzw. im Brutschrank (5% CO2) exponiert wurden. LDH-Freisetzung und Vitalität wurden auf die Labortischkontrollen normiert. Die in der Expositionskammer behandelten A549 Zellen weisen nur geringfügige Änderungen der Membranintegrität (LDH-Freisetzung) oder Zellvitalität auf.

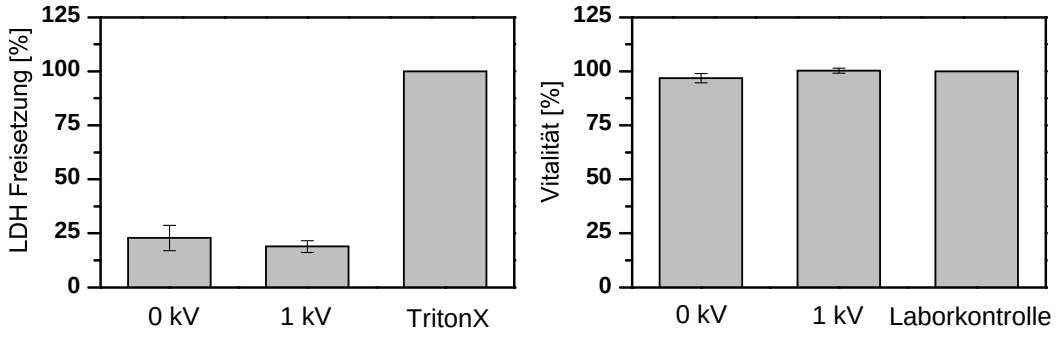


Abbildung 51: Zytotoxische Wirkung nach Behandlung mit synthetischer Luft in der Expositionskammer unter Verwendung der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Elektrodeneinsätze für 5 h. Die Werte für die LDH-Freisetzung in (A) wurden auf eine mit Triton X-100 lysierte Probe (100 % LDH-Freisetzung, d.h. keine Membranintegrität mehr) und die Werte für Vitalität auf die Labortischkontrolle (ALI-Bedingungen, 37°C, Laborluft) normiert. Das Anlegen einer Spannung von 1 kV zeigt keinen Einfluss auf die zytotoxische Reaktion der A549 Zellen gegenüber den bei 0 kV betriebenen Kammern. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung aus einem Versuch mit jeweils 3 Zellkulturschalen

nimmt auch der Betrieb der Expositionskammern mit den in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Elektroden keinen sichtbaren Einfluss auf die Zellverträglichkeit der Expositionsanlage. Die Werte für LDH Freisetzung und Vitalität der Proben mit Elektrode unterscheiden sich nicht von den Werten der Proben ohne Elektrode nach einer 5 h Behandlung mit synthetischer Luft. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der Depositionsanlage Expositionsversuche über mehrere Stunden durchgeführt werden können, ohne eine erhöhte zytotoxische Reaktion der A549 Zellen gegenüber den verwendeten Kontrollen zu verursachen. Nicht berücksichtigt wurde bei diesen Vorversuchen die Wirkung durch den von geladenen Partikeln verursachten Strom. Nach Savi et al. [2008] treten Zellschädigungen typischerweise erst bei Strömen von 100 A auf. Selbst bei einer Depositionseffizienz von 100%, einer Konzentration von $1{\cdot}10^6$ Partikeln/cm^3 und mit jeweils einer Elementarladung pro Partikel ergibt sich jedoch nur ein Strom von 300 fA und schliesst einen Einfluss durch die von den Partikeln transportierten Ladungen aus. Obwohl die bisher gezeigten Versuche mit einer maximalen Expositionsdauer von 5 h durchgeführt wurden, sind auch längere Versuche denkbar. Aufgrund der stabilen Feuchte und Temperaturbedingungen wird die Dauer der Expositionsversuche theoretisch nur durch das Wachstum von Bakterien oder Hefen auf den Zellen begrenzt. Erste, hier nicht gezeigte, Versuche mit Makrophagen zeigen jedoch, dass andere Zelltypen empfindlicher auf eine Behandlung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht reagieren können und die maximal mögliche Expositionsdauer möglicherweise verringern.

5.4 Depositionseffizienz der Expositionskammer ohne Elektrode

Die Depositionseffizienz wird maßgeblich durch das Strömungsfeld innerhalb der Expositionskammer beeinflusst. Aus der in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Simulation mit CFX innerhalb der Expositionskammer ergeben sich nahezu keine Geschwindigkeitskomponenten senkrecht zur Schnittebene (Abbildung 52). Lediglich im Bereich des Aerosolausgangs lassen sich z Komponenten der Geschwindgkeit aufgrund der nicht exakten Rotationssymmetrie beobachten. Im Bereich der Zellen sind diese Komponenten jedoch vernachlässigbar und die Annahme eines rotationssymmetrischen Strömungsfeldes gerechtfertigt.

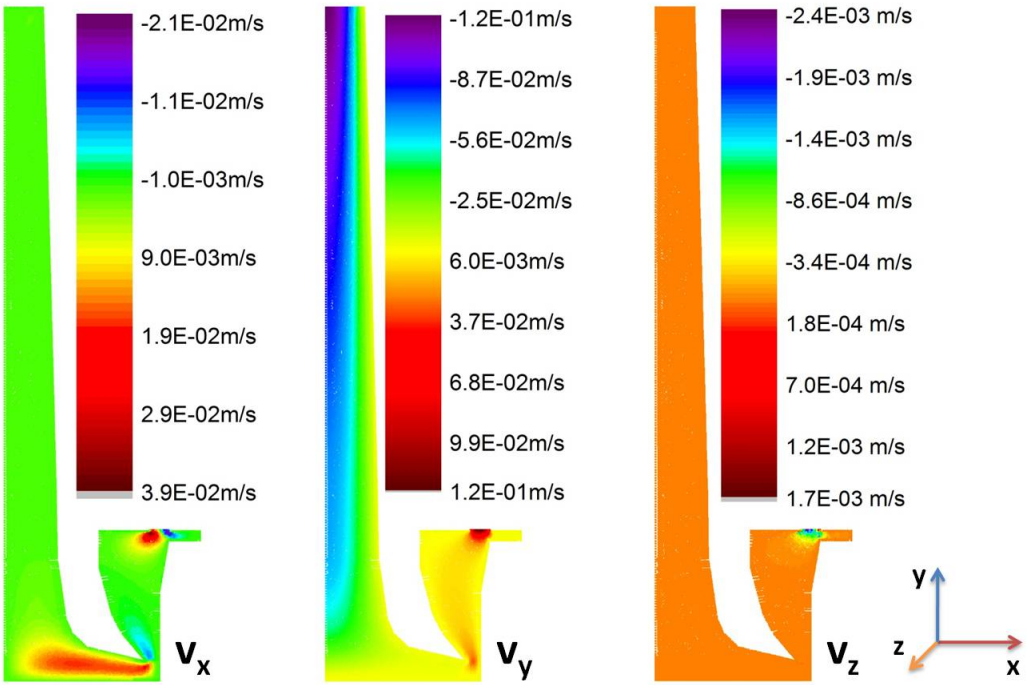


Abbildung 52: Geschwindigkeitskomponenten aus der in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Simulation innerhalb der Expositionskammer. Abgesehen vom Bereich in der Nähe des Aerosolausgangs kann von einem rotationssymmetrischen Strömungsfeld ausgegangen werden.

Die Geschwindigkeitskomponenten und Differenzen zwischen zwei Gitterpunkten in y Richtung zwischen dem Ende der Aerosolzufuhr und den Zellen sind sehr gering. Große Partikel können in diesem Bereich aufgrund der Schwerkraft mit verhältnismäßig hohen Depositionseffizenzen sedimentieren. Eine schwerkraftbedingte Deposition von Nanopartikeln kann unter diesen Bedingungen jedoch nahezu vernachlässigt werden. Stattdessen ist für Partikel dieser Größe von einer ausschliesslich diffusiv getriebenen Deposition auszugehen. Das Strömungsfeld zur Simulation der Partikeltrajektorien in diesem Bereich unter Berücksichtigung der

Diffusion ist in Abbildung 53 dargestellt. In den folgenden Abschnitten wird der genaue Verlauf der Depositionswahrscheinlichkeiten und daraus resultierenden Depositionseffizienzen aus den Trajektorien unterschiedlicher Partikel ermittelt und mit experimentellen Ergebnissen verglichen.

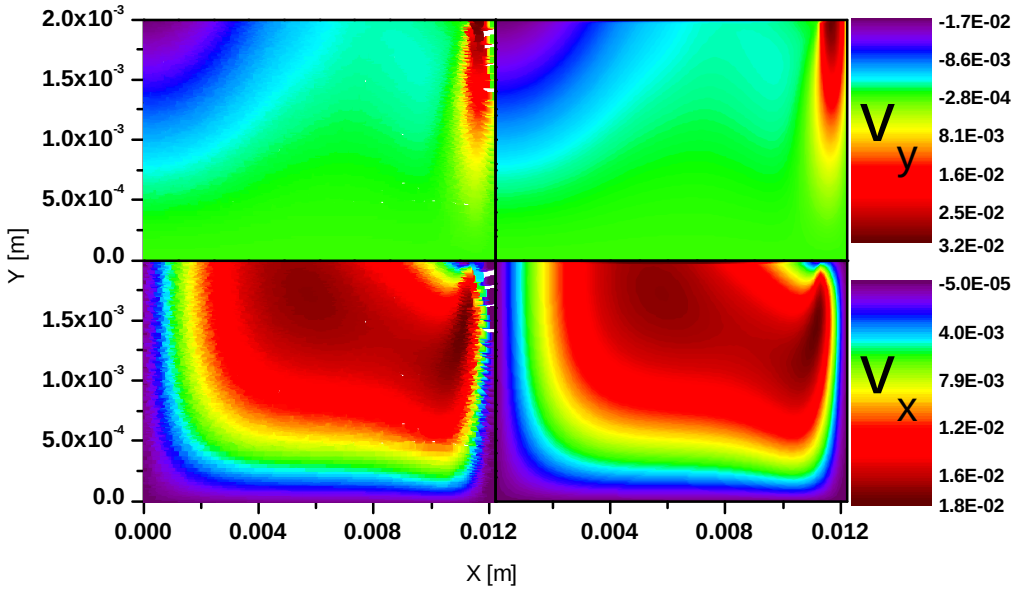


Abbildung 53: Das mit Ansys CFX simulierte Strömungsfeld im Bereich der Zellen (links) und dessen Interpolation auf ein gleichmäßiges Gitter mit dem Renka Cline Verfahren (rechts) zur Simulation der Partikeltrajektorien im zellnahen Bereich unter Berücksichtigung Brownscher Bewegung.

5.4.1 Größenabhängigkeit der Depositionseffizienz

Zur Bestimmung der Depositionswahrscheinlichkeiten wurden die Partikeltrajektorien innerhalb der Expositionskammer, wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, simuliert. Die mit Ansys CFX simulierten Trajektorien zwischen dem Aerosoleinlass und dem Ende der trompetenförmigen Aerosolzufuhr zeigen unabhängig vom Partikeldurchmesser eine lineare Beziehung zwischen den Abständen zur Rotationsachse (Abbildung 54). Aufgrund der annähernd rotationssymmetrischen Strömung ist diese Beziehung ebenfalls unabhängig vom Winkel gegenüber der Symmetrieebene. Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 erläutert wurde, ist dabei keine Brownsche Molekularbewegung oder Korrektur der Reibungskraft für das Übergangs- und freie molekulare Regime berücksichtigt worden. Es ist daher mit einer zunehmenden Abweichung von dieser linearen Beziehung für kleine Partikel zu rechnen. Die Verweilzeit der Partikel innerhalb der Aerosolzufuhr liegt, abgesehen von den wandnahen Bereichen, allerdings nur in der Größenordnung einer Sekunde. Eine Abschätzung des mittleren quadratischen Versatzes durch Diffusion in einer Dimension ergibt dafür einen Wert von 0.2 mm bei einer Partikel-

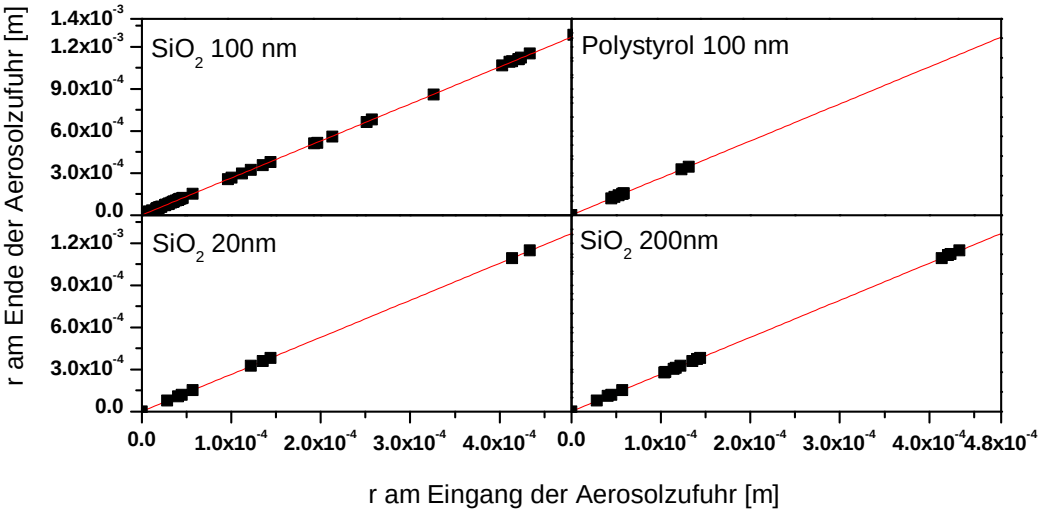


Abbildung 54: Der Abstand der Partikel von der Rotationsachse am Einlass und Auslass der Aerosolzufuhr der Expositionskammer. Aus der Simulation mit CFX ergeben sich die durch schwarze Punkte dargestellten Werte. Die rote Gerade ergibt sich aus einem linearen Fit der Daten. Ihr Anstieg ist dabei unabhängig von der Größe und Dichte der simulierten Partikel. Insbesondere für Partikel im freien molekularen Regime ist allerdings mit zunehmenden Abweichungen von diesem Verhalten auszugehen.

größe von 20 nm. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die durch die Strömung verursachten Versätze. Insbesondere für noch kleinere Partikel ist daher anstatt von einem festen Wert von einer Wahrscheinlichkeitsverteilung, ein Partikel innerhalb eines bestimmten Abstands zur Rotationsachse am Ende der Aerosolzufuhr wiederzufinden, auszugehen. Die weitere Simulation in dem in Abbildung 53 gezeigten Strömungsfeld unter Berücksichtigung diffusiver Versätze ergibt stark von der Partikelgröße und der Startposition abhängige Depositionswahrscheinlichkeiten. Während die Depositionswahrscheinlichkeit kleiner Partikel ($\lambda/d_p > 1$) wie erwartet durch die Brownsche Molekularbewegung dominiert wird, nimmt sie nahezu keinen Einfluss auf die Trajektorien großer Partikel. Entsprechend folgt deren Depositionswahrscheinlichkeit annähernd einer Stufenfunktion (Abbildung 55). Der sich daraus ergebende maximale Abstand R' von der Rotationsachse am Eingang der Expositionskammer bis zu dem ein Partikel noch deponiert, verhält sich dabei anfangs linear zum Partikeldurchmesser. Wie sich am Beispiel von Partikeln der Dichte 1 g/cm^3 zeigt, treten Abweichungen von dieser linearen Abhängigkeit erst für Partikeldurchmesser von mehreren μm auf. Gleichzeitig nimmt R' für Partikel dieser Größenordnung typischerweise Werte unterhalb von 1 mm an, so dass die Depositionseffizienz vereinfacht aus Gleichung 36 berechnet werden kann (Abbildung 56). Entsprechend folgt die Depositionseffizienz einer quadratischen Funktion des Partikeldurchmessers.
Da für kleine Partikel die Depositionswahrscheinlichkeit deutlich von einer Stufenfunktion abweicht (Abbildung 55), kann die Näherung aus Gleichung 36 nicht mehr verwendet werden. Aus der Integration über die Depositionswahrscheinlich-

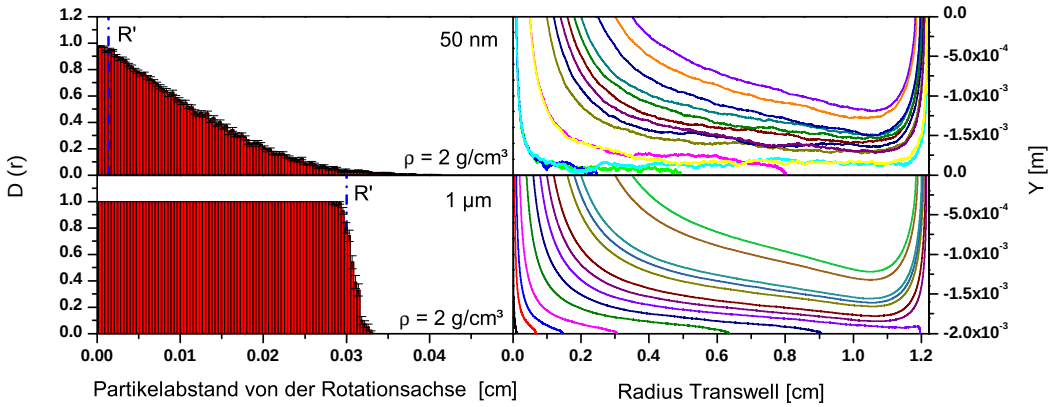


Abbildung 55: Depositionswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Ausgangsposition für Partikel mit einem Durchmesser von 50 nm und 1000 nm und einer Dichte von 2 g/cm^3 (links). Der Einfluss der Diffusion auf die Trajektorien der 1 μm Partikel (unten rechts) ist kaum sichtbar. Entsprechend zeigt deren Depositionswahrscheinlichkeit einen annähernd stufenförmigen Verlauf. Im Gegensatz dazu verursacht die Brownsche Bewegung für 50 nm Partikel mit gleicher Ausgangsposition vollkommen unterschiedliche Trajektorien (oben rechts). Die Wahrscheinlichkeit das ein Partikel einer bestimmten Startposition deponiert nimmt daher über weite Bereiche Werte zwischen 0 und 1 an, so dass der stufenförmige Verlauf der Depositionswahrscheinlichkeit verloren geht. Die blauen, gestrichelten Linien kennzeichnen R' aus der Simulation ohne Berücksichtigung der Diffusion. Die Depositionseffizienz der 50 nm Partikel würde in diesem Fall deutlich unterschätzt werden.

keiten nach Gleichung 35 ergibt sich anders als für große Partikel eine für kleiner werdende Partikeldurchmesser zunehmende Depositionseffizienz. Die Abhängigkeit kann dabei anfangs mit einer Potenzfunktion beschrieben werden (Abbildung 57). Im Größenbereich weniger 100 nm zwischen den beiden Grenzfällen sehr großer und kleiner Partikel ergibt sich ein für Aerosolpartikel typisches Minimum der Depositionseffizienz. Für Partikel mit einer Dichte von 2 g/cm^3 entsprechen

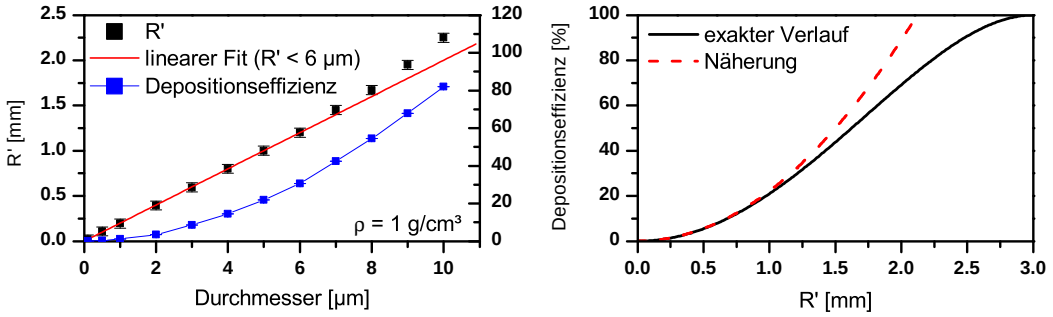


Abbildung 56: R' in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers für eine Partikeldichte von 1 g/cm^3 (links). Ohne Berücksichtigung der Diffusion ergibt sich ein linearer Verlauf von R' bis zu einem Partikeldurchmesser von 6 μm. Aus der Abhängigkeit der Depositionseffizienz von R' für große Partikel nach Gleichung 36 (rechts) ergibt sich bis zu diesem Durchmesser eine quadratisch zunehmende Depositionseffizienz. Die Depositionseffizienzen unterhalb von 500 nm werden allerdings ohne Berücksichtigung der Diffusion deutlich unterschätzt.

die Depositionseffizienzen in diesem Bereich mit Abweichungen von maximal 30% des simulierten Wertes der Summe aus den Verläufen beider Grenzfälle.

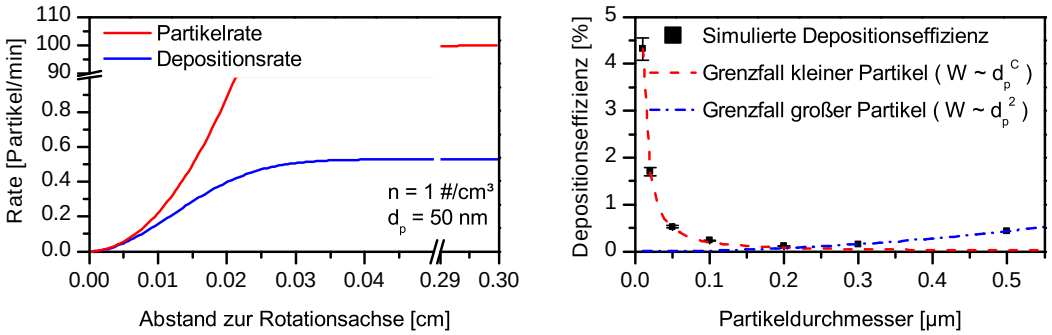


Abbildung 57: Die nach Gleichung 35 innerhalb eines bestimmten Partikelabstands zur Rotationsachse einströmende Partikelrate und der Anteil der davon deponierenden Partikel mit einer Größe von 50 nm unter Verwendung einer Konzentration von 1 Partikel/cm^3 und der in Abbildung 55 gezeigten Depositionswahrscheinlichkeit (links). Die sich aus dem Verhältnis der Depositionsrate und einströmenden Partikelrate ergebenden Depositionseffizienzen für Partikel unterschiedlicher Größe und der Dichte 2 g/cm^3 sind im rechten Teilbild dargestellt. Der Grenzfall kleiner und großer Partikel kann durch eine Potenz- (rot) bzw. quadratische Funktion (blau) beschrieben werden. Der Übergang zwischen beiden Bereichen ergibt sich mit Abweichungen von maximal 30% annähernd aus der Summe beider Grenzfälle.

5.4.2 Dichteabhängigkeit der Depositionseffizienz

Bisher wurde lediglich auf die Abhängigkeit der Depositionseffizienz vom Partikeldurchmesser eingegangen. Wie bereits aus Gleichung 35 in Abschnitt 4.2.3 hervorgeht ist zusätzlich von einem Einfluss durch die Aerosolflussrate Q, dem Abstand zwischen Aerosoleinlass und der Zelloberfläche s sowie durch die Partikeldichte ρ anzunehmen. Während Erfahrungswerte für Q einen optimalen Wert von 100 ml/min nahelegen und s aus praktischen Gründen auf 2 mm festgelegt wurde, ist die Partikeldichte durch das verwendete Material vorgegeben. Die Depositionswahrscheinlichkeiten kleiner Partikel ($\lambda/\mathrm{d}_p > 1$) unterschiedlicher Dichte zeigen jedoch einen nahezu identischen Verlauf (Abbildung 58). Entsprechend klein sind die Unterschiede der daraus resultierenden Depositionseffizienzen, die innerhalb der Unsicherheit durch die begrenzte Anzahl an simulierten Trajektorien liegen. Der geringe Einfluss der Dichte auf die Depositionseffizienz ist eine Folge der dichteunabhängigen Diffusionskonstante. Aus Gleichung 25 ist ersichtlich, dass sich die Dichte lediglich auf die Relaxationszeit und Sedimentationsgeschwindigkeit auswirkt. Beide Werte sind für Partikel dieser Größenordnung vernachlässigbar klein. Erst mit zunehmender Größe zeigt sich daher ein signifikanter Einfluss der Partikeldichte auf die Depositionseffizienz. Nach wie vor hängt R' über große Bereiche wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben linear vom Partikeldurchmesser ab. Allerdings wird der Anstieg stark durch die Partikeldichte beeinflusst (Abbildung 59). Im Bereich zwischen 0.5 g/cm^3 und 10 g/cm^3 lässt er sich annähernd durch eine exponentielle Funktion beschreiben. R' kann daher über

$$R' \approx Ce^{D\rho} + m_0 \tag{37}$$

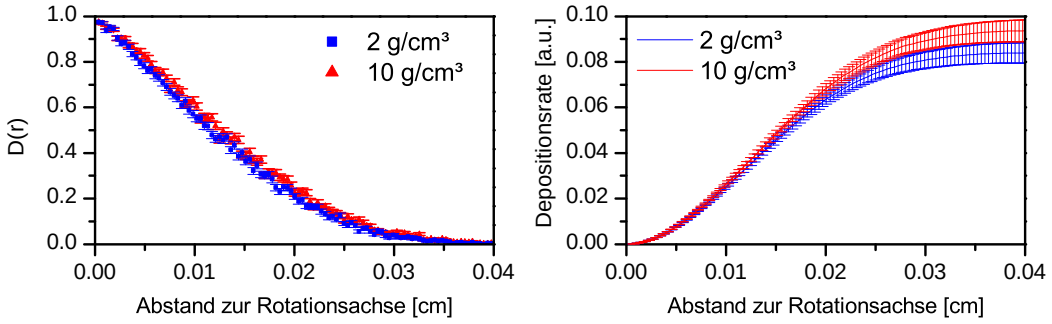


Abbildung 58: Die Depositionswahrscheinlichkeit für sphärische 50 nm Partikel mit einer Dichte von 2 g/cm^3 und 10 g/cm^3 (links). Die Verläufe sind nahezu identisch. Entsprechend gering ist der Unterschied der sich daraus ergebenden Depositionsraten (rechts). Der Einfluss der Dichte auf die Depositionseffizienz nicht agglomerierter Nanopartikel kann daher in einem Bereich zwischen 1 g/cm^3 und 10 g/cm^3 weitgehend vernachlässigt werden.

abgeschätzt werden. Aus einem Fit (Abbildung 59) folgen die Konstanten C = -905.207, D = -9.71·10^{-5} m^3/kg und m$_0$ = 1015.43. Mit Gleichung 36, 37 und der in Abschnitt 5.4.1 für kleine Partikel diskutierten, weitgehend dichteunabhängigen Depositionseffizienz, ergibt sich der Verlauf für den gesamten Größenbereich annähernd aus

$$W \approx A\left(\frac{d_p}{d_0}\right)^B + \frac{2R'^2 d_p^2}{R^2} = A\left(\frac{d_p}{d_0}\right)^B + \frac{2\left(Ce^{D\rho} + m_0\right)^2 d_p^2}{R^2} \tag{38}$$

mit A = 8.81·10^{-13}, B = -1.33618 und d$_0$ = 1 m.

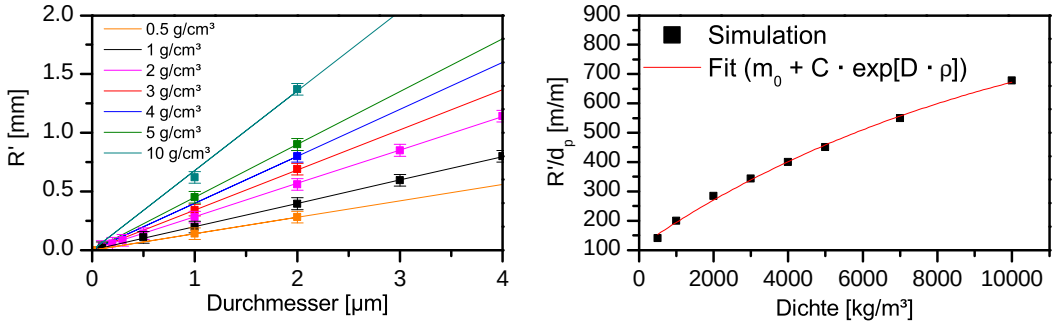


Abbildung 59: Einfluss der Partikeldichte auf den Verlauf von R' in Abhängigkeit des Durchmessers sphärischer Partikel (links). Die in Abschnitt 5.4.1 beschriebene lineare Abhängigkeit bleibt weitgehend erhalten. Erst für Dichten von mehr als 10 g/cm^3 treten deutliche Abweichungen bereits bei Durchmessern von weniger als 2 μm auf. Unterhalb dieser Dichte folgt R' annähernd einer exponentiellen Funktion der Partikeldichte (rechts).

Gleichung 38 gilt allerdings nur für den Fall einer linearen Beziehung zwischen R' und der Partikelgröße. Der kritische Durchmesser, bis zu dem der lineare Verlauf angenommen werden kann, nimmt dabei mit zunehmender Dichte ab. Aus Abbildung 59 erkennt man für eine Dichte von 10 g/cm^3 bereits eine leichte Abweichung bei einem Durchmesser von 2 μm. Für noch größere Dichten ergeben

sich aus Gleichung 38 daher nur noch sehr fehlerbehaftete Werte der Depositionseffizienz.

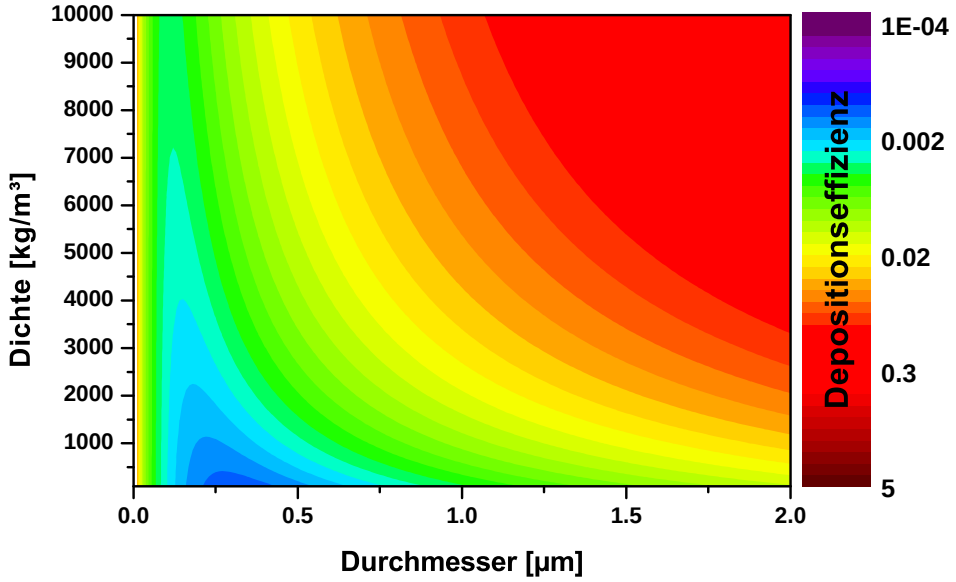


Abbildung 60: Depositionseffizienz sphärischer Partikel in Abhängigkeit des Durchmessers und der Dichte nach Gleichung 38. In dem für Nanopartikel bzw. Partikelagglomerate relevanten Größenbereich der in dieser Arbeit untersuchten Metalloxide ergeben sich Depositionseffizienzen zwischen 0.1% und 1%. Nur für Durchmesser im μm Bereich und hohe Partikeldichten können Werte zwischen 1% und 100% erreicht werden.

5.4.3 Depositionseffizienz fraktalähnlicher Agglomerate

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Depositionseffizienz ist die Struktur der Partikel. Die bisher gezeigten Simulationsergebnisse gelten nur für sphärische Partikel. Wie in den Abschnitten 3.1, 5.1 und 5.2 diskutiert wurde, neigen Nanopartikel aber zur Bildung von Agglomeraten fraktalähnlicher, nicht sphärischer, Gestalt. Gleichung 38 kann daher nur für die beiden Grenzfälle sehr großer und kleiner Partikel unter Anwendung des entsprechenden Äquivalenzdurchmessers verwendet werden. Da das Verhalten sehr kleiner Partikel im wesentlichen durch die Mobilität bestimmt wird, ist in diesem Bereich der mobilitätsäquivalente Durchmesser anzuwenden. Für sehr große Partikel wird dagegen die Deposition durch die Schwerkraft dominiert, so dass hier der stokesäquivalente Durchmesser einzusetzen ist. Zwischen beiden Grenzfällen, im Bereich des Minimums, ist mit keinem der beiden Äquivalenzdurchmesser eine Aussage zur Depositionseffizienz über Gleichung 60 möglich. Aus der Simulation mit Gleichung 27 ergibt sich der in Abbildung 61 dargestellte Verlauf in Abhängigkeit des mobilitätsäquivalenten Durchmessers. Erwartungsgemäß bleibt der Grenzfall kleiner Agglomerate weitgehend unbeeinflusst von der fraktalähnlichen Struktur der Partikel. 100 nm große Agglomerate mit einer fraktalen Dimension von 1.8 und aus 15 nm großen

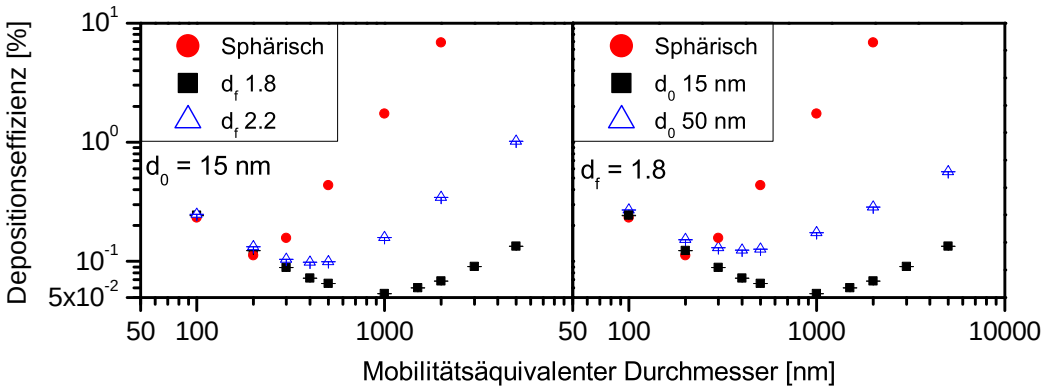


Abbildung 61: Depositionseffizienz fraktalähnlicher Agglomerate einer Dichte von 2 g/cm^3 in Abhängigkeit der fraktalen Dimension (links) und Primärpartikelgröße (rechts). Mit abnehmender fraktaler Dimension und Primärpartikelgröße sinkt ebenfalls die Partikelmasse und somit die Depositionseffizienz für Partikel großer mobilitätsäquivalenter Durchmesser. Für kleine Agglomerate ist lediglich die Mobilität ausschlaggebend für die Depositionseffizienz, so dass die Abweichungen unterhalb von 200 nm weniger als 5% vom Wert sphärischer Partikel betragen.

Primärpartikeln der Dichte 2 g/cm^3 weichen lediglich um 4% von dem Wert eines sphärischen Partikels ab. Erst für Partikel mit Durchmessern von mehr als 200 nm zeigen sich deutlichere Abweichungen. Dabei ergibt sich eine geringere Depositionseffizienz der fraktalähnlichen Agglomerate gegenüber sphärischen Partikeln gleicher Mobilität. Die Abweichungen von sphärischen Partikeln steigen mit einer abnehmenden fraktalen Dimension und Primärpartikelgröße aufgrund der damit verbundenen Abnahme der Partikelmasse. Da sich der mobilitäts- und stokesäquivalente Durchmesser nicht linear proportional zueinander verhalten, ist eine Beschreibung der Depositionseffizienz mit einer quadratischen Funktion des mobilitätsäquivalenten Durchmessers, wie im Fall sphärischer Partikel, nicht möglich.

5.4.4 Experimentelle Validierung der Simulation

Zur experimentellen Bestimmung der Depositionseffizienz wurden die in Tabelle 2 genannten kommerziellen Partikelsuspensionen verwendet. Wie in Abschnitt 5.1 gezeigt wurde, weisen diese Partikel nahezu monodisperse Größenverteilungen mit sehr geringen Agglomeratanteilen auf (Abbildung 28). Des Weiteren ist auf den TEM Aufnahmen eine weitgehend sphärische Gestalt der Partikel zu erkennen (Abbildung 63), so dass Gleichung 60 zur Bestimmung der Depositionseffizienz angewendet werden kann. Aufgrund der geringen geometrischen Standardabweichungen unterscheiden sich die Anzahlgrößenverteilungen der deponierten Partikel nur schwach von denen im Aerosol am Eingang der Expositionskammer (Abbildung 62). Die dennoch vorhandenen Unterschiede sind hauptsächlich eine Folge der geringen Anzahl deponierter Partikel, weshalb ausreichende Partikelzahlen nur mit kleinen Vergrößerungen am TEM ausgewertet werden konnten.

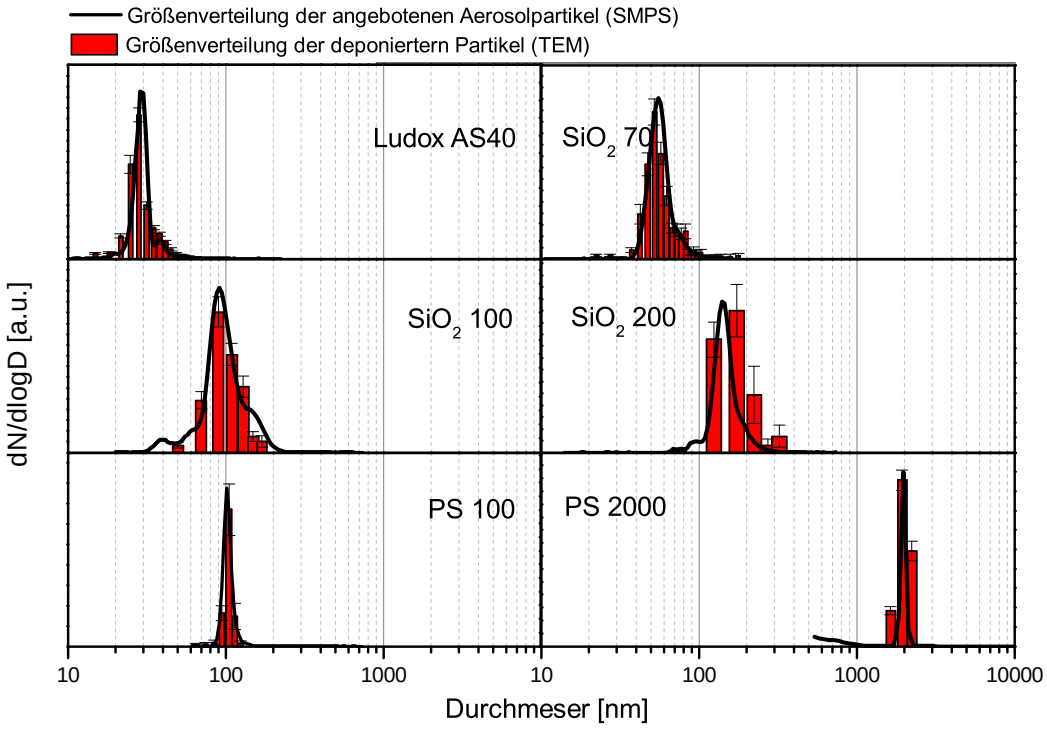


Abbildung 62: Vergleich der Anzahlgrößenverteilungen der luftgetragenen und auf den Transwells deponierten Partikel. Die geringfügigen Abweichungen resultieren im Wesentlichen aus der geringen Beladungsdichte und daher kleinen Vergrößerung der TEM Aufnahmen. Insbesondere die 200 nm Partikel weisen zusätzlich zur geringen Depositionseffizienz eine niedrige Konzentration im Aerosol auf und erschweren somit eine genaue Größenbestimmung.

Damit verbunden sind eine ungenauere Fokussierung, niedrigere Auflösung und ein schlechterer Kontrast der Partikel gegenüber dem Hintergrund. Die Fehler in der Größenbestimmung nehmen jedoch keinen Einfluss auf die deponierte Beladungsdichte. Es wurde daher die modale Größe der Aerosolpartikel mit den Halbwertsbreiten der Anzahlgrößenverteilungen als Unsicherheit angenommen. Für die annähernd lognormalverteilten Größenverteilungen beinhaltet dieser Bereich zwischen 60% und 70% aller Partikel. Die Beladungsdichten zeigen für den Fall rein diffusiver und gravitativer Abscheidung in dem untersuchten Partikelgrößenbereich nur eine geringfügige Abhängigkeit vom Radius des Transwells. Die Unterschiede liegen jedoch innerhalb der Unsicherheiten der gemessenen Beladungsdichten, so dass eine mittlerer Wert zur Berechnung der Depositionseffizienz verwendet wurde. Gleichung 16 vereinfacht sich damit auf das Verhältnis aus dem Produkt der mittleren Beladungsdichte n und der Transwellfläche zu dem Gesamtpartikelangebot.

$$W = \frac{\pi R^2 n}{N_{ges}} \tag{39}$$

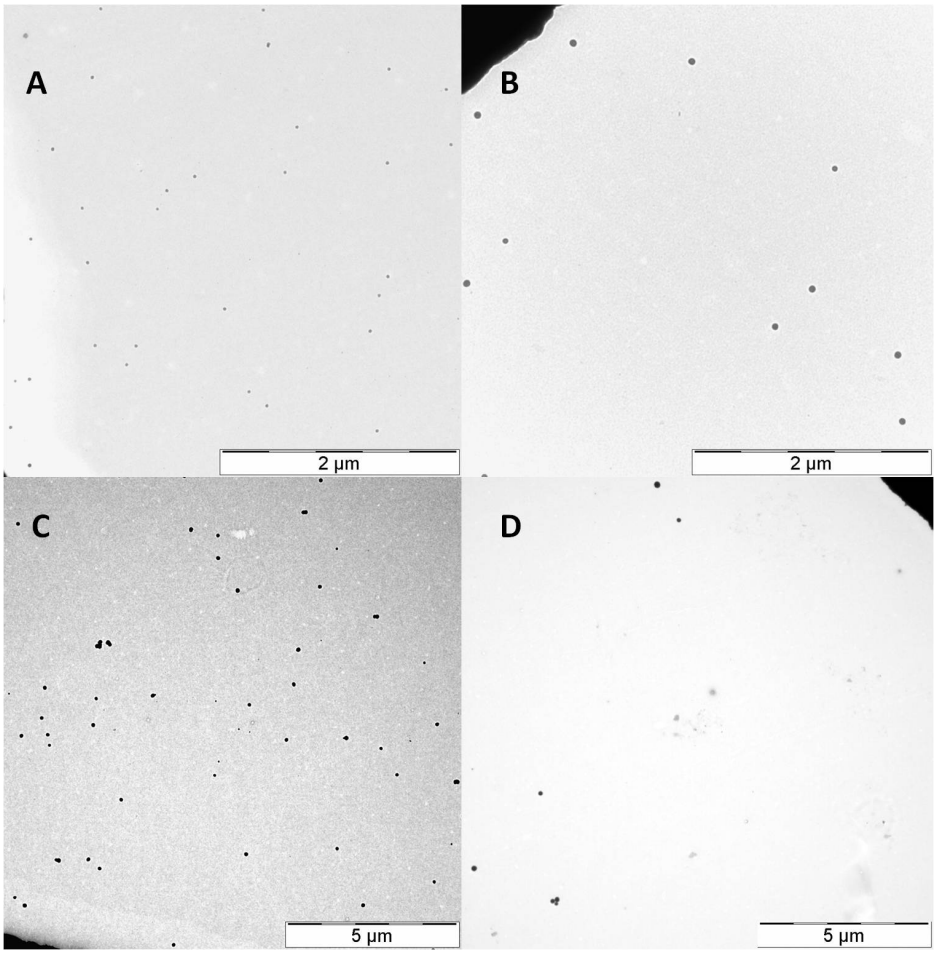


Abbildung 63: Typische TEM Aufnahmen deponierter Ludox AS 40 (**A**), SiO_2 70 (**B**), SiO_2 100 (**C**) und SiO_2 200 (**D**) Partikel zur Bestimmung der Beladungsdichte und den in Abbildung 62 gezeigten Größenverteilungen. Aufgrund der geringen Depositionseffizienz und Partikelkonzentration im Aerosol ist für die SiO_2 100 und SiO_2 200 Partikel eine niedrigere Vergrößerung notwendig um mehrere Partikel mit einem Bild zu erfassen. Abgesehen von kleinen Agglomeraten weisen alle Partikel eine weitgehend sphärische Gestalt auf und ermöglichen die Validierung von Gleichung 38

Daraus ergeben sich die in Tabelle 6 und Abbildung 64 dargestellten Depositionseffizienzen für die verwendeten SiO_2 und Polystyrolpartikelsuspensionen. Die experimentellen Werte zeigen innerhalb der ermittelten Unsicherheiten eine weitgehend gute Übereinstimmung mit den Werten aus der Simulation. Lediglich für die PS 100 Partikel zeigt sich eine deutlich größere Abweichung vom simulierten Wert.
Deren Depositionseffizienz geht allerdings bisher aus einer einzigen Messung hervor, so dass ein systematischer Fehler bei der Versuchsdurchführung als Ursache der Abweichung nicht ausgeschlossen werden kann. Nicht berücksichtigt bei der Angabe der Unsicherheiten wurden die vom APS und CPC gemachten Fehler zur Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung und Partikelkonzentration im Ae-

Partikel	Partikelangebot [#]	Beladungsdichte [#/cm²]	Depositionseffizienz [%]	
			Experiment	Simulation
Ludox AS40	$3.35 \cdot 10^{10}$	$(1.2 \pm 0.3) \cdot 10^{8}$	1.7 ± 0.5	0.99 ± 0.05
SiO_2 70	$8 \cdot 10^{9}$	$(8 \pm 1) \cdot 10^{6}$	0.45 ± 0.06	0.52 ± 0.03
SiO_2 100	$3.98 \cdot 10^{10}$	$(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^{7}$	0.17 ± 0.03	0.23 ± 0.01
SiO_2 200	$4.64 \cdot 10^{9}$	$(1.7 \pm 0.4) \cdot 10^{6}$	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.01
SiO_2 1600	$4.88 \cdot 10^{6}$	$(45 \pm 8) \cdot 10^{3}$	4 ± 1	4.3 ± 0.2
PS 100	$2.5 \cdot 10^{9}$	$(4 \pm 1) \cdot 10^{6}$	0.7 ± 0.2	0.23 ± 0.01
PS 2000	$1.12 \cdot 10^{6}$	5877	2.5 ± 0.3	3.4 ± 0.9

Tabelle 6: Die zur Bestimmung der Depositionseffizienz angebotenen Partikelmenge und deponierte Beladungsdichte, sowie die daraus resultierenden Depositionseffizienzen aus jeweils einem exemplarischen Experiment. Im Rahmen der Unsicherheiten stimmen Experiment und Simulation weitgehend überein.

rosol. Unter Annahme der Präzision beider Geräte als Unsicherheit stellen sie jedoch eine vernachlässigbare Fehlerquelle gegenüber der Auswertung der TEM Aufnahmen dar. Für die Expositionskammer kann somit für Polystyrolpartikel von Depositionseffizienzen zwischen 0.1% und 0.5% bei Durchmessern zwischen 50 nm und 0.5 μm ausgegangen werden. Diese sind nur geringfügig niedriger als die berichteten Werte zwischen 0.7% und 2% anderer auf Diffusion und Gravitation beruhender Expositionssysteme [Bitterle et al., 2006], [Tippe et al., 2002], [Desantes et al., 2006], [Paur et al., 2011].

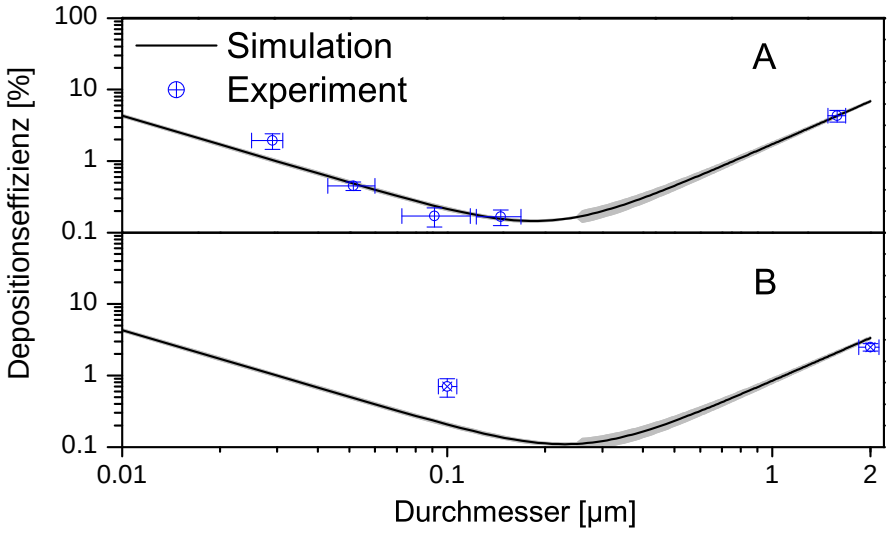


Abbildung 64: Verlauf der Depositionseffizienz für Partikel der Dichte 2 g/cm^3 (**A**) und 1 g/cm^3 (**B**). Die experimentell bestimmten Werte stimmen weitgehend mit dem aus der Simulation erhaltenen Verlauf der Depositionseffizienz überein.

5.5 Depositionseffizienz mit Elektrode

Die in Abschnitt 5.4 ermittelten Depositionseffizienzen limitieren die maximal möglichen Depositionsraten. Da die maximale Aerosolkonzentration durch den verwendeten Aerosolgenerator oder die Koagulationsrate in der Zuleitung begrenzt ist (Abschnitt 5.1), können die Depositionsraten und deponierten Dosen nur durch eine Verbesserung der Depositionseffizienz erhöht werden. Der theoretische Verlauf des dafür mit der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Elektrode erzeugten elektrostatischen Feldes ist in Abbildung 65 dargestellt. Bei einer angelegten Spannung von 1 kV weist es bis zum Rand der Gegenelektrode mit einem Abstand zwischen 0 und 10 mm zur Rotationsachse einen nahezu homogenen Verlauf auf. Lediglich im Bereich zwischen dem Ende der Gegenelektrode und dem Rand des

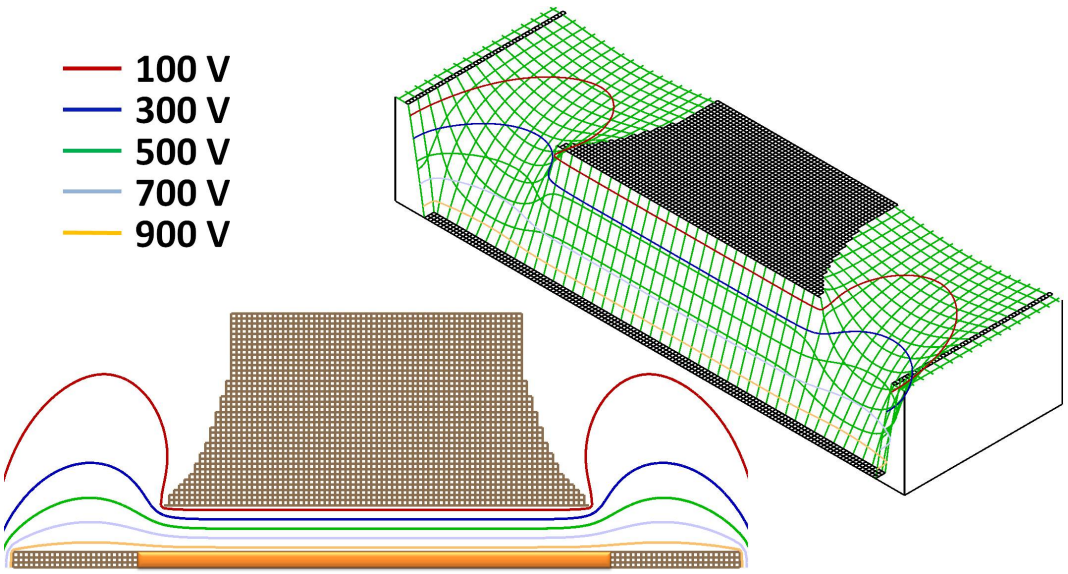


Abbildung 65: Darstellung des Potentialverlaufs innerhalb der Expositionskammer bei einer Spannung von 1 kV aus einer Simulation mit SimIon ohne Berücksichtigung der nicht leitfähigen Komponenten (Abschnitt 4.2.1). Zwischen der Gegenelektrode und der Zelloberfläche ist das elektrische Feld nahezu homogenen. Lediglich der äußerste Rand der orange markierten Zellregion mit weniger als 30% der Gesamtzellzahl befindet sich im inhomogenen Bereich des Feldes.

Transwells treten stärkere Inhomogenitäten auf. Der Anteil der Zellen in diesem Bereich beträgt 30%. Die senkrecht zur Zelloberfläche zeigende Komponente der elektrischen Feldstärke fällt in dieser Zone von 500 V/mm auf minimal 190 V/mm am äußersten Rand des Transwells. Gleichzeitig ergibt sich dort eine radiale Komponente der Feldstärke von maximal 500 V/mm auf Höhe der Gegenelektrode und 10 V/mm auf der Höhe der Zellen (Abbildung 66). Als Folge dieser starken radialen Komponente am Rand der Gegenelektrode scheidet sich ein Großteil der entsprechend geladenen, aber nicht auf der Zelloberfläche deponierten, Partikel an der Transwellwand ab. Gleichzeitig bewirkt die radiale Komponente insbesondere für kleine Partikel eine homogener verteilte Beladungsdichte. Abbildung 67 zeigt

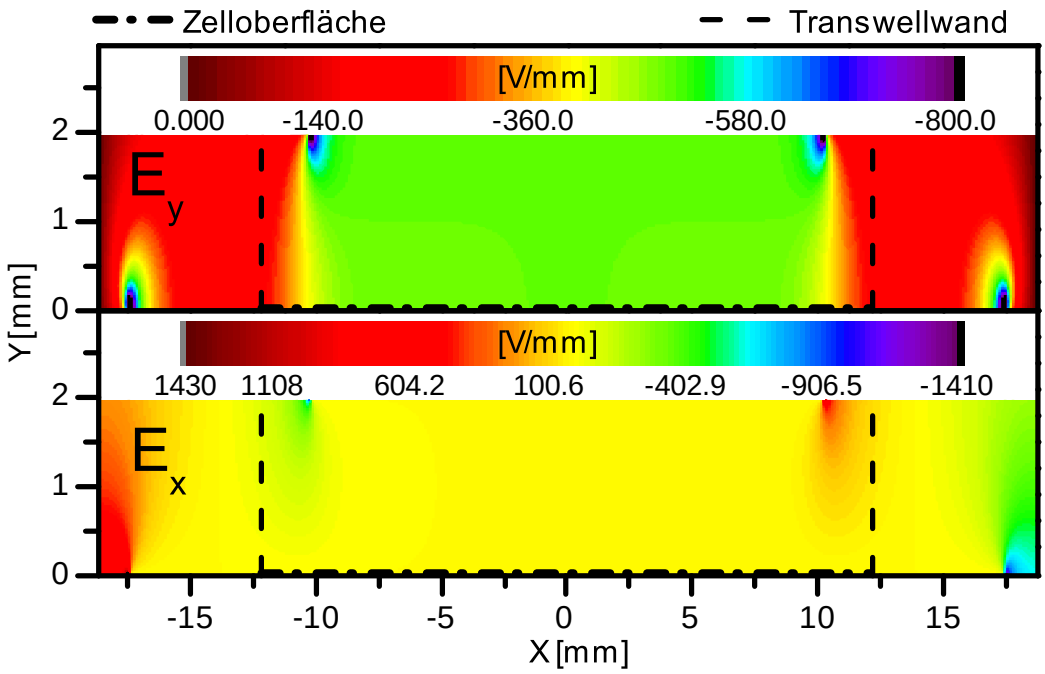


Abbildung 66: Komponenten der elektrischen Feldstärke in der Expositionskammer bei einer angelegten Spannung von 1 kV. E_y ist die Komponente senkrecht zur Zelloberfläche die eine zusätzliche Kraftkomponente in Richtung der Zellen entsprechend geladener Partikel verursacht und somit eine erhöhte Depositionseffizienz bewirkt. Innerhalb des inhomogenen Feldbereichs zeigt sich zusätzlich eine deutliche x bzw. radiale Komponente E_x der elektrischen Feldstärke welche eine homogenere Verteilung der Beladungsdichte auf der Transwelloberfläche erzeugt.

die simulierte Verteilung der Beladungsdichte auf der Transwelloberfläche für zwei verschiedene Partikeldurchmesser unter Annahme eines homogenen elektrischen Feldes einer Stärke von 500 V/mm. Die Trajektorien geladener Partikel werden bei dieser Feldstärke nahezu ausschliesslich vom elektrischen Feld vorgegeben. Der Versatz geladener 50 nm Partikel in radialer Richtung aufgrund der Strömung ist nur sehr gering, so dass auf den Zellen im Bereich zwischen 8.5 mm und 12.21 mm ohne radiale Komponente des elektrischen Feldes keine geladenen Partikel deponieren dürften. Im Bereich zwischen 0 mm und 8.5 mm wird der Verlauf dagegen durch die am Eingang der Expositionskammer angenommene Hagen Poisuille Geschwindigkeitsverteilung bestimmt und verursacht eine nach außen abnehmende Beladungsdichte. Je nach Polarität der angelegten Spannung ergibt sich damit aus der Simulation für kleine geladene Partikel entgegengesetzter Polarität eine Depositionseffizienz von 100%. Erst mit größeren Durchmessern nimmt die Depositionseffizienz geladener Partikel aufgrund der zunehmenden Reibungskraft durch die Strömung wieder ab. Gleichzeitig bewirkt der stärkere Versatz großer Partikel eine homogenere Verteilung der Beladungsdichte bei gleicher Spannung. Qualitativ wird diese aus der vereinfachten Annahme eines homogenen elektrischen Feldes gemachte Aussage durch die experimentell bestimmten Beladungs-

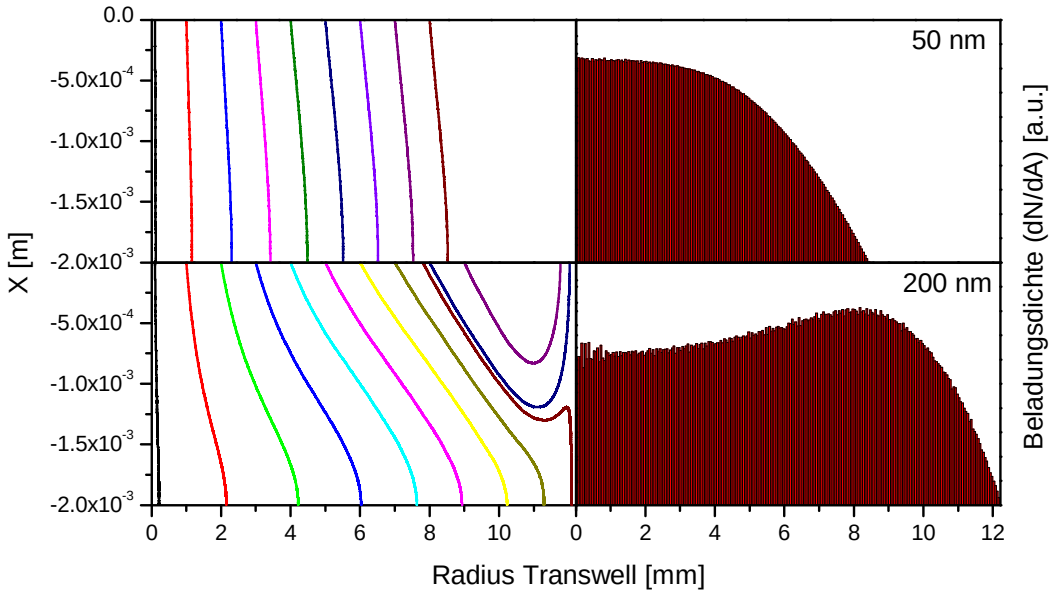


Abbildung 67: Die Trajektorien innerhalb der Expositionskammer einfach geladener Partikel einer Dichte von 2 g/cm^3 und einem homogenen elektrischen Feld der Stärke 500 V/mm senkrecht zur Zelloberfläche. Der radiale Versatz der 50 nm Partikel (oben links) aufgrund der Strömung ist sehr klein, so dass im Bereich zwischen 8.5 mm und 12.21 mm lediglich ungeladene Partikel deponieren können. Entsprechend fällt die für einfach geladene Partikel simulierte Beladungsdichte (oben rechts) bis zu diesem Abstand von der Symmetrieachse auf 0 ab. Die Depositionseffizienz der geladenen 50 nm Partikel entgegengesetzter Polarität gegenüber der angelegten Spannung beträgt somit 100%. Für die größeren 200 nm Partikel bewirkt die Strömung bereits einen stärkeren Versatz in radialer Richtung (unten links), so dass deren Beladungsdichte erst am äußersten Rand des Transwells einbricht (unten rechts). Einige Trajektorien einfach geladener 200 nm Partikel führen bereits aus der Expositionskammer raus, so dass mit zunehmender Partikelgröße von einer abnehmenden Depositionseffizienz geladener Partikel ausgegangen werden kann.

dichten bestätigt. Während die kleinen SiO_2 50 Partikel eine stark nach außen abfallende Beladungsdichte bei einer Spannung von 1 kV/mm aufweisen, ergibt sich für die größeren SiO_2 100 und SiO_2 200 Partikel eine annähernd homogene Beladungsdichte (Abbildung 68). Quantitativ weicht das Ergebnis jedoch stark von der Simulation ab. Einerseits können auch für sehr kleine Durchmesser in Bereichen innerhalb derer laut Simulation keine geladenen Partikel mehr deponieren dürfen noch deutlich höhere Beladungsdichten beobachtet werden als sich aus der diffusiven Abscheidung ungeladener Partikel ergeben dürfte. Andererseits ergibt sich bereits für die SiO_2 100 und SiO_2 200 Partikel eine weitgehend homogen verteilte Beladungsdichte, obwohl die Simulation selbst für 200 nm Partikel noch eine am Rand des Transwells stark abfallende Beladungsdichte aufweist. Des Weiteren liegen die Messwerte für die Depositionseffizienz deutlich unterhalb der simulierten Werte. Der wesentliche Grund für die Unterschiede sind die für die Simulation nicht berücksichtigten radialen Komponenten des elektrischen Feldes. Eine genauere Simulation der Depositionseffizienz erfordert daher die Einbindung beider Feldkomponenten. Für eine genaue Beschreibung der Feldstärkekomponenten ist allerdings auch die Berücksichtigung der nicht leitfähigen Wand der

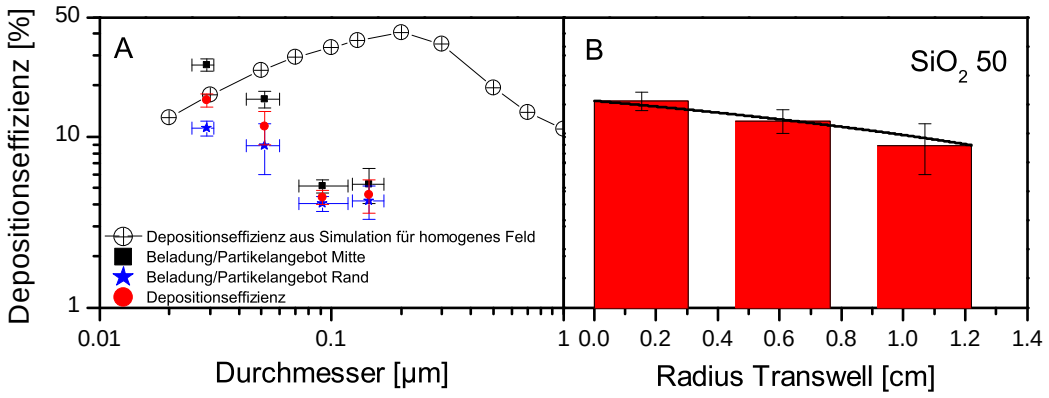


Abbildung 68: (**A**) Die sich aus den Beladungsdichten am Rand (blau) und in der Mitte (rot) des Transwells ergebenden Depositionseffizienzen bei einer negativen Spannung von 1 kV für SiO_2 Partikel verschiedener Größe, sowie die sich daraus ergebende gesamte Depositionseffizienz (rot) nach Gleichung 40. Im Vergleich zu den simulierten Werten für ein homogenes elektrisches Feld von 500 V/mm ergeben sich deutlich geringere Depositionseffizienzen. Mit Werten zwischen 4% und 16% deponiert gegenüber der rein diffusiven Abscheidung dennoch ein wesentlich größerer Anteil aller Partikel. (**B**) Experimentell bestimmte Verteilung der Beladungsdichte bzw. der sich daraus ergebenden Depositionseffizienzen an unterschiedlichen Positionen des Transwells aus 3 gleichmäßig verteilten TEM Netzen für SiO_2 50 Partikel (rote Balken). Man erkennt eine klar abnehmende Beladungsdichte mit zunehmendem Abstand zur Rotationsachse. Zur Berechnung der gesamten Depositionseffizienz wurde der Verlauf der Beladungsdichte durch eine lineare Interpolation der Werte am Rand und dem Zentrum des Transwells beschrieben (schwarze Gerade).

Transwellschale und des isolierenden Nährmediumbehälters erforderlich. Obwohl eine quantitativ korrekte Simulation für die elektrostatische Abscheidung noch nicht durchgeführt wurde, ist bereits aus den Experimenten eine deutlich größere Depositionseffizienz gegenüber rein diffusiver und schwerkraft bedingter Abscheidung zu erkennen. Aufgrund der für kleine Partikel erwähnten inhomogenen Verteilung der Beladungsdichte war Gleichung 16 zur experimentellen Bestimung der Depositionseffizienz erforderlich. Die Intervallbreite bei der Messung der Beladungsdichte wurde allerdings begrenzt durch die Größe der TEM Netze mit einem Durchmesser von 3.05 mm, so dass nur ein entsprechend grober Verlauf der Beladungsdichte bestimmt werden konnte. Zur Abschätzung der gesamten Depositionseffizienz wurde daher vereinfacht eine lineare Interpolation zwischen den am Rand und im Zentrum der Transwells gemessenen Beladungsdichten verwendet. Die gesamte Depositionseffizienz entspricht damit

$$W = \frac{2\pi R^2 \left(\frac{1}{3} n_{Rand} + \frac{1}{6} n_{Mitte}\right)}{N_{ges}}. \tag{40}$$

Im Partikelgrößenbereich zwischen 100 nm und 200 nm ergibt sich so gegenüber den in Abschnitt 5.4 beschriebenen Depositionseffizienzen für SiO_2 100 und SiO_2 200 Partikel eine um einen Faktor 26 größere Depositionseffizienz. Gleichzeitig ist die Beladungsdichte für Partikel dieser Größe bei einer Spannung von 1 kV verhältnismäßig homogen und variiert nur um 11% des Mittlwertes. Um einen ähnlichen Faktor erhöhte Depositionseffizienzen mit Werten von $(11 \pm 3)\%$ und

(16 ± 2)% weisen die SiO_2 50 und Ludox AS 40 Partikel auf. Hier sind allerdings deutlich stärkere Inhomogenitäten der Beladungsdichte mit Abweichungen von 30% und 40% vom Mittelwert zu beobachten. Um derartige Inhomogenitäten der Beladungsdichte auf dem Transwell zu vermeiden könnten niedrigere Spannungen eingesetzt werden, was jedoch gleichzeitig mit einer Abnahme der Depositionseffizienz einhergeht.

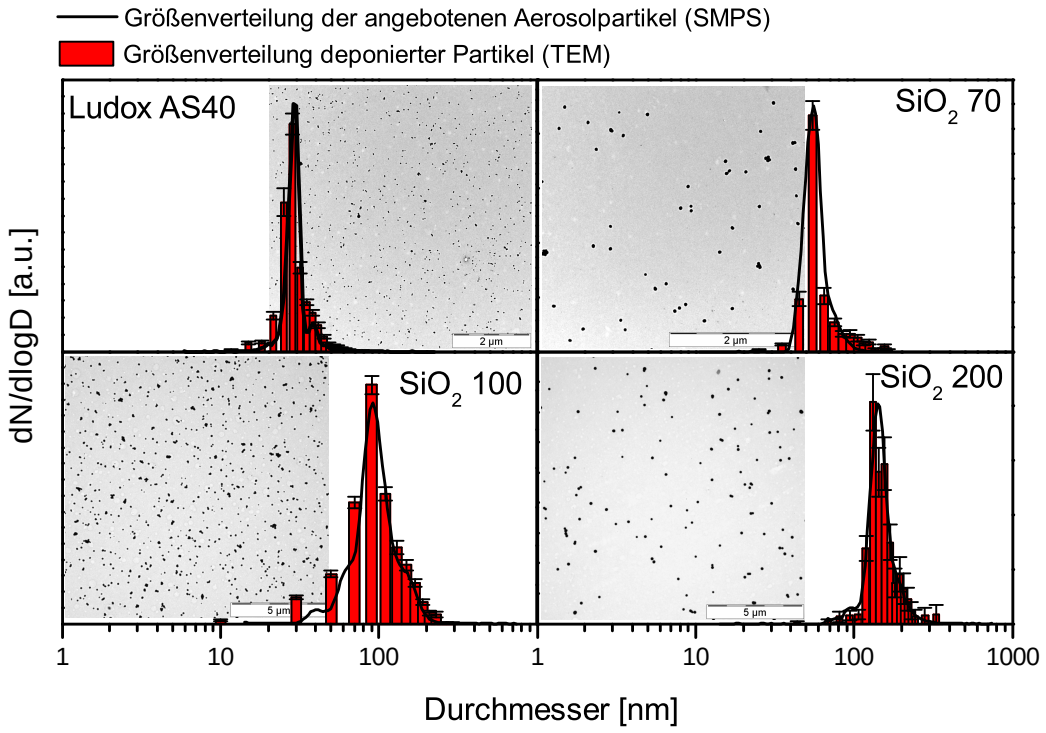


Abbildung 69: Die mit Elektrode deponierten Größenverteilungen im Vergleich zu den angebotenen Aerosolen. Die TEM Aufnahmen zeigen eine deutlich höhere Beladungsdichte gegenüber den Versuchen ohne elektrostatisches Feld (Vgl. Abbildung 63).

5.6 Zytotoxische und Inflammatorische Wirkung verschiedener Nanopartikel

Nach Paur et al. [2011] ergibt sich mit einer maximalen Nanopartikelbelastung von 5 mg/m^3 bzw. 5·10^6 Partikeln/cm^3 eine maximale Depositionsrate in der menschlichen Lunge von 300 $\frac{Partikeln}{Zelle\ h}$ bzw. 5·10^{-3} $\frac{\mu g}{cm^2 h}$. Wie aus den Abschnitten 5.4 und 5.5 hervorgeht, können mit der Expositionskammer sogar deutlich höhere Depositionsraten erreicht werden, so dass den Zellen die realistische Dosis einer akut exponierten Person innerhalb kurzer Zeit verabreicht werden kann (Abbildung 70). Über die Depositionsraten alleine kann jedoch keine Aussage über die

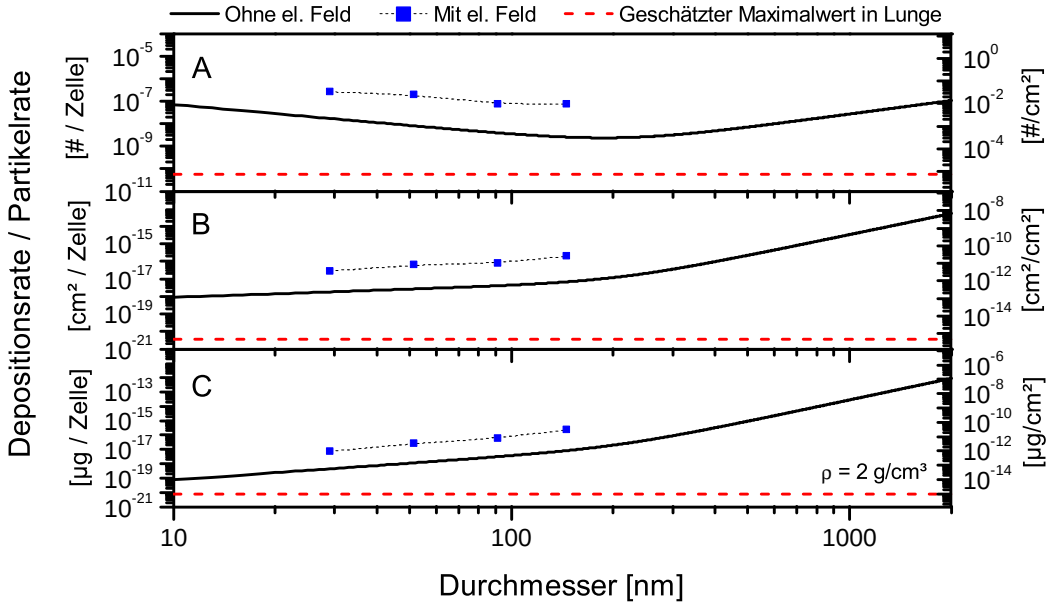


Abbildung 70: Die auf das Partikelangebot bezogenen Anzahl- (**A**), Oberflächen- (**B**) und Massendepositionsraten (**C**) in der Expositionskammer mit den in Abschnitt 5.4 und 5.5 ermittelten Depositionseffizienzen für sphärische Partikel der Dichte 2 g/cm^3. Es ergeben sich deutlich höhere Werte gegenüber den von Paur et al. [2011] angegebenen Maximalwerten in einer Lunge.

biologische Wirkung getroffen werden. Stattdessen ist die Bestimmung der insgesamt deponierten Partikeldosis erforderlich. Im folgenden Abschnitt werden daher die durchgeführten Zellexpositionen (Abschnitt 4.3) hinsichtlich ihrer verabreichten Dosen charakterisiert und die daraus resultierenden Zellantworten mit denen aus Submersexperimenten hinsichtlich ihrer Art und Stärke verglichen. Alle gezeigten Ergebnisse der zytotoxischen und inflammatorischen Reaktion der Zellen auf die Partikelexpositionen wurden von A. Panas durchgeführt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Eine zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse aller Expositionsversuche gibt Tabelle 7.

5.6.1 SiO_2 Partikel

Wie in Abschnitt 4.3 beschrieben wurde, sind verschiedene Expositionsversuche mit den Aerosil200, SiO_2 70 und SiO_2 MWP Partikeln durchgeführt worden. Als gut charakterisierbares Material wurden die SiO_2 70 Partikel mit dem Elektrospray versprüht und die Exposition unter Verwendung eines elektrostatischen Feldes bei einer Elektrodenspannung von 1 kV, durchgeführt. Aus den TEM Aufnahmen ergibt sich eine insgesamt deponierte Anzahldosis von $(6 \pm 2)\cdot10^8$ Partikeln/cm^2 bzw. $(5 \pm 2)\cdot10^3$ Partikel/Zelle. Der Vergleich mit dem in Abbildung 18 dargestellten Gesamtpartikelangebot ergibt innerhalb der Unsicherheit eine gute Übereinstimmung mit der in Abschnitt 5.5 bestimmten Depositionseffizienz. Aufgrund des sehr geringen Agglomeratanteils von 8% (Abschnitt 5.1.1) kann die Primärpartikelzahl im Rahmen der Unsicherheit nicht von der Gesamtpartikelzahl unterschieden werden. Aus der annähernd sphärischen Struktur der Partikel ergibt sich damit eine Massendosis von (0.14 ± 0.05) μg/cm^2 sowie Oberflächendosis von (0.08 ± 0.03)cm^2/cm^2. Die Dosen entsprechen damit ungefähr den von Paur et al. [2011] angegebenen maximalen Tagesdosen einer bei Aerosolkonzentrationen von $5\cdot10^6$ Partikeln/cm^3 exponierten Person. Trotz dieser akut hohen Konzentrationen konnte keine LDH Freisetzung der A549 Zellen gegenüber den Filterkontrollen beobachtet werden(Abbildung 71). Ebenfalls keine LDH Frei-

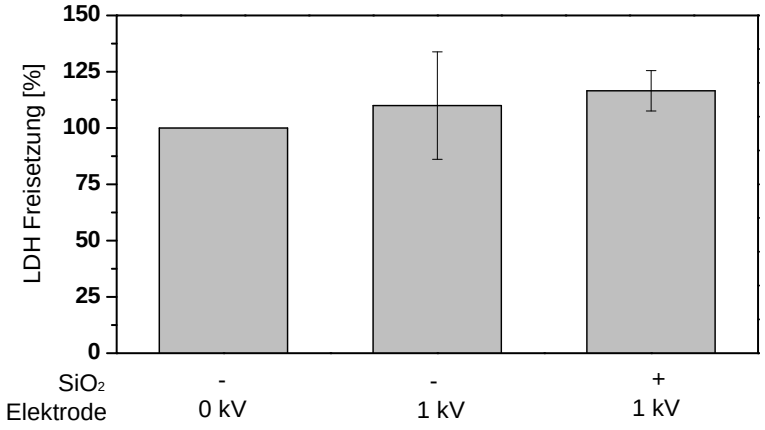


Abbildung 71: Zytotoxische Wirkung nach einer 5 h Behandlung mit SiO_2 70 Monomeren. Die Werte für die LDH-Freisetzung wurden auf die mit dem gefilterten Aerosol ohne Elektrode exponierte Kontrolle bezogen. Die Exposition mit einer Gesamtdosis von $(5 \pm 2)\cdot10^3$ Partikeln/Zelle zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die zytotoxische Reaktion der A549 Zellen gegenüber den Kontrollen mit und ohne Elektrode.

setzung und auch keine Abnahme der metabolischen Aktivität konnte nach der Exposition der A549 Zellen mit den im Mikrowellenplasma synthetisierten (SiO_2 MWP) Partikeln beobachtet werden. Im Gegensatz zu dem SiO_2 70 Aerosol aus dem Elektrospray wurde in Abschnitt 5.1.3 ein wesentlich größerer Agglomeratanteil für die SiO_2 MWP Partikel von mindestens 88% bestimmt. Obwohl diese zu

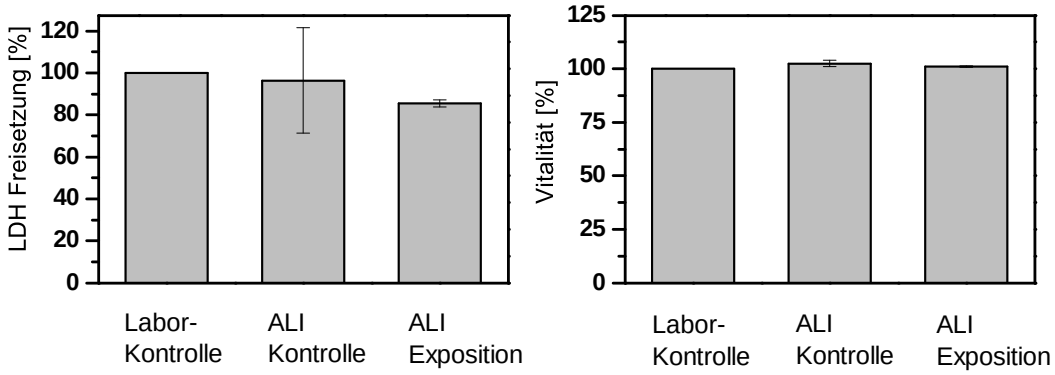


Abbildung 72: Zytotoxische Wirkung nach einer 5 h Behandlung mit SiO_2 MWP Partikeln. Sowohl die Werte der Filterkontrollen, als auch der exponierten Zellen für die LDH-Freisetzung wurden auf Labortischkontrollen normiert. Die Exposition mit einer Gesamtdosis von 231 Partikeln/Zelle lässt keine verstärkte zytotoxische Reaktion der A549 Zellen gegenüber den nicht exponierten Kontrollen erkennen.

großen Teilen aus mehr als 5 Monomeren bestehen und eine fraktalähnliche Struktur aufweisen, sind die Agglomerate mit einem maximalen mobilitätsäquivalenten Durchmesser von 100 nm klein genug um Gleichung 38 zur Dosisbestimmung zu verwenden. Aus dem gesamten Partikelangebot (Abbildung 20) ergibt sich damit eine deponierte Anzahldosis von $(3 \pm 0.1) \cdot 10^7$ Partikeln/cm^2 bzw. (231 ± 8) Partikeln/Zelle. Die Abschätzung der Massendosis mit dem fraktalen Formalismus liefert aus den Anzahlgrößenverteilungen der deponierten Partikel eine Massendosis von (1 ± 0.2) ng/cm^2. Mit der in Abschnitt 5.1.3 bestimmten geometrischen Standardabweichung der Primärpartikel ergibt sich daraus schliesslich eine Oberflächendosis von 0.002 cm^2/cm^2. Aufgrund des geringeren Partikelangebots, der kleinen Agglomeratgröße und niedrigen Depositionseffizienz ohne Elektrode sind die deponierten Dosiswerte wesentlich geringer gegenüber den SiO_2 70 Partikeln aus dem Elektrospray. Lediglich die Primärpartikeldosis liegt aufgrund der kleineren Monomerdurchmesser (Abbildung 35) mit $(3 \pm 0.1) \cdot 10^8$ Partikeln/cm^2 in der gleichen Größenordnung. An diesem Beispiel erkennt man bereits ein häufig nicht berücksichtigtes Problem in der Dosisangabe. Während die maximal mögliche Tagesdosis an isolierten Primärpartikeln bereits überschritten wird, liegt die Agglomeratdosis in der Größenordnung der maximalen Stundendosis. Die Angaben von Paur et al. [2011] sind daher immer auf die Agglomeratdosis zu beziehen und nicht als obere Grenze für die Exposition gegenüber isolierten Monomeren zu verstehen, denn auch unrealistisch erscheinende Primärpartikeldosen sind vorstellbar bei einer Exposition gegenüber Agglomeraten aus entsprechend kleinen Monomeren. Als Beispiel derartiger Fälle können die Expositionen gegenüber den SiO_2 Aerosolen aus dem Atomizer herangezogen werden. Wie in den Abschnitten 5.1.1 und 5.1.2 gezeigt wurde ist in diesen Aerosolen ein Agglomeratanteil von 92% bzw. 100% enthalten. Für die Exposition gegenüber Aerosil200 Partikeln

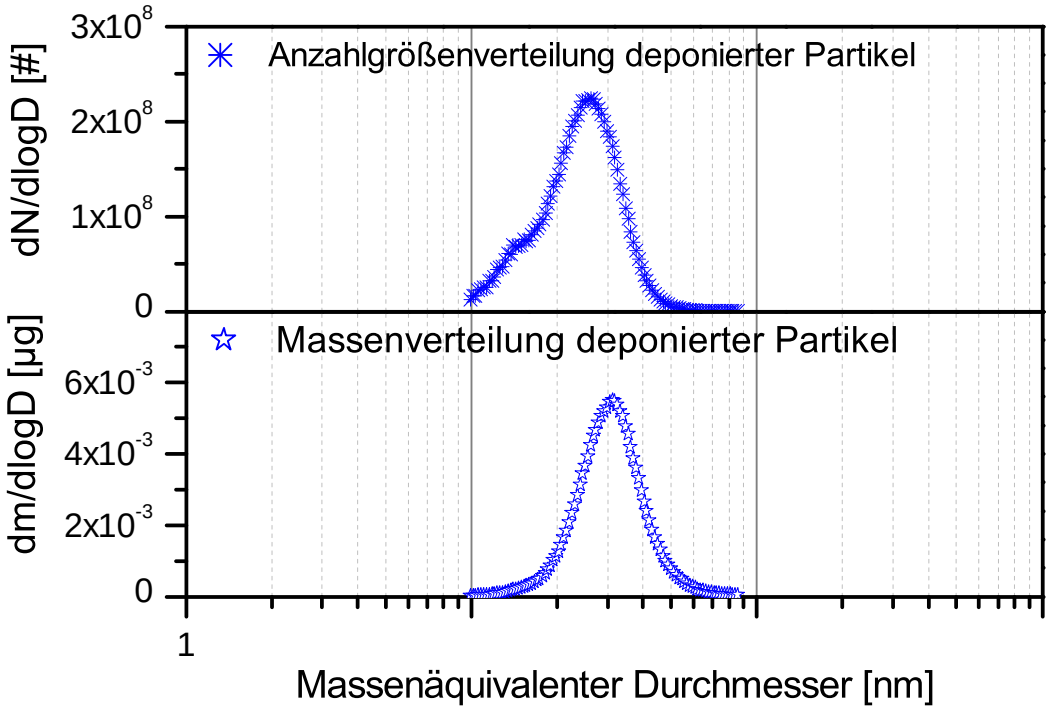


Abbildung 73: Die sich aus der im Text beschriebenen Dosisbestimmung ergebende Anzahl- und Massengrößenverteilung aus den Expositionsversuchen von SiO_2 MWP Partikeln auf A549 Zellen.

kann Gleichung 38 nicht verwendet werden. Zwar zeigen die großen Agglomerate, wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, eine kompakte Struktur nahezu sphärischer Gestalt, allerdings enthalten die Aerosole einen deutlichen Anteil an Agglomeraten mit mobilitätsäquivalenten Durchmessern oberhalb des SMPS Messbereichs. Obwohl deren Anteil an der Gesamtzahl sehr gering ist, machen sie einen nicht vernachlässigbaren Teil der Massenkonzentration aus. Zusätzlich entstehen Fehler in der Anzahlkonzentration aufgrund der nicht berücksichtigten Ladungskorrektur für die Partikel außerhalb des Messbereichs (Abbildung 34). Um diese Fehler nicht auf die Dosisbestimmung zu übertragen, wurde für das Aerosil die Dosis aus TEM Aufnahmen bestimmt. Ohne das elektrostatische Feld ergibt sich eine Anzahldosis von $(1 \pm 0.6) \cdot 10^7$ Partikeln/cm^2 bzw. (80 ± 50) Partikeln/Zelle. In diesem Fall liegt die Anzahldosis deutlich unter der maximalen Tagesanzahldosis einer exponierten Person. Anders verhält es sich mit der Massendosis. Aufgrund der Agglomeratgrößen liegt die Massendosis mit (0.5 ± 0.3) μg/cm^2 über der maximalen Tagesdosis von 0.12 μg/cm^2. Der Vergleich mit den in Tabelle 1 angegebenen Werten zeigt allerdings, dass die deponierte Massendosis trotzdem noch unterhalb der niedrigsten Testkonzentrationen ohne biologische Wirkung für Aerosil200 Partikel aus Submersversuchen liegt. Da die tatsächlichen niedrigsten Testkonzentrationen aufgrund des Verfahrens zur Dosisbestimmung bei Submers-

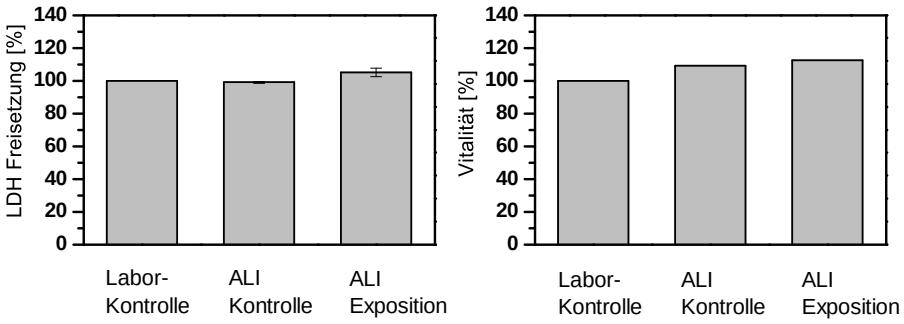


Abbildung 74: Die LDH Freisetzung und metabolische Aktivität nach einer Exposition von A549 Zellen mit $0.5 \mu g/cm^2$ Aerosil200 Agglomeraten. Trotz der hohen Dosis oberhalb der maximal möglichen Tagesdosis ist keine zytotoxische Reaktion der A549 Zellen gegenüber den Filterkontrollen zu erkennen. Die Werte wurden auf Zellen, die gleichzeitig unter ALI-Bedingungen bei 37° C mit Laborluft exponiert wurden (Laborkontrolle), normiert.

versuchen nur kleiner als der angegebene Wert sein können, kann bereits jetzt davon ausgegangen werden, dass A549 Zellen im ALI Verfahren keine wesentlich empfindlichere zytotoxische Antwort gegenüber submers exponierten Zellen zeigen. Tatsächlich konnte erst eine zytotoxische und inflammatorische Antwort der A549 Zellen auf Aerosil200 Partikel bei sehr viel höheren Dosen nach einer Exposition unter Verwendung der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Elektrodeneinsätze beobachtet werden (Abbildung 75). Aufgrund des el. Feldes nimmt insbesondere der Anteil großer deponierter Agglomerate zu. Als Folge dieser starken Beladung

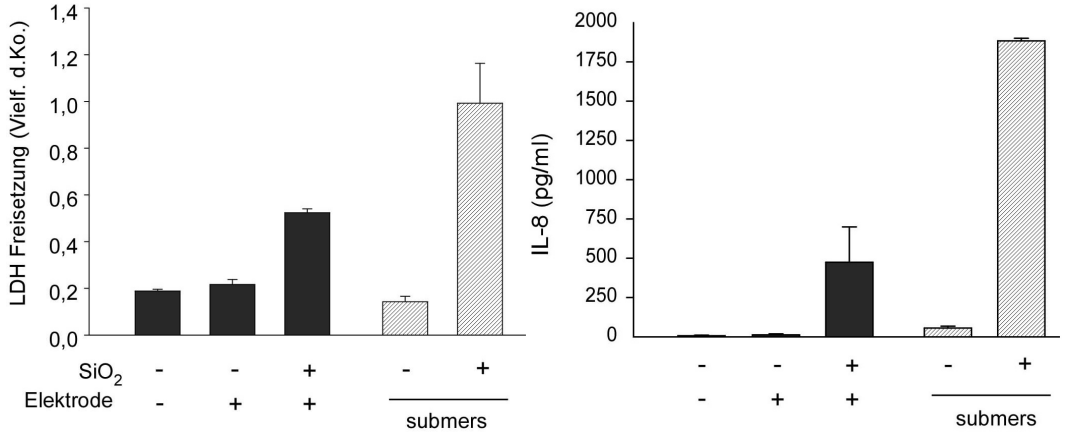


Abbildung 75: Zytotoxische und inflammatorische Antwort der A549 Zellen nach einer Beladung mit 80 $\mu g/cm^2$ Aerosil200 Partikeln. Die hohe LDH Freisetzung als Marker für die zytotoxische Wirkung kennzeichnet eine deutliche Abnahme der Membranintegrität gegenüber den Filterkontrollen mit und ohne Elektrode. Ebenfalls wurde durch die Behandlung eine Freisetzung des Entzündungsmediators IL-8 induziert. Gegenüber Submersversuchen mit einer applizierten Dosis von 15.6 $\mu g/cm^2$ anstatt fallen die Effekte jedoch deutlich schwächer aus. Eine genauere Diskussion der in der Abbildung gezeigten Resultate erfolgt in der Dissertation von A. Panas [Panas, 2011].

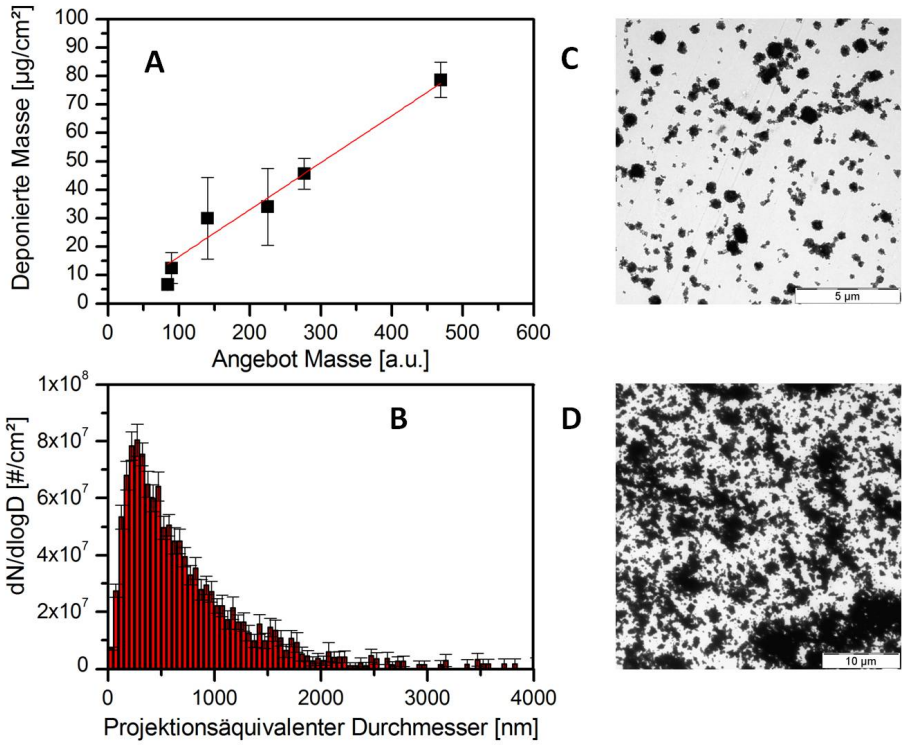


Abbildung 76: Zur Messung der deponierten Größenverteilung und Beladungsdichte (**B**) von Aerosil200 Partikeln mit el. Feld waren die vollständig exponierten TEM Netze (**D**) zu stark belegt. Die Deponierten Dosen wurden daher aus teilweise beladenen Netzen (**C**) über das gesamte Partikel bzw. Massenangebot aus der in (**A**) gezeigten Geraden ermittelt. Da die Größenverteilung den Messbereich des SMPS übersteigt, kann die angebotene Partikelmenge nur qualitativ angegeben werden. Der Anstieg der Geraden entspricht kann daher nicht als integrale Depositionseffizienz aufgefasst werden.

ist die Auswertung der deponierten Dosis über TEM Netze für den gesamten Versuchszeitraum nahezu unmöglich (Abbildung 76D). Aus den nur für Teile des Expositionsversuchs beladenen Netzen zeigt sich allerdings eine lineare Beziehung zwischen der applizierten und deponierten Dosis (Abbildung 76A). Damit ergibt sich für die mit el. Feld durchgeführten Aerosil200 Expositionsversuche eine deponierte Partikelmasse von (80 ± 30) μg/cm^2 bzw. (6 ± 2)·10^{-4} μg/Zelle. Das entspricht mit der BET Oberfläche des Aerosil200 (Tabelle 3) einer Oberflächendosis von (160 ± 60) cm^2/cm^2. Sowohl die maximale Tagesdosis, als auch die aus Submersversuchen ermittelten niedrigsten Konzentrationen ohne Wirkung wurden damit bei weitem überschritten. Die daraus resultierende zytotoxische und inflammatorische Antwort der Zellen ist qualitativ fast identisch mit denen aus Submersexperimenten. Sowohl die Freisetzung des Entzündungsmediators IL-8, als auch eine Abnahme der Membranintegrität kann beobachtet werden. Weiterhin führt die Exposition zu einer COX-2 Induktion und p38 Aktivierung. Lediglich die Freisetzung von IL-6, welche in sehr geringem Ausmaß in Submersexperimen-

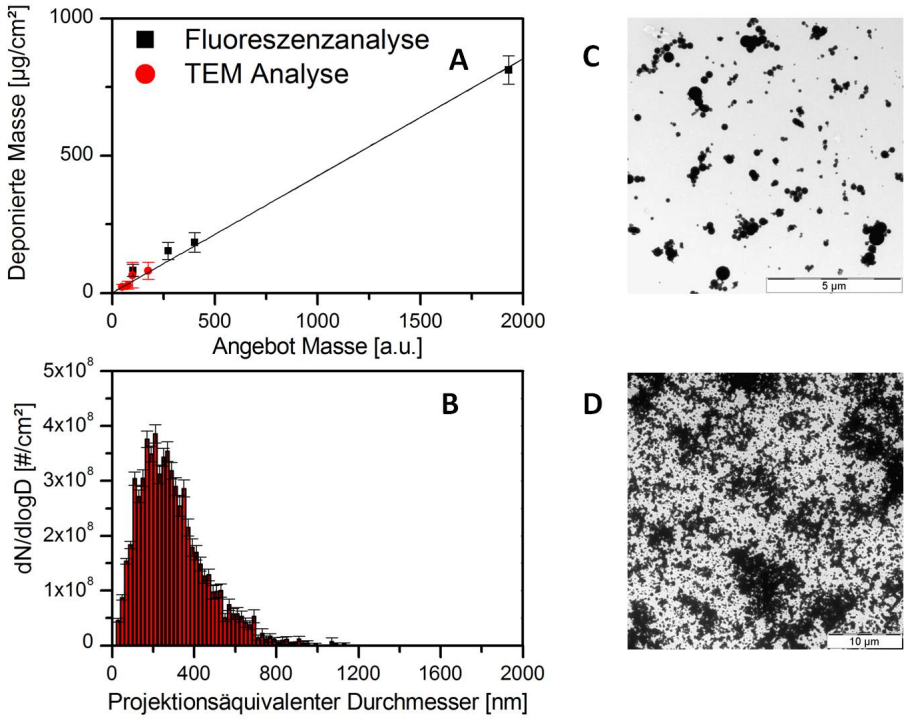


Abbildung 77: Wie im Fall der Aerosil 200 Partikel ist die Messung der deponierten Größenverteilung (**B**) und Beladungsdichte von SiO_2 70 Agglomeraten nach einer Exposition mit el. Feld aus den vollständig exponierten TEM Netzen (**D**) nicht möglich. Sowohl aus den Größenverteilungen der teilweise beladenen TEM Netze (**B** + **C**), als auch aus den Fluoreszenzanalysen ergibt sich aber eine lineare Abhängigkeit zwischen deponierter und applizierter Dosis (**A**) und rechtfertigt die Annahme kompakter sphärischer Agglomerate. Die Dosisbestimmung erfolgte schliesslich über den Anstieg der in (**A**) gezeigten Geraden.

ten beobachtet wird, konnte nicht nachgewiesen werden. Obwohl die Reaktion der Zellen qualitativ identisch ist, zeigen sich quantitativ starke Unterschiede zwischen den Submersversuchen und ALI Experimenten. Bereits bei viel geringeren applizierten Dosen von 15.6 $\mu g/cm^2$ ist die sezernierte IL-8 und freigesetzte LDH Menge in Submersversuchen wesentlich größer (Abbildung 75). Ähnliche Unterschiede lassen sich bei der Exposition mit SiO_2 70 Agglomeraten beobachten. Wie auch beim Aerosil verhält sich die deponierte Massendosis linear zur applizierten Partikelmasse (Abbildung 77). In guter Übereinstimmung zwischen der Fluoreszenz und TEM Analyse ergibt sich eine Massendosis von (120 ± 50) $\mu g/cm^2$ bzw. (9 ± 4) μg/Zelle. Auch hier fällt die zytotoxische und inflammatorische Reaktion der Zellen wesentlich schwächer gegenüber den von Panas [2011] durchgeführten Submersversuchen aus (Abbildung 78). Die Ursache für die deutlich geringere Sensitivität gegenüber den Submersversuchen ist noch nicht geklärt. Eine Hypothese ist die Ausbildung einer in Submersversuchen nicht vorhandenen Schicht oberflächenaktiver Substanzen (Surfactants) an der Zelloberfläche, die von den Zellen an der Luft- Flüssigkeits-Grenzschicht während der Exposition gebildet werden

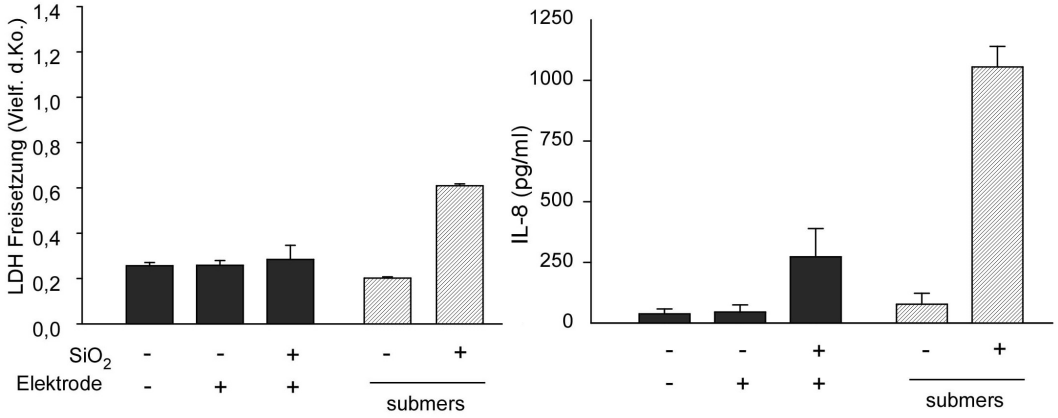


Abbildung 78: Nach einer Exposition von A549 Zellen mit $9 \cdot 10^{-4}$ μg/Zelle SiO_2 70 Agglomeraten unter ALI Bedingungen zeigt sich eine deutlich erhöhte IL-8 Freisetzung gegenüber den Kontrollen. Die Freisetzung fällt jedoch geringer gegenüber Aerosil Agglomeraten ähnlicher Agglomeratgröße und Massendosis aus. Kaum zu erkennen ist eine erhöhte LDH Freisetzung. Wie auch beim Aerosil200 sind beide Endpunkte wesentlich schwächer im Vergleich zu Submersversuchen mit einer applizierten Dosis von 15.6 $\mu g/cm^2$. Eine genauere Diskussion der in der Abbildung gezeigten Resultate erfolgt in der Dissertation von Alicja Panas [Panas, 2011].

kann. Eine weitere mögliche Ursache könnten abweichende Größenverteilungen der angebotenen und deponierten Agglomerate im ALI und Submersverfahren sein. Abgesehen von den Unterschieden in der Sensitivität bei gleicher Massendosis zwischen den ALI und Submersexperimenten mit SiO_2 Partikeln ergeben sich unterschiedlich starke Zellreaktionen für die SiO_2 70 Agglomerate und Aerosil 200 Partikel. Obwohl nach beiden Expositionen eine ähnliche Massendosis aus Agglomeraten ähnlicher Größe verabreicht wurde, zeigen die SiO_2 70 Agglomerate eine wesentlich schwächere Zellreaktion. Während die IL-8 Induktion noch klar erkennbar erhöhte Werte gegenüber der Kontrolle aufweist, können kaum Unterschiede in der Membranintegrität zwischen den Kontrollen und exponierten Zellen beobachtet werden. Die LDH Freisetzung der exponieren Zellen übersteigt die der Kontrollen nicht über den Rahmen der Standardabweichung hinaus. Ebenfalls schwächer fallen die COX-2 Induktion und p38 Phosphorylierung gegenüber der Aerosil200 Exposition aus (Abbildung 79). Da sowohl die Anzahlkonzentration deponierter Agglomerate, als auch die Massendosis für die SiO_2 70 Partikelexposition größer ist, könnte nur eine größere Oberflächen- oder Primärpartikelkonzentration eine über die Dosis begründbare Ursache dieser Unterschiede sein. Aufgrund der komplexen mikroskopischen Struktur aus nicht sphärischen, teilweise aggregierten und bimodalen Primärpartikelgrößenverteilung ist die Angabe einer sinnvollen Primärpartikeldosis im Fall des Aerosils nicht möglich. Allerdings ergibt sich mit (17 ± 6) cm^2/cm^2 eine um 90% geringere Oberflächendosis der SiO_2 70 Partikel gegenüber den Aerosil200 Partikeln und lässt wie wie für TiO_2 und Kohlenstoffpartikel [Stoeger et al., 2007] auf die Oberfläche als eine die biologische Wirkung der maßgeblich bestimmende Dosisgröße schliessen. Bei dem

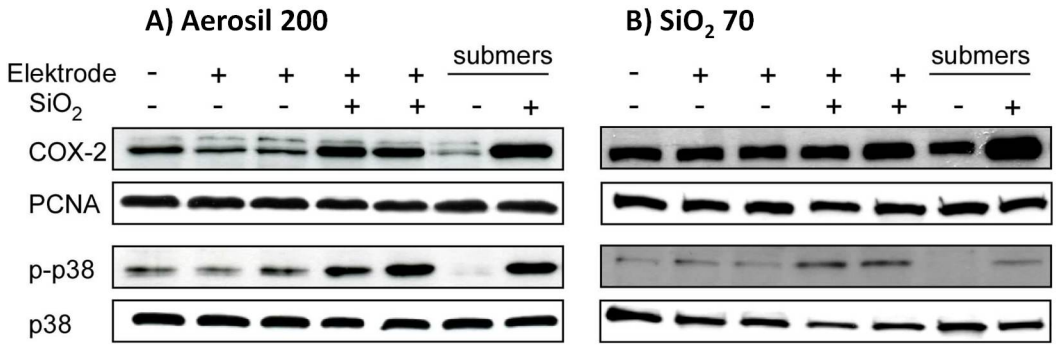


Abbildung 79: Die Western Blots belegen eine COX-2 Induktion und p38 Phosphorylierung bei einer Exposition von A549 Zellen gegenüber Aerosil200 (**A**) und SiO_2 70 (**B**) Agglomeraten mit der im Text beschriebenen Dosis. Sowohl unter submersen, als auch bei ALI-Bedingungen, führt die Exposition zu einer COX-2 Induktion und p38 Aktivierung. Sie fallen jedoch an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht wesentlich schwächer als in Submersversuchen aus. Ebenfalls schwächer sind die Effekte durch die SiO_2 70 Partikel gegenüber dem Aerosil200. Der Nachweis von PCNA und p38 in nicht phosphorylierter Form weist eine vergleichbare Gesamtproteinmenge der Zellen nach. Die Abbildungen der Western Blots wurden von A. Panas zur Verfügung gestellt und werden in ihrer Dissertation genauer diskutiert [Panas, 2011].

Vergleich der deponierten Dosis und der beobachteten Wirkungen für beide Partikelsorten ist allerdings die unterschiedliche Beschaffenheit der Partikel und Agglomerate zu berücksichtigen. Obwohl es sich in beiden Fällen um amorphes SiO_2 handelt und qualitativ die gleichen Zellreaktionen induziert wurden, zeigte sich in den Abschnitten 5.1 und 5.2 ein starker Unterschied in den mikroskopischen Eigenschaften der Partikelsorten aus unterschiedlichen Syntheseprozessen. Unklar ist z.B. die genaue Oberflächenbeschaffenheit der SiO_2 70 Partikel und die Wirkung ihrer Fluoreszenzmarkierung auf die Zellen. Um Tatsächlich vergleichbare Aussagen zwischen relevaner Dosis und Wirkung zu erhalten, sind daher weitere Expositionsversuche gegenüber SiO_2 Partikeln aus dem gleichen Syntheseprozess mit vergleichbaren Oberflächeneigenschaften notwendig.

5.6.2 TiO_2 Partikel

Wie in Abschnitt 5.1.2 gezeigt, enthalten die TiO_2 20 Aerosole aus dem Elektrospray nur einen sehr geringen Anteil an Agglomeraten mit mobilitätsäquivalenten Durchmessern von mehr als 200 nm (Abbildung 29). Der Fehler aufgrund der fraktalähnlichen Struktur der Partikel bei der Verwendung von Gleichung 38 zur Bestimmung der Anzahldosis kann daher vernachlässigt werden. Aus dem in Abbildung 21 gezeigten Partikelangebot ergibt sich damit eine deponierte Anzahldosis von $(5 \pm 0.3) \cdot 10^6$ Partikeln/cm^2 bzw. (38 ± 2) Partikeln/Zelle. Die Abschätzung der Massendosis erfolgt über die Behandlung der deponierten Partikel als fraktalähnliche Agglomerate. Über Gleichung 13 und der in Abschnitt 5.2 angegebenen fraktalen Dimension von 1.6 ergibt sich damit die in Abbildung 80 gezeigte Massenverteilung deponierter Partikel mit einer Gesamtdosis von (1 ± 0.2) ng/cm^2. Daraus folgt über die BET Oberfläche von 105 m^2/g eine Oberflächendosis von $(1 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ cm^2/cm^2. Anzahl-, Oberflächen- und Massendosis

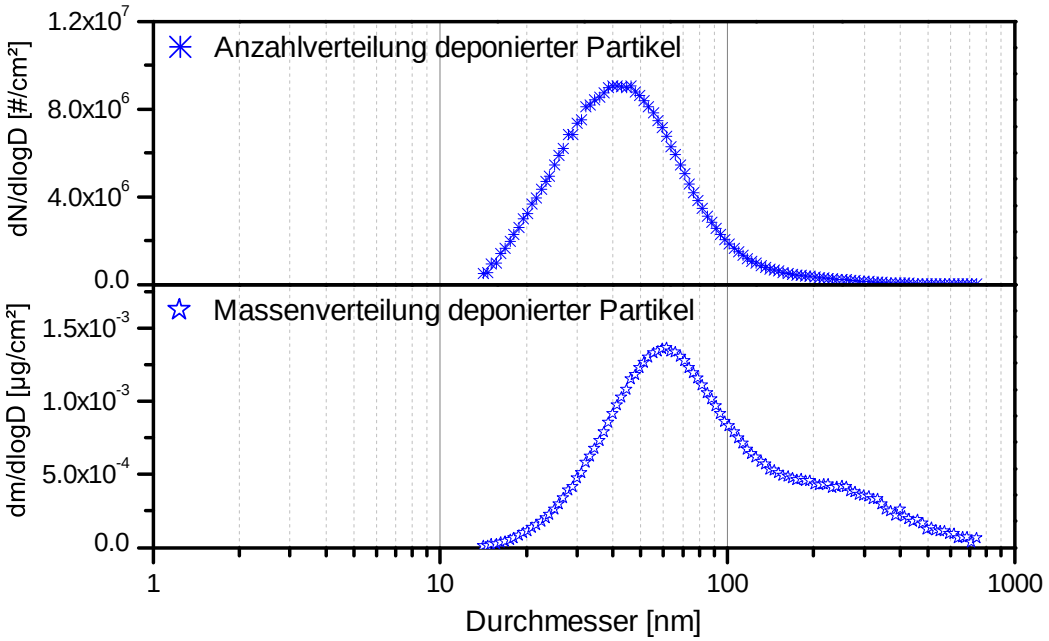


Abbildung 80: Anzahl- und Massengrößenverteilung der bei einer Exposition von A549 Zellen deponierten TiO_2 20 Partikel. Aufgrund der mit kleineren Durchmessern zunehmenden Depositionseffizienz verschiebt sich die Mode der Anzahlgrößenverteilung um 19 nm gegenüber dem angebotenen Aerosol auf einen modalen Durchmesser von 41 nm. 50% der gesamten Massendosis wird dagegen von Agglomeraten mit mobilitätsäquivalenten Durchmessern von mehr als 73 nm beigetragen.

liegen damit unter den maximal möglichen Tagesdosen. Lediglich die sich nach Gleichung 22 aus der in Abbildung 29 gezeigten Primärpartikelverteilung ergebende Primärpartikeldosis überschreitet mit $(7 \pm 1) \cdot 10^7$ Monomeren/cm^2 bzw. (540 ± 80) Monomeren/Zelle die maximale Tagesdosis bei einer Exposition gegen-

über nicht agglomerierten Partikeln. Die Dosis reicht dennoch nicht aus, um eine zytotoxische Reaktion oder pro-inflammatorische Antwort der A549 Zellen zu induzieren. Zum Vergleich konnte Panas [2011] eine schwache pro-inflammatorische Antwort der gleichen TiO_2 Partikel in Submersversuchen mit A549 Zellen erst bei einer Oberflächendosis oberhalb von 200 cm^2/cm^2. Zur Realisierung derartig hoher Dosen müsste wiederum auf deutlich größere Agglomerate und eine erhöhte Depositionseffizienz durch Verwendung der Elektrode zurückgegriffen werden. Insofern sich die Sensitivität im Vergleich zu Submersexperimenten ähnlich wie im Fall der SiO_2 Partikel verhält, ist eine Wirkung kleiner Agglomerate oder Monomere auf A549 Zellen mit einer realistischen Dosis aufgrund der niedrigen akuten Toxizität der TiO_2 Partikel nicht zu erwarten.

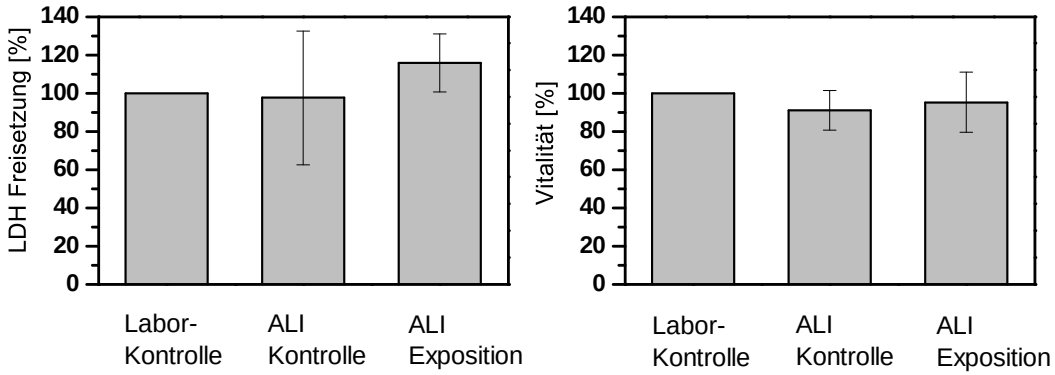


Abbildung 81: Zur Untersuchung der akuten Toxizität der TiO_2 20 Partikel wurde die Membranintegrität und metabolische Aktivität der Zellen nach einer Exposition mit einer Anzahldosis von 38 Partikeln/Zelle untersucht. Die geringfügigen Änderungen der LDH-Freisetzung und Zellvitalität exponierten A549 Zellen lassen auf keine akute toxische Wirkung der Partikel bei dieser Dosis schliessen.

5.6.3 Kohlenstoff Partikel

Die Printex 90 Aerosolpartikel ähneln in ihrer Größenverteilung mit einer Mode bei (220 ± 20) nm den mit dem Atomizer erzeugten SiO_2 Aerosolen. Wie in Abbildung 47 zu erkennen ist, enthält es sehr kompakt geformte Agglomerate und wurde daher wie die Aerosil200 Partikel behandelt. Die Größenverteilung der deponierten Partikel ist in Abbildung 82 dargestellt und stimmt qualitativ sehr gut mit den Ergebnissen aus den TEM Aufnahmen überein. Die TEM Aufnahmen ergeben mit $(1.1\pm0.3)\cdot10^7$ Partikeln/cm^2 allerdings eine insgesamt höhere Dosis gegenüber der Simulation mit $5\cdot10^6$ Partikeln/cm^2. Da die angebotene Aerosolmenge zeitlich

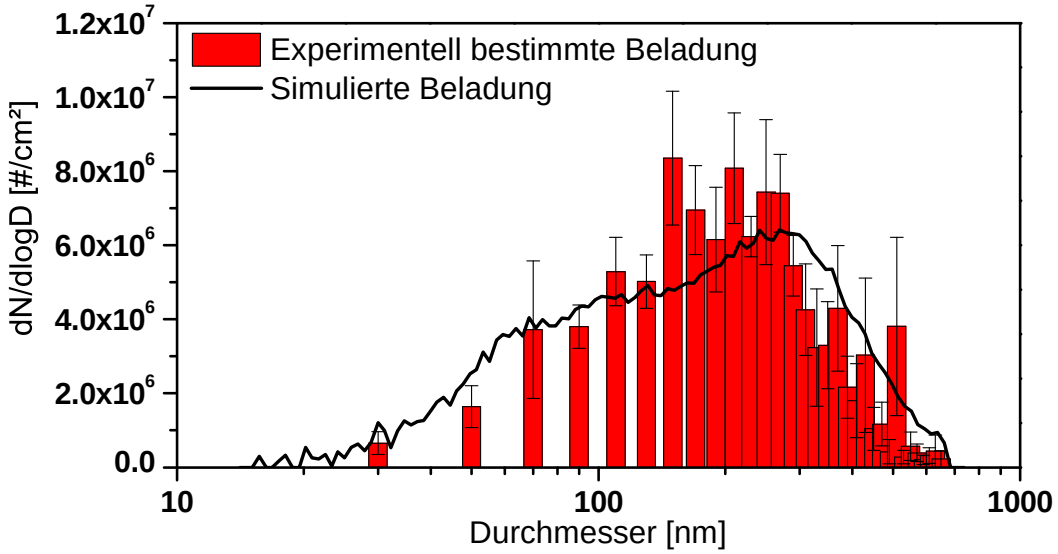


Abbildung 82: Größenverteilung der deponierten Printex 90 Partikel in Abhängigkeit des mobilitätsäquivalenten Durchmessers nach Gleichung 38 (schwarze Linie) sowie des projektionsäquivalenten Durchmessers aus den TEM Aufnahmen (rote Balken). Die gute Übereinstimmung beider Verteilungen bestätigt eine relativ kompakte Struktur der großen Agglomerate.

nur sehr grob aufgelöst wurde, aber auch die TEM Analyse nur anhand von 5 Aufnahmen erfolgte, können beide Ergebnisse sehr fehlerbehaftet sein, weshalb als Gesamtdosis der Mittelwert von $(8\pm5)\cdot10^6$ Partikeln/cm^2 bzw. (60±40) Partikeln/Zelle angenommen wurde. Mit der Annahme kompakt geformter, sphärischer Agglomerate aus 14 nm Primärpartikeln entspricht das einer Massendosis von (0.14 ± 0.04) μg/cm^2 und Primärpartikeldosis von $(5\pm2)\cdot10^{10}$ Monomeren/cm^2. Die Massendosis liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die von Bitterle et al. [2006] angegebenen Werte zwischen 44 und 233 ng/cm^2 nach einer ALI Exposition gegenüber Rußpartikeln aus einem Funkengenerator mit einer modalen Agglomeratgröße von 90±2 nm, fraktalen Dimension von 2 und einem Primärpartikeldurchmesser von 7 nm. Wie in deren Studie konnte auch für die größer und kompakter geformten Printex 90 Agglomerate keine Abnahme der Zellvi-

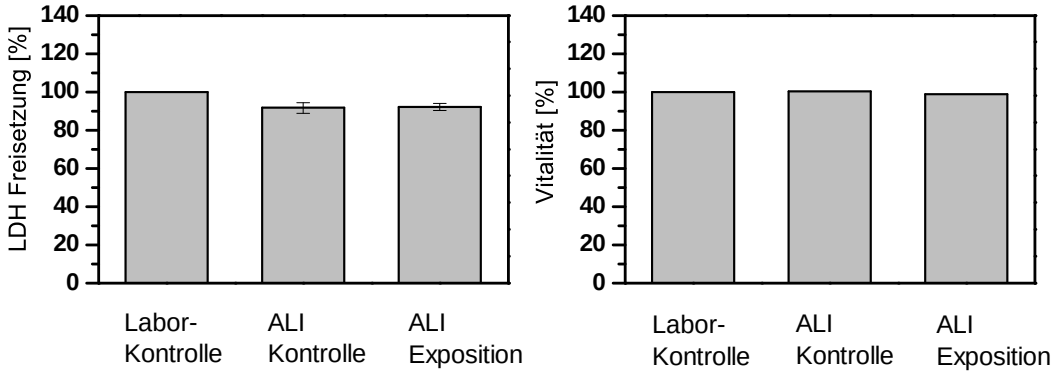


Abbildung 83: Nach der Exposition von A549 Zellen mit 140 ng/cm^2 Printex 90 Partikeln zeigt sich keine Änderung der LDH Freisetzung oder Zellvitalität gegenüber der mit sauberer Luft exponierten ALI Kontrolle. Die Werte wurden auf die unter ALI-Bedingungen bei 37° C mit Laborluft behandelten Zellen normiert. Die Angaben entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichung aus einer doppelten Bestimmung der LDH Freisetzung einer einzigen Exposition.

talität bei dieser Dosis beobachtet werden (Abbildung 83). Ebenfalls konnte in Übereinstimmung mit Bitterle et al. [2006] keine IL-8 Freisetzung nachgewiesen werden (Abbildung 84). Allerdings konnten Bitterle et al. [2006] bei einer Dosis von 87 ng/cm^2 eine erhöhte Transkription von Hämoxygenase-1 (HO-1) beobachten. Diese konnte mit den Printex 90 Partikeln nicht nachgewiesen werden (Abbildung 84), was möglicherweise, abgesehen von unterschiedlichen Partikeleigenschaften, an der höheren Dosis von 140 ng/cm^2 liegen könnte. Bei einer

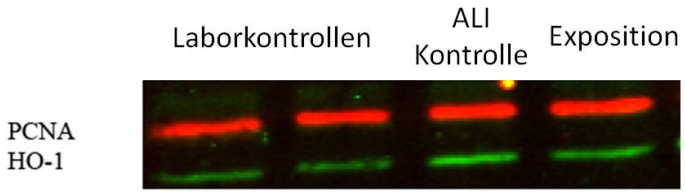


Abbildung 84: Aus dem Western Blot ist keine erhöhte Induktion des antioxidativen Enzyms HO-1 gegenüber der mit gefilterter Luft behandelten Kontrolle nach einer Exposition von A549 Zellen mit 140 ng/cm^2 Printex 90 Partikeln zu erkennen.

Dosis von 233 ng/cm^2 konnten auch Bitterle et al. [2006] keine erhöhte Transkription von HO-1 mehr nachweisen, was sie auf eine möglicherweise einsetzende zytotoxische Antwort zurückführen, die unterhalb der Sensitivität des von ihnen verwendeten WST-1 Tests liegt.

Im Gegensatz zu den Printex 90 Partikeln wurde die Exposition gegenüber Dieselrußpartikeln mit der elektrostatisch erhöhten Depositionseffizienz durchgeführt.

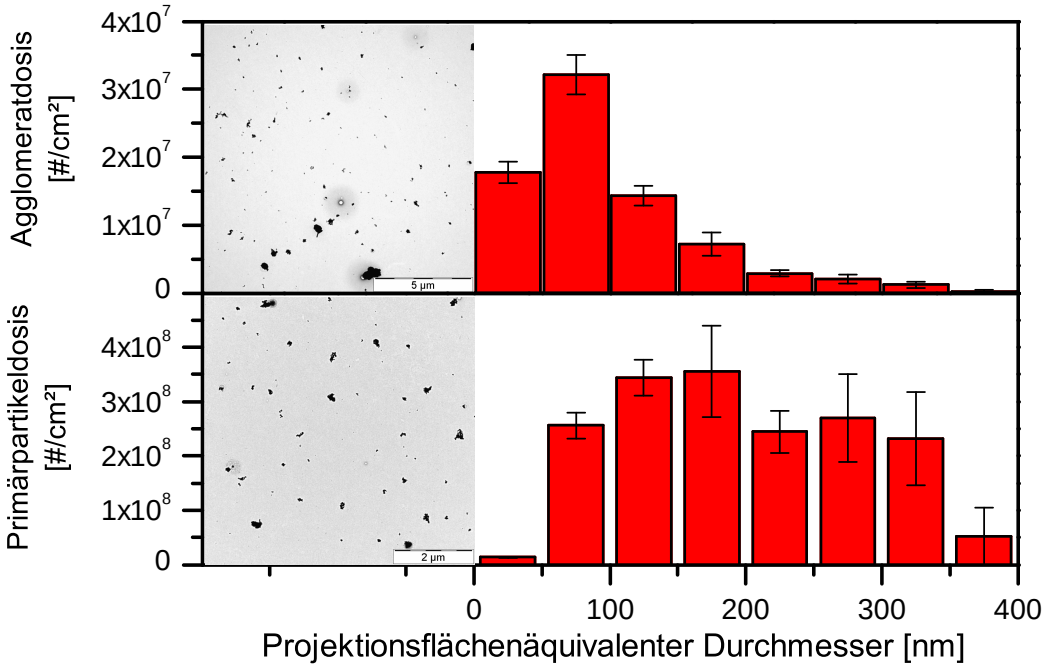


Abbildung 85: Anzahlgrößenverteilung der deponierten Dieselrußpartikel aufgetragen über den projektionsflächenäquivalenten Durchmesser. Nach Gleichung 20 ergibt sich die unten dargestellte Anzahl an Monomeren innerhalb der Agglomerate, woraus eine Primärpartikeldosis von 17700 Monomeren/Zelle folgt. Die Bilder zeigen zwei exemplarische TEM Aufnahmen deponierter Rußagglomerate.

Da die Depositionseffizienz in diesem Fall noch nicht für den gesamten Größenbereich bestimmt wurde (Abschnitt 5.5), konnte die Dosis nur über die Auswertung beladener TEM Netze erfolgen. Aus den Aufnahmen ergibt sich eine Beladungsdichte von $(8\pm1)\cdot10^7$ Partikeln/cm^2 mit einer Mode der Anzahlgrößenverteilung deponierter Partikel bei einem projektionsflächenäquivalenten Durchmesser von (75±25) nm (Abbildung 85). Die Anzahldosis ist damit eine Größenordnung über dem Wert bei der Exposition mit Printex 90 Partikeln. Trotz der höheren Anzahldosis gegenüber den Printex 90 Partikeln fallen aufgrund der mit 1.8 wesentlich geringeren fraktalen Dimension und den wesentlich geringeren Agglomeratgrößen die Primärpartikeldosis, Oberflächendosis und Massendosis deutlich geringer aus. Mit den projektionsflächenäquivalenten Durchmessern der deponierten Agglomerate bei einer Primärpartikelgröße von 30 nm folgt nach Gleichung 20 die in Abbildung 85 gezeigte Verteilung an Primärpartikeln mit einer Monomerdosis von $(23\pm9)\cdot10^8$ Monomeren/cm^2. Geht man wiederum von sphärischen Primärpartikeln aus, entspricht das einer Massen und Oberflächendosis von (0.08±0.03) μg/cm^2 und (0.07±0.03) cm^2/cm^2. Trotz der im Vergleich zu Holder et al. [2008] um einen Faktor 80 größeren Massendosis, konnte keine erhöhte Zytotoxizität oder IL-8 Freisetzung in den A549 Zellen beobachtet

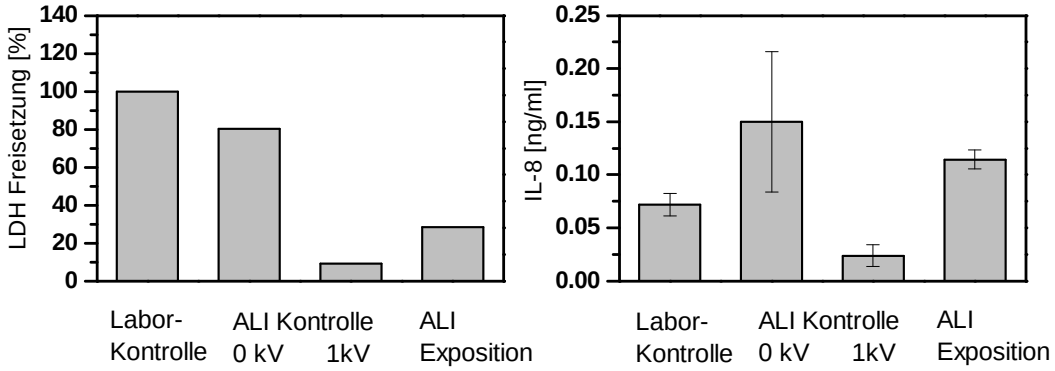


Abbildung 86: LDH und IL-8 Freisetzung nach einer Exposition mit 80 ng/cm^2 Dieselrußpartikeln einer modalen Agglomeratgröße zwischen 88 nm und 136 nm. Die Werte der LDH Freisetzung wurden auf die unter ALI-Bedingungen bei 37° C mit Laborluft behandelten Zellen normiert. Die Membranen der Laborkontrollen wurden möglicherweise zu trockener Luft ausgesetzt und geschädigt, weshalb eine erhöhte LDH Freisetzung genüber den exponierten Proben beobachtet werden kann. Einen Einfluss auf die IL-8 Produktion nimmt die Membranschädigung der Zellen nicht. Im Vergleich zu den ALI Kontrollen zeigt sich keine signifikant erhöhte LDH oder IL-8 Freisetzung der exponierten A549 Zellen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung mehrerer Messungen zur IL-8 Freisetzung derselben Probe.

werden (Abbildung 86). Möglicherweise stellt die in dem von Holder et al. [2008] verwendeten System genutzte 16HBE14o Bronchialepithelzelllinie ein sensitiveres System gegenüber den hier genutzten A549 Zellen dar.

5.7 Diskussion der Ergebnisse

Für Suspensionen aus stabilisierten Monomeren erwies sich das Elektrospray mit Anzahlkonzentrationen im Bereich von 10^6 Partikeln/cm^3 bei Agglomeratanteilen unter 10% und geometrischen Standardabweichungen von weniger als 1.3 als eine geeignete Aerosolquelle. Die Wahl einer geeigneten Salpetersäurelösung zur Variation der Leitfähigkeit und Konzentration der Suspension ermöglichte einen stabilen Betrieb im Taylorcone Modus mit einem vernachlässigbaren Residualpartikelanteil. Die Erzeugung eines Aerosols mit äquivalenten Eigenschaften (geometrische Standardabweichung unter 1.3, Anzahlkonzentration über 10^6 Partikel/cm^3, Agglomeratanteil geringer als 10%) aus gasphasensynthetisierten Partikeln war dagegen nicht möglich. Insbesondere die als Pulver vorliegenden Nanopartikel konnten nicht in eine flüssige Suspension mit einem hohen Monomeranteil überführt werden. Unabhängig von der genauen Syntheseart (Flammensynthese oder Mikrowellenplasmasynthese) enthielten die Suspensionen nach wie vor zu 100% Agglomerate mit häufig fraktalähnlichen Strukturen. Im Fall des Aerosil200 zeigten Seipenbusch et al. [2010], dass die Ursache der dafür verantwortlichen Partikelkräfte Sinterbrücken zwischen Primärpartikeln sein können, die bei ca. 1300°C entstehen. Obwohl die hier verwendeten Partikel unter geringeren Temperaturen in der Mikrowellenplasma- und Niederdruckflammensynthese hergestellt wurden, konnten auch sie nicht vollständig dispergiert werden. Als untere Grenze ergaben sich am Beispiel der TiO_2 Partikel dagegen im Mittel 10 bis 20 Monomere pro Agglomerat. Die fraktale Struktur, der aus der Flammensynthese stammenden Partikel, lässt dabei eine Entstehung dieser Agglomerate oder Aggregate bereits während der Synthese vermuten. Am Beispiel von SiO_2 Partikeln aus der Mikrowellenplasmasynthese konnte gezeigt werden, dass trotz sofortiger Stabilisierung in flüssiger Suspension während der Synthese ein großer Agglomeratanteil erhalten bleibt. Im Gegensatz zu den auf Filtern gesammelten Partikeln ergab sich allerdings eine besser dispergierte Suspension mit zumindest einem geringen Primärpartikelanteil zwischen 4% und 20%.

Unabhängig vom Agglomeratanteil konnten mit dem Elektrospray die gasphasensynthetisierten Partikel nur mit Anzahlkonzentrationen von weniger als 10^6 Partikeln/cm^3 resuspendiert werden. Diese Konzentrationen bei Agglomeratgrößen unterhalb von 100 nm erwiesen sich als zu gering, um eine zytotoxische Wirkung oder inflammatorische Reaktion der A549 Zellen bei Expositionsversuchen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht zu induzieren. Wesentlich höhere Konzentrationen bei gleichzeitig geringeren Agglomeratanteilen konnten mit dem Ostraat et al. [2008] nachempfundenen Aerosolgenerator erzeugt werden. Wie bereits von Ostraat et al. [2008] beschrieben wurde, können die Partikelkonzentrationen nicht mit denen aus der Flammen- oder Mikrowellenplasmasynthese konkurrieren. Sie liegen aber mit 10^7 bis 10^8 Partikeln/cm^3 deutlich über den Anzahlkonzentra-

tionen der mit dem Elektrospray resuspendierten Metalloxide aus der Flammen- und Mikrowellenplasmasynthese. Wegen der für gasphasensynthetisierte Partikel verhältnismäßig geringen Agglomeratanteile und der einfachen Variation verschiedener Partikelparameter erscheint daher dieser Generator die geeignetere Aerosolquelle für Expositionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht gegenüber der aufwendigen Resuspendierung von Partikeln mit dem Elektrospray zu sein. Die schmalen Größenverteilungen der mit dem Elektrospray erzeugten Aerosole aus kommerziellen Suspensionen ermöglichten allerdings die experimentelle Bestimmung der Depositionseffizienz der Vitrocell Expositionsmodule für verschiedene Partikelgrößen. Aufgrund der somit gut charakterisierten Depositionseffizienz für einen Abstand von 2 mm zwischen Aerosolzufuhr und Zelloberfläche bei einem Aerosolfluss von 100 ml/min konnten Expositionsversuche mit einer gut definierten Anzahldosis durchgeführt werden. Problematisch war dagegen nach wie vor die Bestimmung der ebenfalls relevanten Oberflächen- und Massendosis. Für Partikelagglomerate mit fraktalähnlicher Struktur wurde ein fraktaler Formalismus angewendet, um die deponierten Anzahlgrößenverteilungen in eine Massengrößenverteilung zu überführen. Die Genauigkeit dieses Verfahrens ist allerdings aufgrund der geringen Monomeranzahl pro Agglomerat, der nicht ideal sphärischen Gestalt der Monomere und den nicht vollkommen monodispersen Größenverteilungen der Primärpartikel, mit einem schwer abzuschätzenden Fehler behaftet. Dieser pflanzt sich weiterhin auf die Bestimmung der Oberflächendosis über die spezifische Oberfläche fort. Von einem noch größeren Fehler ist für die als kompakt angenommenen Agglomerate des Atomizers auszugehen. Auch wenn für die aus monodispersen 50 nm Primärpartikeln bestehenden Agglomerate diese Annahme mit der Fluoreszenzanalyse gerechtfertigt wurde, ist für die gasphasensynthetisierten Partikel aus teilweise polydispersen Primärpartikelgrößenverteilungen mit einer bereits aus Agglomeraten bestehenden Mikrostruktur von einer überschätzten Massendosis auszugehen. Zur genaueren Angabe der Massendosis ist daher die experimentelle Bestimmung der Massenverteilungen, z.B. über ein Aerosolpartikelmassenanalysator, insbesondere für nicht fraktalähnliche Agglomerate, erforderlich.

Die bestimmten Dosen für Expositionsversuche über 5 h mit TiO_2 Partikeln aus der Flammensynthese, SiO_2 Partikeln aus der Mikrowellenplasmasynthese sowie kommerziellen Aerosil200, SiO_2 70- und Printex 90 Partikeln ohne elektrostatisch erhöhte Depositionseffizenz erwiesen sich als zu gering um zytotoxische oder inflammatorische Effekte oberhalb der Nachweisgrenze in den A549 Zellen zu induzieren. Aufgrund der geringen Größe von Nanopartikeln konnten jedoch auch bei Aerosolkonzentrationen von 10^6 Partikeln/cm^3 und mit elektrostatisch erhöhter Depositionseffizienz nur Massen- und Oberflächendosen deponiert werden, die unterhalb der in Submersexperimenten verwendeten Werte liegen. Obwohl die deponierten Mengen an SiO_2 70 Partikeln dennoch deutlich über einer realisti-

schen Tagesdosis liegen und Holder et al. [2008] von einer höheren Sensitivität der ALI Experimente ausgehen, konnten keine toxischen Effekte in den A549 Zellen nachgewiesen werden. Erst die Verwendung von großen Agglomeraten aus Nanopartikeln mit einer um einen Faktor 1000 größeren Massendosis ermöglichten den Nachweis einer zytotoxischen und inflammatorischen Antwort der A549 Zellen. Die Primärpartikeldosis der SiO_2 70 Partikel überschreitet in diesen Fällen allerdings bereits die von Paur et al. [2011] angegebene, maximale Dosis eines 80 jährigen Menschen. Noch stärkere Effekte induzierten die Aerosil200 Partikel mit einer ähnlichen Massendosis, aber deutlich größeren Oberflächendosis. Die bei diesen Dosiswerten in ALI Versuchen induzierten Effekte sind mit denen aus Submersexpositionen identisch. Sie scheinen aber schwächer auszufallen, wobei ein direkter Vergleich gegenüber Submersversuchen nur schwer möglich ist. Insbesondere die fehlende Kenntniss über die Größe der submers deponierten Agglomerate erschwert die Begründung der abweichenden Sensitivität beider Verfahren.

Partikel		Aerosil 200		SiO_2 MWP	SiO_2 50		TiO_2 20	C Diesel	Printex 90
					ES	ATM			
Elektrode	kV	1	0	0	1	1	0	1	0
Deponierte Anzahldosis	E8 #/cm²	2 ± 0.8	0.1 ± 0.06	0.3 ± 0.01	6 ± 2	14 ± 3	0.05 ± 0.003	0.8 ± 0.1	0.08 ± 0.05
Primärpartikeldosis	E8 #/cm²	-	-	3 ± 0.1	6 ± 2	8000 ± 3000	0.7 ± 0.1	23 ± 9	500 ± 200
Massendosis	µg/cm²	80 ± 30	0.5 ± 0.3	0.001 ± 0.0002	0.14 ± 0.05	120 ± 50	0.001 ± 0.0002	0.08 ± 0.03	0.14 ± 0.04
Oberflächendosis	cm²/cm²	160 ± 60	1 ± 0.6	0.002 ± 0.0001	0.08 ± 0.03	17 ± 6	0.001 ± 0.0002	0.07 ± 0.03	0.31 ± 0.09
Fraktale Dimension	-	3	3	1.5 ± 0.2	-	3	1.6 ± 0.2	1.8	3
Agglomeratanteil	%	100	100	80 - 96	7 ± 0.4	92.4 ± 0.2	100	100	100
Residualvolumenanteil	%	0.4*	0.4*	0.2*	0.036 ± 0.007	0.05*	0.013 ± 0.003	-	0.4*
LDH Freisetzung	-	+	o	o	o	(+)	o	o	o
Metabolische Aktivität	-	-	o	o	o	-	o	o	o
IL-8 Freisetzung	-	+	o	-	o	+	o	o	o
COX-2 Induktion	-	+	o	-	o	+	o	o	o
p38 Aktivierung	-	+	o	-	o	+	-	-	-

Tabelle 7: Zusammenfassung der in ALI Experimenten deponierten Partikeltypen und -Dosen, sowie die dabei beobachtete inflammatorische und zytotoxische Wirkung auf A549 Zellen. Alle Angaben entsprechen dem Mittelwert und dazugehörigen Standardabweichung aus den durchgeführten Versuchen. Die biologische Wirkung wird gekennzeichnet durch ein + für einen signifikanten, o für einen unterhalb der Nachweisgrenze liegenden Effekt und mit - für einen nicht untersuchten Endpunkt.

5.7.1 Gefahr durch Nanopartikel?

Eine pauschalisierende Aussage zu der von Nanopartikeln ausgehenden Gefahr oder gesundheitsschädlichen Wirkung ist aus den in Abschnitt 5.6 präsentierten Ergebnissen natürlich nicht möglich. Zwar lässt sich aus den Expositionsversuchen unter ALI Bedingungen für die untersuchten Metalloxide keine akute Toxizität für die A549 Zellen mit realistischen Dosiswerten beobachten. Allerdings konnten auch durch die Expositionen unterhalb der maximalen Tagesdosis mit den als biologisch relativ potent bekannten Kohlenstoff- bzw. Dieselrußpartikeln keine nachweisbaren zytotoxischen oder inflammatorischen Effekte induziert werden.

Trotz der nur bei hohen Dosen induzierten und schwachen Effekte kann eine gesundheitsschädliche Wirkung der Partikel nicht ausgeschlossen werden. Zum einen ist die verwendete A549 Epithelzelllinie nicht repräsentativ für alle in der Lunge vorhandenen Zelltypen und zum anderen treten Epithelzellen in der Lunge nicht wie in den Expositionsversuchen als Monokultur auf. In Realität finden sich mehr als 40 verschiedene, untereinander agierende Zelltypen in einer Lunge [Müller et al., 2010]. Des Weiteren handelt es sich bei den vorgestellten Experimenten um akute Expositionen der Zellen über Zeiträume weniger Stunden. Die Folgen einer chronischen Exposition über einen langen Zeitraum können damit nicht beurteilt werden. Zu guter Letzt wurde nur eine geringe Anzahl an möglichen Endpunkten betrachtet. Mit den zytotoxischen und inflammatorischen Endpunkten wurde lediglich ein Teil aller denkbaren, direkten Effekte untersucht. Weitere, insbesondere auch sekundäre Effekte durch z.B. die Translokation von Partikeln in die Blutbahn oder in andere Organe und daraus möglicherweise resultierende gesundheitsschädliche Folgen, können daher mit den vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden. Allerdings relativiert die hohe Stabilität der Agglomerate bzw. Aggregate großtechnisch synthetisierter Nanopartikelpulver einige der möglichen Gefahren durch synthetische Nanopartikel.

6 Zusammenfassung

Im Projekt NANO-SYNCC (Nanoparticles: Synthesis, characterisation, and cellular effects) des DFG Schwerpunktprogramm 1313 „Biological Responses to Nanoscale Particles“ bildete diese Arbeit die Schnittstelle zwischen der maßgeschneiderten Erzeugung von Nanopartikeln in der Flammen- und Mikrowellenplasmasynthese, sowie der Aufklärung von biologischen Wirkmechanismen in Lungenzellen. Zu diesem Zweck wurde eine Anlage zur Erzeugung luftgetragener Nanopartikel und deren wohl definierte Deposition auf menschlichen Lungenzellen aufgebaut, charakterisiert und zur Untersuchung der toxikologischen Wirkung von Metalloxidnanopartikeln auf Lungenepithelzellen des Typs A549 eingesetzt.

Die Aerosolerzeugung erfolgte dabei durch das Versprühen von wässrigen Nanopartikelsuspensionen mit einem Elektrospray und Atomizer sowie direkt über die Pyrolyse von Tetraethylorthosilikat (TEOS) in der Gasphase. Mit dem Elektrospray konnten dabei Aerosole sowohl aus monodispersen und stabilisierten Partikelsuspensionen, als auch aus gasphasensynthetisierten Nanopartikelpulvern mit hohen Anzahlkonzentrationen erzeugt werden. Im Gegensatz zu den stabilisierten Suspensionen mit Monomeranteilen von mehr als 90% erwiesen sich die Agglomerate der gasphasensynthetisierten Partikel als zu stabil zur Erzeugung eines signifikanten Monomeranteils. Mit einem neuen Verfahren zur Partikelabscheidung ist es aber gelungen, Nanopartikel direkt aus der Mikrowellenplasmasynthese in einer stabilisierenden Lösung abzuscheiden und mit dem Elektrospray zu resuspendieren. Auf diese Weise konnten Monomeranteile zwischen 4% und 20% realisiert werden. Ein noch höher konzentriertes Aerosol mit Monomeranteilen zwischen 40% und 80% konnte durch die pyrolytische Synthese von SiO_2 Nanopartikeln aus TEOS erzeugt werden. Aus dem Elektrospray und der direkten Pyrolyse konnten so Nanopartikelaerosole bestehend aus vornehmlich nicht agglomerierten Primärpartikeln oder auch kleinen Agglomeraten aus typischerweise 2 bis 30 Monomeren erzeugt werden. Aerosole mit einem hohen Anteil an größeren Agglomeraten aus wesentlich mehr als 100 Monomeren mit sehr kompakten, nahezu sphärischen Strukturen, wurden zur Verabreichung hoher Massendosen mit einem Atomizer erzeugt. Mit diesen Verfahren zur Aerosolerzeugung konnten gut definierte Nanopartikelaerosole reproduzierbar über mehrere Stunden aus unterschiedlich hergestellten Partikeln mit verschiedenen Agglomeratanteilen und -strukturen, sowie vernachlässigbaren Residualpartikelanteilen für Expositionsversuche an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (ALI) zur Verfügung gestellt werden.

Zur Deposition der luftgetragenen Nanopartikel unter kontrollierten Bedingungen mit wohl definierten Dosen wurde auf Basis eines Expositionsmoduls der Firma Vitrocell die ALIDA (Air-Liquid-Interface-Deposition-Apparatus) aufgebaut. Dieses System ermöglicht die Exposition von Zellen unter physiologischen

Bedingungen mit einer über viele Stunden stabilen Temperatur und hohen relativen Feuchte bei Variabilitäten von weniger als 0.4°C und 2% relativer Feuchte. Unter diesen Bedingungen wurden A549 Lungenepithelzellen bis zu 7 Stunden ohne eine Abnahme der Vitalität gegenüber den Laborkontrollen in der ALIDA behandelt. Aufgrund der Langzeitstabilität von Temperatur und Feuchte sind auch längere Expositionen, z.B. über mehrere Tage, möglich. Zurzeit ist die maximale Expositionsdauer durch das Wachstum von Bakterien oder Hefen in den Zellen auf ca. 4-5 Tage begrenzt.
Zur Dosisbestimmung der auf den Zellen abgeschiedenen Nanopartikel wurde eine Prozedur zur Analyse der in der Expositionskammer deponierten Partikelmenge mittels Transmissionselektronenmikroskopie entwickelt. Für die Vorhersage der deponierten Anzahldosen über die applizierten Aerosolkonzentrationen wurde die Depositionseffizienz der in der ALIDA eingesetzten Expositionsmodule für einen weiten Partikelgrößen- und Dichtebereich bestimmt. Die schmalen Größenverteilungen, der mit dem Elektrospray erzeugten Aerosole, ermöglichten dabei die experimentelle Bestimmung der Depositionseffizienz für unterschiedliche Partikelgrößen. Mit ihnen konnte ein zur Simulation der Depositionseffizienz entwickeltes Modell validiert und auf Partikel anderer Dichte und Struktur erweitert werden. Auf der Grundlage dieser Simulationen wurde die Depositionseffizienz für sphärische Partikel mit Durchmessern zwischen 20 nm und 2 μm und mit Partikeldichten von 1 g/cm^3 bis 10 g/cm^3 parametrisiert. Daneben erlauben die Modellrechnungen Aussagen über die Depositionseffizienz von nicht sphärischen, fraktalähnlichen Agglomeraten.
Zur Erhöhung der maximal möglichen Depositionsraten wurden die Expositionsmodule mit Elektroden zur elektrostatischen Abscheidung von Nanopartikeln auf Lungenzellen ausgestattet. Über einen weiten Größenbereich konnte so die Depositionseffizienz der Aerosolpartikel um mehr als eine Größenordnung verbessert werden, ohne dass die angelegten Spannungen von bis zu 1000 Volt einen signifikanten Einfluss auf die Zellkulturen hatten. Damit ist es möglich Lungenzellen in der ALIDA innerhalb weniger Stunden Dosen auszusetzten, die dem mehrfachen einer realistischen Tagesdosis entsprechen.

Die ALIDA wurde eingesetzt um die zytotoxische und inflammatorische Wirkung luftgetragener SiO_2, TiO_2, Dieselruß und Carbon Black Nanopartikel zu untersuchen. Mit realistischen Dosen für Partikel kleiner als 100 nm konnte keine Wirkung auf A549 Lungenepithelzellen nachgewiesen werden. Erst bei einer Exposition der A549 Zellen mit großen Aerosil200 und SiO_2 70 Agglomeraten konnten für Massendosen von 80 μg/cm^2 bzw. 120 μg/cm^2 die gleichen Reaktionen (LDH und IL 8 Freisetzung, COX-2 Induktion, p38 Aktivierung) wie in Submersversuchen beobachtet werden. Ebenfalls in Übereinstimmung mit Submersversuchen zeigte sich trotz der etwas geringeren Massendosis eine stärkere zytotoxische und inflammatorische Wirkung der Aerosil200 Partikel, was vermut-

lich auf die höhere Oberflächendosis von 160 cm^2/cm^2 gegenüber 17 cm^2/cm^2 der SiO_2 70 Partikel zurückzuführen ist. Eine höhere Sensitivität im Vergleich zu den Submersversuchen konnte dagegen mit der ALIDA nicht nachgewiesen werden. Stattdessen fielen die akuten Zellreaktionen bei Expositionen von A549 Lungenzellen mit Aerosil200 und SiO_2 70 Partikeln an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht deutlich schwächer aus als in Submersversuchen. Eine mögliche Ursache ist die Schutzwirkung von Schichten oberflächenaktiver Substanzen, die durch die Lungenzellen an der Grenzschicht zur Luft gebildet werden. Möglicherweise lässt sich die Empfindlichkeit der ALIDA jedoch durch die Verwendung anderer Zelllinien oder Kokulturen noch deutlich verbessern.

7 Ausblick

Aufgrund der gut charakterisierten Depositionseffizienz ermöglicht die ALIDA die Durchführung von Expositionsversuchen mit einer gut definierten Anzahldosis. Damit auch die Angabe der Massen- und Oberflächendosis, insbesondere für Agglomerate, verbessert werden kann, ist eine experimentelle Bestimmung der Massengrößenverteilungen, z.B. über ein Aerosolpartikelmassenanalysator, denkbar. Um weiterhin auch die Dosisbestimmung im Fall der elektrostatisch erhöhten Depositionsraten weiter zu vereinfachen, kann die Homogenität der Beladungsdichte sowie die Depositionseffizienz in zukünftigen Arbeiten für die bisher nicht betrachteten Partikelgrößen- und Spannungsbereiche bestimmt werden. Insbesondere eine parametrisierte Darstellung beider Größen für eine definierte Ladungsverteilung könnte den Zeitaufwand zur Planung und Durchführung eines ALI Experiments weiter verringern.

Abgesehen von den Verbesserungen in der Bestimmung der deponierten Dosis ist eine vereinfachte Bewertung des toxischen Potentials und der zugrundeliegenden Wirkmechanismen durch sensiblere Endpunkte und empfindlichere Zellmodellsysteme möglich. Besonders Verfahren mit denen auch bei realistischen Dosen an Nanopartikelmonomeren Zellreaktionen nachgewiesen werden können sind für die Aufklärung grundlegender Zell-Partikel-Wechselwirkungen interessant. Dafür kommen neben weiteren biologischen Verfahren, wie z.B. der Genexpressionsanalyse, auch andere Zelllinien in Frage. Insbesondere die Verwendung von Kokulturen aus verschiedenen und untereinander kommunizierenden Zelltypen sind dabei als noch realistischeres Zellmodellsystem eine interessante Alternative.

Abbildungsverzeichnis

1 Deposition inhalierter Partikel im respiratorischen Trakt 4
2 Epithelbarriere in verschiedenen Bereichen der menschlichen Lunge 5
3 Mögliche Folgen bei einer Inhalation von Nanopartikeln 6
4 Grundsatz der Risikobewertung in der Toxikologie 8
5 Vergleich zwischen submerser und ALI Exposition 11
6 Wechselwirkungpotential flüssig suspendierter Nanopartikel 20
7 Detektionslimit einer Quartzmikrowaage zur Dosisbestimmung . . 28
8 Mittlerer quadratischer Versatz simulierter Partikel durch Diffusion in einem konstanten Strömungsfeld 34
9 Schematischer Aufbau zur Flüssigabscheidung Mikrowellenplasmasynthetisierter Nanopartikel 39
10 Schematische Darstellung des Aufbaus zur Synthese von SiO_2 Nanopartikeln unter 40
11 Schematische Darstellung des Aerosolbefeuchters 43
12 Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus 44
13 Aufbau der Elektrode zur elektrostatischen Abscheidung geladener Partikel auf Lungenzellen 45
14 Bestimmung der Größenverteilung und Beladungsdichte aus TEM Aufnahmen 46
15 Verteilung der Beladungsdichte aus verschiedenen TEM Aufnahmen eines Experiments 47
16 Modell zur Simulation des Strömungsfelds innerhalb einer Expositionskammer 48
17 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Simulation der Depositionseffizienz 50
18 Aerosolangebot bei einer Zellexposition mit 50 nm SiO_2 Partikeln von Postnova 53
19 Aerosolangebot bei einer Zellexposition mit Aerosil200 Partikeln . 54
20 Aerosolangebot bei einer Zellexposition mit SiO2 MWP Partikeln 54
21 Aerosolangebot bei einer Zellexposition mit TiO2 Nanopartikeln aus der Flammensynthese 55
22 Aerosolangebot bei einer Zellexposition mit Printex 90 Kohlenstoffpartikeln 56
23 Aerosolangebot der Zellexposition mit Dieselrußpartikeln 57
24 Größenverteilung der Residualpartikel aus den genutzten Stammlösungen 59
25 Anzahlgrößenverteilungen aus verdünnten Ludox AS40 Suspensionen 60
26 Agglomerat und Residualanteile für die SiO_2 70 Partikel 61
27 Abhängigkeit der Aerosolkonzentration und des Agglomeratanteils von der Konzentration der Ausgangssuspension 62

28 Erzeugte Größenverteilungen aus kommerziellen Partikelsuspensionen . . . 63
29 Größenverteilung Resusupendierter TiO_2 Nanopartikel aus der Flammensynthese . . . 66
30 Konzentrationsabhängigkeit der Anzahlgrößenverteilungen von resusupendierten TiO_2 20 Nanopartikeln aus der Flammensynthese . 67
31 Anzahlgrößenverteilungen von Fe_2O_3 10 Partikeln aus der Mikrowellenplasmasynthese . . . 68
32 Agglomerate deponierter SiO_2 40 Partikel . . . 69
33 Anzahlgrößenverteilung der SiO_2 40 Aerosolpartikel aus dem Elektrospray . . . 70
34 Anzahlgrößenverteilung von Aerosil200 Partikeln . . . 71
35 Anzahlgrößenverteilung flüssig abgeschiedener SiO_2 Partikel aus der Mikrowellenplasmasynthese . . . 72
36 EDX Spektrum flüssig abgeschiedener SiO_2 Partikel aus der Mikrowellenplasmasynthese . . . 73
37 Stabilität der flüssig abgeschiedenen Partikel . . . 74
38 Zeitlicher Verlauf der Partikelkonzentration im Flüssigabscheider . 75
39 Anzahlgrößenverteilungen der SiO_2 Nanopartikel aus der pyrolytischen Zersetzung von TEOS für verschiedene Syntheseparameter . 76
40 Abhängigkeit des Partikeldurchmessers vom Gesamtfluss und der Precursorkonzentration des TEOS Generators . . . 77
41 TEM Aufnahme nicht resuspendierter SiO_2 Partikel aus eigener Synthese . . . 77
42 Größenverteilung deponierter SiO_2 Partikel aus dem TEOS Generator . . . 78
43 Verschiedene Agglomeratstrukturen von SiO_2 70 Partikeln . . . 82
44 Agglomeratstrukturen resuspendierter Partikel aus der Gasphasensynthese . . . 83
45 Abschätzung der fraktalen Dimension für Agglomerate der TiO_2 20 und SiO_2 MWP Partikel . . . 84
46 Größenverteilung des TiO_2 20 Aerosols mit Mobilitäts-, Massen- und Oberflächenäquivalentem Durchmesser . . . 85
47 Mit dem Atomizer erzeugte Cluster aus Agglomeraten gasphasensynthetisierter Partikel . . . 87
48 Abhängigkeit zwischen relativer Feuchte und Wassertemperatur des Befeuchters . . . 88
49 Temperatur und Feuchteverlauf während eines Expositionsversuchs 89
50 Zytotoxische Wirkung durch die Zellexpositionen bei unterschiedlichen CO_2 Konzentrationen in der ALIDA . . . 90
51 Einfluss der Elektroden auf die zytotoxische Wirkung synthetischer Luft auf A549 Zellen . . . 90

52 Geschwindigkeitsverteilung innerhalb der Expositionskammer . . . 92
53 Zur Simluation der Partikeltrajektorien verwendetes Strömungsfeld 93
54 Position der Partikel am Einlass und Ausslass der Aerosolzufuhr . 94
55 Partikeltrajektorien und Depositionswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Ausgangsposition 95
56 Abhängigkeit der Depositionseffizienz von R' und deren Verlauf für Partikel mit einer Dichte von 1 g/cm^3 95
57 Abhängigkeit der Depositionseffizienz vom Partikeldurchmesser für sphärische Nanopartikel 96
58 Abhängigkeit der Depositionswahrscheinlichkeit und Depositionsrate 50 nm großer Partikel von der Dichte 97
59 Einfluss der Partikeldichte auf R' 97
60 Depositionseffizienz in Abhängigkeit der Partikelgröße und Dichte 98
61 Depositionseffizienz fraktalähnlicher Agglomerate in Abhängigkeit der fraktalen Dimension und Primärpartikelgröße 99
62 Anzahlgrößenverteilung deponierter Partikel ohne Elektrode . . . 100
63 TEM Aufnahmen deponierter Partikel ohne Elektrode 101
64 Vergleich der experimentell bestimmten und simulierten Werte der Depositionseffizienz 102
65 Elektrisches Feld innerhalb der Expositionskammer 103
66 Radiale und senkrechte Komponente der elektrischen Feldstärke bei 1 kV 104
67 Inhomogenität der Beladungsdichte unter Annahme eines homogenen elektrischen Feldes der Stärke 500 V/mm 105
68 Experimentell bestimmte Depositionseffizienz verschiedener Partikel mit Elektrode 106
69 Größenverteilungen der mit Elektrode deponierten Partikel 107
70 Depositionsraten der Expositionskammern mit und ohne Elektrode im Vergleich zu realistischen Expositionen 108
71 LDH Freisetzung nach einer Exposition von A549 Zellen mit nicht agglomerierten SiO_2 70 Partikeln 109
72 Zytotoxische Antwort von A549 Zellen auf eine Exposition gegenüber den SiO_2 MWP Partikeln 110
73 Größenverteilung der auf Zellen deponierten SiO_2 MWP Partikel . 111
74 Zytotoxische Antwort von A549 Zellen auf eine Exposition mit Aerosil200 Partikeln ohne Elektrode 112
75 Zytotoxische und inflammatorische Antwort von A549 Zellen auf eine Exposition mit Aerosil200 Partikeln unter Verwendung der Elektrode 112
76 Deponierte Größenverteilung und Dosis in Abhängigkeit der aplizierten Dosis bei einer Exposition von Aerosil200 Partikeln mit elektrostatischem Feld 113

77 Deponierte Größenverteilung und Dosis in Abhängigkeit der mit dem Atomizer applizierten Dosis bei einer Exposition von SiO_2 70 Partikeln mit elektrischem Feld 114
78 LDH Freisetzung und IL-8 Induktion bei einer Exposition mit 120 $\mu g/cm^2$ SiO_2 70 Agglomeraten 115
79 Induktion der COX-2 und p38 Phosphorylierung nach einer SiO_2-Nanopartikelbehandlung unter submersen Bedingungen und an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht 116
80 Größenverteilung der auf A549 Zellen deponierten TiO_2 MWP Partikel 117
81 Zytotoxische Antwort von A549 Zellen auf TiO_2 Partikel 118
82 Vergleich der gemessenen und simulierten Beladungsdichter eines Expositionsversuchs mit Printex 90 Partikeln 119
83 Zytotoxische Antwort von A549 Zellen auf eine Exposition mit 140 ng/cm^2 Printex 90 Partikeln an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht 120
84 HO-1 Induktion nach einer Exposition von A549 Zellen mit 140 ng/cm^2 Printex 90 120
85 Bestimmung der Primärpartikeldosis aus der Projektionsfläche deponierter Dieselrusspartikel 121
86 LDH Freisetzung und IL 8 Induktion nach einer Exposition mit Dieselrusspartikeln 122

Tabellenverzeichnis

1 Niedrigste Testkonzentration ohne beobachtete Wirkung von SiO_2 Nanopartikeln auf Lungenepithelzellen (A549) 10
2 Verwendete kommerzielle Partikelsuspensionen 36
3 Verwendete gasphasensynthetisierte Nanopartikelpulver und deren Eigenschaften 36
4 Zusammensetzung des zur Exposition verwendeten Nährmediums 51
5 Übersicht über die durchgeführten Expositionsversuche 57
6 Vergleich der experimentell bestimmten Depositionseffizienzen mit den simulierten Werten 102
7 Ergebnisse der durchgeführten Expositionsversuche 125

Literatur

H. Ackler. Comparisons of hamaker constants for ceramic systems with intervening vacuum or water: From force laws and physical properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(2):460 – 469, 1996.

M. Al-Rawi, S. Diabaté, and C. Weiss. Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized sio2 particles in hela cells. *Archives of Toxicology*, 85:813–826, 2011.

E. Alfaro-Moreno, T. S. Nawrot, B. M. Vanaudenaerde, M. F. Hoylaerts, J. A. Vanoirbeek, B. Nemery, and P. H. M. Hoet. Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban pm10. *European Respiratory Journal*, 32(5):1184 – 1194, 2008.

M. D. Allen and O. G. Raabe. Slip correction measurements of spherical solid aerosol particles in an improved millikan apparatus. *Aerosol Science and Technology*, 4(3):269–286, 1985.

A. Anikeenko and N. N. Medvedev. Polytetrahedral nature of the dense disordered packings of hard spheres. *Phys. Rev. Lett.*, 98:235504, 2007.

AnsysEurope. Theory. *ANSYS CFX-Solver, Release 10.0*, 2005.

B. Asgharian, W. Hofmann, and R. Bergmann. Particle deposition in a multiple-path model of the human lung. *Aerosol Science and Technology*, 34 (4):332 – 339, 2001.

M. U. Aufderheide, M. Cultex - an alternative technique for cultivation and exposure of cells of the respiratory tract to airborne pollutants at the air/liquid interface. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 52(3):265–270, 2000.

L. L. B. Derjaguin. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physico Chemica*, 14:633, 1941.

M. Baggiolini and I. Clark-Lewis. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, 307(1):97 – 101, 1992.

W. Baumann, B. Thekedar, H. Paur, and H. Seifert. Characterisation of nanoparticles synthesized in the microwave plasma discharge process by particle mass spectrometry and transmission electron microscopy. *News Forschungszentrum Karlsruhe*, 37:89 – 95, 2005.

V. Baumans. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Therapy*, 11 Suppl 1:S64 – 6, 2004.

R. Beyaert, A. Cuenda, W. Vanden Berghe, S. Plaisance, J. C. Lee, G. Haegeman, P. Cohen, and W. Fiers. The p38/rk mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 15(8):1914 – 1923, 1996.

G. Biskos, V. Vons, C. U. Yurteri, and A. Schmidt-Ott. Generation and sizing of particles for aerosol-based nanotechnology. *KONA Powder and Particle Journal*, 26(26):13 – 35, 2008.

E. Bitterle, E. Karg, A. Schroeppel, W. Kreyling, A. Tippe, G. Ferron, O. Schmid, J. Heyder, K. Maier, and T. Hofer. Dose-controlled exposure of a549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere*, 65(10):1784 – 1790, 2006.

C. Blum. Herstellung und modifizierung von nanopartikeln auf basis von anorganischen polykondensaten - dissertation. 2004.

D. Boldridge. Morphological characterization of fumed silica aggregates. *Aerosol Science and Technology*, 44(32):182 – 186, 2010.

P. J. A. Borm. Particle toxicology: From coal mining to nanotechnology. *Inhalation Toxicology*, 14(3):311 – 324, 2002.

A. M. Brasil, T. L. Farias, and M. G. Carvalho. A recipe for image characterization of fractal-like aggregates. *Journal of Aerosol Science*, 30(10): 1379 – 1389, 1999.

D. M. Brown, M. R. Wilson, W. MacNee, V. Stone, and K. Donaldson. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175(3):191 – 199, 2001.

J. S. Brown, K. L. Zeman, and W. D. Bennett. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(9):1240 – 1247, 2002.

T. Butz, T. Reinert, T. Pinheiro, P. Moretto, J. Pallon, A. Z. Kiss, J. Stachura, W. Dabros, Z. Stachura, J. Lekki, M. Lekka, J. Hunyadi, T. Biro, M. Sticherling, L. V. Vaeck, P. V. Royen, and J.-E. Surleve-Bazeille. Nanoderm: Quality of skin as a barrier to ultra-fine particles - final report. 2007.

W.-M. Catenhusen, A. Grobe, and B. Bendisch. Verantwortlicher umgang mit nanotechnologien. *Bericht und Empfehlungen der NanoKommission der deutschen Bundesregierung*, 2008.

D. L. Chapman. Li. a contribution to the theory of electrocapillarity. *Philosophical Magazine Series 6*, 25(148):475 – 481, 1913.

D.-R. Chen and D. Y. H. Pui. Experimental investigation of scaling laws for electrospraying: Dielectric constant effect. *Aerosol Science and Technology*, 27 (3):367 – 380, 1997.

D.-R. Chen, D. Y. H. Pui, and S. L. Kaufman. Electrospraying of conducting liquids for monodisperse aerosol generation in the 4 nm to 1.8 [mu]m diameter range. *Journal of Aerosol Science*, 26(6):963 – 977, 1995.

Y.-S. Cho, G.-R. Yi, Y. S. Chung, S. B. Park, and S.-M. Yang. Complex colloidal microclusters from aerosol droplets. *Langmuir*, 23(24):12079 – 12085, 2007.

M. Cloupeau and B. Prunet-Foch. Electrostatic spraying of liquids in cone-jet mode. *Journal of Electrostatics*, 22(2):135 – 159, 1989.

B. Curwin and S. Bertke. Exposure characterization of metal oxide nanoparticles in the workplace. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 8(10):580 587, 2011.

C. C. Daigle, D. C. Chalupa, F. R. Gibb, P. E. Morrow, G. Oberdörster, M. J. Utell, and M. W. Frampton. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhalation Toxicology*, 15(6):539 – 552, 2003.

K. de Bruijne, S. Ebersviller, K. G. Sexton, S. Lake, D. Leith, R. Goodman, J. Jetters, G. W. Walters, M. Doyle-Eisele, R. Woodside, H. E. Jeffries, and I. Jaspers. Design and testing of electrostatic aerosol in vitro exposure system (eaves): An alternative exposure system for particles. *Inhalation Toxicology*, 21(2):91–101, 2009.

L. de Juan and J. F. de la Mora. Charge and size distributions of electrospray drops. *Journal of Colloid and Interface Science*, 186(2):280 – 293, 1997.

J. Desantes, X. Margot, A. Gil, and E. Fuentes. Computational study on the deposition of ultrafine particles from diesel exhaust aerosol. *Journal of Aerosol Science*, 37(12):1750 – 1769, 2006.

K. Ehara, C. Hagwood, and K. J. Coakley. Novel method to classify aerosol particles according to their mass-to-charge ratio - aerosol particle mass analyser. *Journal of Aerosol Science*, 27(2):217 – 234, 1996.

J. O. E.J.W. Verwey. *Theory of the stability of lyophobic colloids.* Dover Pubn Inc, 1948.

S. Froeschke, S. Kohler, A. P. Weber, and G. Kasper. Impact fragmentation of nanoparticle agglomerates. *Journal of Aerosol Science*, 34(3):275 – 287, 2003.

N. A. Fuchs. On the stationary charge distribution on aerosol particles in a bipolar ionic atmosphere. *Pure and Applied Geophysics*, 56:185–193, 1963.

N. A. Fuchs. The mechanics of aerosols. *Pergamon Press*, 1964.

A. M. Gañan-Calvo. 20.o.05 the size and charge of droplets in the electrospraying of polar liquids in cone-jet mode, and the minimum droplet size. *Journal of Aerosol Science*, 25(Supplement 1):309 – 310, 1994.

M. Gaestel. Mapkap kinases - mks - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7:120 – 130, 2006.

L. GAGNÉ, J. T. CONARY, G. AU LAURIAN, and H. SCHREIER. Simulated lung transfection by nebulization of liposome cdna complexes using a cascade impactor seeded with 2-cfsmeo-cells. *Journal of Aerosol Medicine*, 11(1):1 – 13, 1998.

P. Gehr and J. Heyder, editors. *Particle-Lung Interactions*, volume 143. 2000.

W. Gerstner. Crystal form and particle size of organic pigments in printing inks and paints. *JOURNAL OF THE OIL & COLOUR CHEMISTS ASSOCIATION*, 49(11):954 – 973, 1966.

G. Gouy. *J. Phys. Radium*, 9:457, 1910.

J. Grace and J. Marijnissen. A review of liquid atomization by electrical means. *Journal of Aerosol Science*, 25(6):1005 – 1019, 1994.

D. Grahame. The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. *Chemical Reviews*, 41(3):441 – 501, 1947.

A. Grobe, C. Schneider, M. Rekic, and V. Schetula. Nanomedizin chancen und risiken. *Gutachten im Auftrag der Friedrich-Ebert-Stiftung*, 2008.

H. Hamaker. The london–van der waals attraction between spherical particles. *Physica*, 4(10):1058 – 1072, 1937.

L. H. Hanus, R. U. Hartzler, and N. J. Wagner. Electrolyte-induced aggregation of acrylic latex. 1. dilute particle concentrations. *Langmuir*, 17(11): 3136–3147, 2001.

W. C. Hinds. *Aerosol technology : properties, behavior, and measurement of airborne particles.* A Wiley-Interscience publication. Wiley, 2. ed. edition, 1999. ISBN 0-471-19410-7.

J. Hoffbauer. Verwendung von nanopartikeln in lebensmitteln und kosmetika statusbericht. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3: 290 – 293, 2008.

A. L. Holder, D. Lucas, R. Goth-Goldstein, and C. P. Koshland. Cellular response to diesel exhaust particles strongly depends on the exposure method. *Toxicological Sciences*, 103(1):108 – 115, 2008.

E. P. Honig, G. J. Roebersen, and P. H. Wiersema. Effect of hydrodynamic interaction on the coagulation rate of hydrophobic colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 36(1):97 – 109, 1971.

T. Hoshino, S. Kato, N. Oka, H. Imaoka, T. Kinoshita, S. Takei, Y. Kitasato, T. Kawayama, T. Imaizumi, K. Yamada, H. A. Young, and H. Aizawa. Pulmonary inflammation and emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(1):49 – 62, 2007.

A. J. Hurd and W. L. Flower. In situ growth and structure of fractal silica aggregates in a flame. *Journal of Colloid and Interface Science*, 122(1):178 – 192, 1988.

A. J. Hurd, D. W. Schaefer, and J. E. Martin. Surface and mass fractals in vapor-phase aggregates. *Phys. Rev. A*, 35:2361 – 2364, 1987.

J. Hyeon-Lee, G. Beaucage, S. E. Pratsinis, and S. Vemury. Fractal analysis of flame-synthesized nanostructured silica and titania powders using small-angle x-ray scattering. *Langmuir*, 14(20):5751 – 5756, 1998.

A. Ibald-Mulli, H.-E. Wichmann, W. Kreyling, and A. Peters. Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *Journal of aerosol medicine the official journal of the International Society for Aerosols in Medicine*, 15 (2):189 – 201, 2002.

N. Ibaseta and B. Biscans. Fractal dimension of fumed silica: Comparison of light scattering and electron microscope methods. *Powder Technology*, 203(2): 206 – 210, 2010.

ICRP. Human respiratory model for radiological protection. *Annals of the ICRP*, 24(1-3):1 – 300, 1994.

D. Kerner and V. Leiner. Bestimmung der ionenverteilung in waessrigen dispersionen von unbehandelten und oberflaechenmodifizierten sio2-teilchen aus zetapotentialmessungen. *Colloid & Polymer Science*, 253:960 – 968, 1975.

S. C. Kim, D.-R. Chen, C. Qi, R. M. Gelein, J. N. Finkelstein, A. Elder, K. Bentley, G. Oberdörster, and D. Y. H. Pui. A nanoparticle dispersion method for in vitro and in vivo nanotoxicity study. *Nanotoxicology*, 4(1):42 – 51, 2010.

C. Knieke, C. Steinborn, S. Romeis, W. Peukert, S. Breitung-Faes, and A. Kwade. Nanoparticle production with stirred-media mills: Opportunities and limits. *Chemical Engineering & Technology*, 33(9):1401 – 1411, 2010.

E. Knutson and K. Whitby. Aerosol classification by electric mobility: apparatus, theory, and applications. *Journal of Aerosol Science*, 6(6):443 – 451, 1975.

M. Kobayashi, F. Juillerat, P. Galletto, P. Bowen, and M. Borkovec. Aggregation and charging of colloidal silica particles: Effect of particle size. *Langmuir*, 21(13):5761 – 5769, 2005.

W. G. Kreyling, M. Semmler, F. Erbe, P. Mayer, S. Takenaka, H. Schulz, G. Oberdörster, and A. Ziesenis. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65 (20):1513 – 1530, 2002.

W. G. Kreyling, S. Hirn, and C. Schleh. Nanoparticles in the lung. *Nat Biotechnol*, 28(12):1275 – 6, 2010.

B. K. Ku, S. S. Kim, Y. D. Kim, and S. Y. Lee. Direct measurement of electrospray droplets in submicron diameter using a freezing method and a tem image processing technique. *Journal of Aerosol Science*, 32(12):1459 – 1477, 2001.

J. A. Kurkela, D. P. Brown, J. Raula, and E. I. Kauppinen. New apparatus for studying powder deagglomeration. *Powder Technology*, 180(1-2):164 – 171, 2008.

U. Lahl. Feinstaub eine gesundheitspolitische herausforderung. 2005.

A. A. Lall, W. Rong, L. Mädler, and S. K. Friedlander. Nanoparticle aggregate volume determination by electrical mobility analysis: Test of idealized aggregate theory using aerosol particle mass analyzer measurements. *Journal of Aerosol Science*, 39(5):403 – 417, 2008.

R. Landsiedel, L. Ma-Hock, A. Kroll, D. Hahn, J. Schnekenburger, K. Wiench, and W. Wohlleben. Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Advanced Materials*, 22:1 – 27, 2010.

I. Larson and P. Attard. Surface charge of silver iodide and several metal oxides. are all surfaces nernstian? *Journal of Colloid and Interface Science*, 227(1):152 – 163, 2000.

I. W. Lenggoro, B. Xia, K. Okuyama, and J. F. de la Mora. Sizing of colloidal nanoparticles by electrospray and differential mobility analyzer methods. *Langmuir*, 18(12):4584 – 4591, 2002.

I. W. Lenggoro, H. M. Lee, and K. Okuyama. Nanoparticle assembly on patterned plus/minus surfaces from electrospray of colloidal dispersion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303(1):124 – 130, 2006.

A. Lenz, E. Karg, B. Lentner, V. Dittrich, C. Brandenberger, B. Rothen-Rutishauser, H. Schulz, G. Ferron, and O. Schmid. A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1):32, 2009.

Y. Leonga and B. Ongb. Critical zeta potential and the hamaker constant of oxides in water. *Powder Technology*, 134:249 254, 2003.

A. Li and G. Ahmadi. Dispersion and deposition of spherical particles from point sources in a turbulent channel flow. *Aerosol Science and Technology*, 16 (4):209–226, 1992.

J. Li, S. Kartha, S. Iasvovskaia, A. Tan, R. K. Bhat, J. M. Manaligod, K. Page, A. R. Brasier, and M. B. Hershenson. Regulation of human airway epithelial cell il-8 expression by map kinases. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(4):L690–L699, 2002.

M. Li, S. Guha, R. Zangmeister, M. J. Tarlov, and M. R. Zachariah. Quantification and compensation of nonspecific analyte aggregation in electrospray sampling. *Aerosol Science and Technology*, 45(7):849 – 860, 2011.

C.-H. Luo, W.-M. G. Lee, Y.-C. Lai, C.-Y. Wen, and J.-J. Liaw. Measuring the fractal dimension of diesel soot agglomerates by fractional brownian motion processor. *Atmospheric Environment*, 39(19):3565 – 3572, 2005.

N. Mandzy, E. Grulke, and T. Druffel. Breakage of tio2 agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions. *Powder Technology*, 160(2): 121 – 126, 2005.

V. N. Manoharan, M. T. Elsesser, and D. J. Pine. Dense packing and symmetry in small clusters of microspheres. *Science*, 301(5632):483 – 487, 2003.

U. R. Mbonye and I. Song.

R. Merget, T. Bauer, H. Küpper, S. Philippou, H. Bauer, R. Breitstadt, and T. Bruening. Health hazards due to the inhalation of amorphous silica. *Archives of Toxicology*, 75:625 – 634, 2002.

L. Müller, M. Riediker, P. Wick, M. Mohr, P. Gehr, and B. Rothen-Rutishauser. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *Journal of the Royal Society Interface*, 7 Suppl 1:S27 – 40, 2010.

D. Morse, S. E. Pischke, Z. Zhou, R. J. Davis, R. A. Flavell, T. Loop, S. L. Otterbein, L. E. Otterbein, and A. M. K. Choi. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the jnk pathway and ap-1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39):36993 – 36998, 2003.

H. B. Na, I. C. Song, and T. Hyeon. Inorganic nanoparticles for mri contrast agents. *Advanced Materials*, 21(21):2133 – 2148, 2009.

O. Nalcaci, D. Akten, M. SCHMITT, and H. Bockhorn. Effect of precursor concentration on iron oxide formation; an experimental and predictive modeling approach. *Journal of Nanoparticle Research*, 2011.

K.-H. Naumann. Cosima–a computer program simulating the dynamics of fractal aerosols. *Journal of Aerosol Science*, 34(10):1371 – 1397, 2003.

A. Nel, T. Xia, L. Mädler, and N. Li. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761):622 – 627, 2006.

G. Nichols, S. Byard, M. J. Bloxham, J. Botterill, N. J. Dawson, A. Dennis, V. Diart, N. C. North, and J. D. Sherwood. A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91 (10):2103–2109, 2002.

G. Oberdörster, E. Oberdörster, and J. Oberdörster. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113(7):823 839, 2005.

G. Oberdörster, V. Stone, and K. Donaldson. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1(1):2 25, 2007.

M. L. Ostraat, K. A. Swain, and J. J. Krajewski. Sio2 aerosol nanoparticle reactor for occupational health and safety studies. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 5(6):390–398, 2008.

L. E. Otterbein and A. M. K. Choi. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6):L1029 – L1037, 2000.

A. Pacek, P. Ding, and A. Utomo. Effect of energy density, ph and temperature on de-aggregation in nano-particles/water suspensions in high shear mixer. *Powder Technology*, 173(3):203 – 210, 2007.

A. Panas. Toxizität und pro-inflammatorisches potenzial verschiedener metalloxid nanopartikel in lungenzellen - dissertation. 2011.

A. Panas, C. Weiss, and S. Diabate. Screening of different metal-oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epethelial cells and macrophages. *Nanotoxicology*, 2011.

H.-R. Paur, S. Mülhopt, C. Weiss, and S. Diabaté. In vitro exposure systems and bioassays for the assessment of toxicity of nanoparticles to the human lung. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3:319 – 329, 2008.

H.-R. Paur, F. R. Cassee, J. Teeguarden, H. Fissan, S. Diabate, M. Aufderheide, W. G. Kreyling, O. Hänninen, G. Kasper, M. Riediker, B. Rothen-Rutishauser, and O. Schmid. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung-a dialog between aerosol science and biology. *Journal of Aerosol Science*, 42(10):668 – 692, 2011.

C. S. K. Peter A. Jaques. Measurement of total lung deposition of inhaled ultrafine particles in healthy men and women. *Inhalation Toxicology*, 12(8): 715 – 731, 2000.

M. Pohl, S. Hogekamp, N. Q. Hoffmann, and H. P. Schuchmann. Dispergieren und desagglomerieren von nanopartikeln mit ultraschall. *Chemie Ingenieur Technik*, 76(4):392 – 396, 2004.

C. A. Pope and D. W. Dockery. Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 56: 709 – 742, 2006.

C. A. Pope, R. T. Burnett, G. D. Thurston, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, and J. J. Godleski. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution. *New England Journal of Medicine*, 109: 71 – 77, 2004.

C. A. Pope, M. Ezzati, and D. W. Dockery. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the united states. *New England Journal of Medicine*, 360 (4):376 – 386, 2009.

R. Prasher, P. E. Phelan, and P. Bhattacharya. Effect of aggregation kinetics on the thermal conductivity of nanoscale colloidal solutions (nanofluid). *Nano Letters*, 6(7):1529 – 1534, 2006.

A. Raz, A. Wyche, N. Siegel, and P. Needleman. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 263(6):3022 – 3028, 1988.

R. J. Renka and A. K. Cline. A triangle-based c^1 interpolation method. *Journal of Mathematics*, 14(1):223 – 237, 1984.

R. J. Robinson, P. Snyder, and M. J. Oldham. Comparison of particle tracking algorithms in commercial cfd packages: Sedimentation and diffusion. *Inhalation Toxicology*, 19(6 - 7):517 – 531, 2007.

B. Rothen-Rutishauser, R. N. Grass, F. Blank, L. K. Limbach, C. Mühlfeld, C. Brandenberger, D. O. Raemy, P. Gehr, and W. J. Stark. Direct combination of nanoparticle fabrication and exposure to lung cell cultures in a closed setup as a method to simulate accidental nanoparticle exposure of humans. *Environmental Science & Technology*, 43(7):2634 – 2640, 2009.

H. Saathoff, K.-H. Naumann, M. Schnaiter, W. Schöck, E. Weingartner, U. Baltensperger, L. Krämer, Z. Bozoki, U. Pöschl, R. Niessner, and U. Schurath. Carbon mass determinations during the aida soot aerosol campaign 1999. *Journal of Aerosol Science*, 34(10):1399 – 1420, 2003.

K. Sato, J.-G. Li, H. Kamiya, and T. Ishigaki. Ultrasonic dispersion of tio2 nanoparticles in aqueous suspension. *Journal of the American Ceramic Society*, 91(8):2481 – 2487, 2008.

C. Sauter and H. P. Schuchmann. High pressure for dispersing and deagglomerating nanoparticles in aqueous solutions. *Chemical Engineering & Technology*, 30(10):1401 – 1405, 2007.

C. Sauter, M. Emin, H. Schuchmann, and S. Tavman. Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4):517 – 523, 2008.

M. Savi, M. Kalberer, D. Lang, M. Ryser, M. Fierz, A. Gaschen, J. Ricka, and M. Geiser. A novel exposure system for the efficient and controlled deposition

of aerosol particles onto cell cultures. *Environmental Science & Technology*, 42(15):5667–5674, 2008.

L. Schiller and Z. Naumann. A drag coefficient correlation. *Z. Ver. Dtsch. Ing. 1933*, 77(3):318 – 320, 1933.

O. Schmid, W. Möller, M. Semmler-Behnke, G. A. Ferron, E. Karg, J. Lipka, H. Schulz, W. Kreyling, and T. Stoeger. Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers*, 14(s1):67 – 73, 2009.

S. Schwyn, E. Garwin, and A. Schmidt-Ott. Aerosol generation by spark discharge. *Journal of Aerosol Science*, 19(5):639 – 642, 1988.

J. Seagrave, S. Dunaway, J. D. McDonald, J. L. Mauderly, P. Hayden, and C. Stidley. Responses of differentiated primary human lung epithelial cells to exposure to diesel exhaust at an air-liquid interface. *Experimental Lung Research*, 33(1):27 – 51, 2007.

K. Seibert, Y. Zhang, K. Leahy, S. Hauser, J. Masferrer, W. Perkins, L. Lee, and P. Isakson. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25):12013 – 12017, 1994.

M. Seipenbusch, S. Rothenbacher, M. Kirchhoff, H.-J. Schmid, G. Kasper, and A. Weber. Interparticle forces in silica nanoparticle agglomerates. *Journal of Nanoparticle Research*, 12:2037–2044, 2010.

M. Semmler, J. Seitz, F. Erbe, P. Mayer, J. Heyder, G. Oberdörster, and W. G. Kreyling. Long-term clearance kineics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhalation Toxicology*, 16(6-7):453 – 459, 2004.

H. Shi, C. Kleinstreuer, Z. Zhang, and C. Kim. Nanoparticle transport and deposition in bifurcating tubes with different inlet conditions. *PHYSICS OF FLUIDS*, 16(7):2199 – 2213, 2004.

J. E. Skebo, C. M. Grabinski, A. M. Schrand, J. J. Schlager, and S. M. Hussain. Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. *International Journal of Toxicology*, 26(2): 135–141, 2007.

M. Smoluchowski. Investigation into a mathematical theory of the kinetics of coagulation of colloidal solutions. *Z phys Chem*, 92:129 – 168, 1917.

R. Society. Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties. *Royal Society: The Royal Academy of Engineering Report*, 2004.

M. Sommer, F. Stenger, W. Peukert, and N. Wagner. Agglomeration and breakage of nanoparticles in stirred media mills–a comparison of different methods and models. *Chemical Engineering Science*, 61(1):135 – 148, 2006.

B. Stahlmecke, S. Wagener, C. Asbach, H. Kaminski, H. Fissan, and T. Kuhlbusch. Investigation of airborne nanopowder agglomerate stability in an orifice under various differential pressure conditions. *Journal of Nanoparticle Research*, 11:1625–1635, 2009.

W. Stöber and A. Fink. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, 26:62 – 69, 1968.

J. Stevens, J. Zahardis, M. MacPherson, B. Mossman, and G. Petrucci. A new method for quantifiable and controlled dosage of particulate matter for in vitro studies: The electrostatic particulate dosage and exposure system (epdexs). *Toxicology in Vitro*, 22(7):1768 – 1774, 2008.

T. Stoeger, O. Schmid, S. Takenaka, and H. Schulz. Inflammatory response to tio2 and carbonaceous particles scales best with bet surface area. *Environmental Health Perspectives*, 115(6):290 – 291, 2007.

M. Stoelzel, S. Breitner, J. Cyrys, M. Pitz, G. Woelke, W. Kreyling, J. Heinrich, H.-E. Wichmann, and A. Peters. Daily mortality and particulate matter in different size classes in erfurt, germany. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 17:458 467, 2007.

G. Taylor. Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 280 (1382):383 – 397, 1964.

J. G. Teeguarden, P. M. Hinderliter, G. Orr, B. D. Thrall, and J. G. Pounds. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, 95(2):300 – 312, 2007.

A. Tippe, U. Heinzmann, and C. Roth. Deposition of fine and ultrafine aerosol particles during exposure at the air/cell interface. *Journal of Aerosol Science*, 33(2):207 – 218, 2002.

Vitrocell. 2011. URL `www.vitrocell.com/index.php?Nav_Nummer=3&SubNav_Nummer=2&SubSubNav_Nummer=25`.

R. Wagner, H. Bunz, C. Linke, O. Möhler, K.-H. Naumann, H. Saathoff, M. Schnaiter, and U. Schurath. *Chamber Simulations of Cloud Chemistry:*

The AIDA Chamber, volume 62 of *NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences*. Springer Netherlands, 2006. ISBN 978-1-4020-4232-4.

S. C. Wang and R. C. Flagan. Scanning electrical mobility spectrometer. *Aerosol Science and Technology*, 13(2):230 – 240, 1990.

K. Wegner, S. E. Pratsinis, and M. Koehler. *Chemische Technik: Prozesse und Produkte. Neue Technologien*. Number 2 in Winnacker, Chemische Technik(VCH) Series. Wiley-VCH, 5 edition, 2004. ISBN 3-527-31032-0.

M. Wentzel, H. Gorzawski, K.-H. Naumann, H. Saathoff, and S. Weinbruch. Transmission electron microscopical and aerosol dynamical characterization of soot aerosols. *Journal of Aerosol Science*, 34:1347 1370, 2003.

H. E. Wichmann and A. Peters. Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 358(1775): 2751 – 2768, 2000.

A. Wiedensohler. An approximation of the bipolar charge distribution for particles in the submicron size range. *Journal of Aerosol Science*, 19(3):387 – 389, 1988.

H.-C. Yeh and G. Schum. Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition. *Bulletin of Mathematical Biology*, 42:461 – 480, 1980.