

Multifunktionalisierte Magnetische Nanopartikel als Drug-Delivery Systeme

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen-Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes**

von

Eva-Marie Prinz

Saarbrücken

2011

Tag des Kolloquiums: 07.12.2011

Dekan: Prof. Dr. W.F. Maier

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Hempelmann
Junior-Prof. Dr. M. Schneider

Vorsitz: Prof. Dr. G. Jung

Akad. Mitarbeiter: Dr. A. Rammo

Kurzfassung

Der Schwerpunkt dieser Dissertation liegt in der Synthese von multifunktionalen, magnetischen Nanopartikeln für biomedizinische Anwendungen. Hierbei werden Nanopartikel der Stöchiometrie $Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe_2O_4$ (MnZn-MNP) durch kontrollierte Fällung der entsprechenden Metallchloride in Natronlauge synthetisiert. Anschließend wird deren Oberfläche durch verschiedene Verfahren (z. B. Layer-by-Layer-Verfahren) mit ausgewählten biokompatiblen Polymeren (z. B. Dextran-Derivate, diverse Polyelektrolyte, Bisphosphonate, usw.) beschichtet und mit Doxorubicin, einem Chemotherapeutikum, oder ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen, wie beispielsweise FITC oder DAPI, funktionalisiert. Die erfolgreiche Anbindung des Doxorubicins bzw. des Fluoreszenzmarkers an beschichtete MnZn-MNP wird mittels dynamischer Lichtstreuung, Fluoreszenz-Korrelations-, Raman-, FT-IR-, UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie, sowie Zetapotential-Messungen nachgewiesen. Ein mögliches Einsatzgebiet diese Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP stellt die adoptive Krebsimmuntherapie dar, bei der vor allem T-Zellen als autonome und Ziel-spezifische Drug-Delivery Systeme verwendet werden, weshalb das Potential dieser Partikel zuerst *in-vitro* getestet wird. Dazu wird mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie sowie TEM die Aufnahme von Wirkstoff-funktionalisierten MnZn-MNP in T-Zellen nachgewiesen. Die Aktivität dieser funktionalisierten MnZn-MNP auf Krebszellen wird durch SRB- und MTT-Assays charakterisiert. Die synthetisierten, multifunktionalen MnZn-MNP zeigen insgesamt ein hohes Potential für eine spätere medizinische Anwendung. Hierbei verbinden diese die physiko-chemischen Eigenschaften der Nanopartikel mit der therapeutischen Aktivität des Wirkstoffs.

Abstract

The focus of this thesis is the synthesis of multifunctional magnetic nanoparticles for biomedical applications. Biocompatible ferrites of the chemical composition $Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe_2O_4$ (MnZn-MNP) are synthesized by the co-precipitation of the corresponding metal chlorides in sodium hydroxide solution. For application in biological organisms, the surface of the nanoparticles is coated with selected biocompatible polymers (e. g. dextran derivatives, different polyelectrolytes or bisphosphonates) using different techniques (e. g. layer-by-layer technique). In a further step the so coated MnZn-MNP are functionalized with Doxorubicin, a chemotherapeutic drug, or different fluorescence dye like FITC or DAPI. The successful bonding of Doxorubicin or dye to the coated MnZn-MNP is characterized using dynamic light scattering, fluorescence-correlation-, Raman-, FT-IR-, UV/Vis- and fluorescence-spectroscopy. These functionalized particles are intended to be used in adoptive cancer immunotherapy, a new approach where immune cells, especially T lymphocytes, will be exploited as autonomous drug-delivery systems with high target specificity. Following this the potential of Doxorubicin-functionalized nanoparticles is tested *in-vitro*. The uptake efficiency of the modified MnZn-MNP into T lymphocytes is verified by fluorescence and confocal microscopy. Thus, among others, the cytotoxic effect evoked on T lymphocytes is determined and drug release kinetics are monitored. Due to this the drug loaded particles show a high potential for future drug delivery applications. The modified magnetic nanoparticles combine the physico-chemical properties of the nanoparticles with the therapeutic effectivity of the drug.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN.....	VII
DANKSAGUNGEN	XI
1. EINLEITUNG UND MOTIVATION	1
2. THEORETISCHER TEIL	5
2.1 NANOPARTIKEL UND IHRE POTENTIALE FÜR BIOMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN....	5
2.1.1 NANOTECHNOLOGIE: EINE ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	5
2.1.2 ANFORDERUNGEN AN NANOPARTIKEL IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN.....	6
2.1.3 ZELLULÄRE AUFNAHMEMECHANISMEN.....	9
2.1.4 ZELLSYSTEME FÜR BIOMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN	12
2.1.5 ANWENDUNGSBEREICHE VON MAGNETISCHEN NANOPARTIKELN IN DER MEDIZIN.....	14
2.1.6 TOXIZITÄT VON NANOPARTIKELN.....	20
2.2 FERROFLUIDE.....	23
2.2.1 EINE ALLGEMEINE EINLEITUNG.....	23
2.2.2 ALLGEMEINE SYNTHESEROUTEN VON MAGNETISCHEN FLÜSSIGKEITEN.....	24
2.2.3 STABILISIERUNG VON FERROFLUIDEN.....	29
2.2.4 KRISTALLOGRAPHISCHE EIGENSCHAFTEN	31
2.2.5 MAGNETISCHE EIGENSCHAFTEN	34
2.2.6 RELAXATIONSVERHALTEN VON FERROFLUIDEN	40
2.2.7 ANWENDUNGSBEREICHE	41
2.3 LAYER-BY-LAYER-VERFAHREN ZUM AUFBAU VON MULTIFUNKTIONALEN SCHICHTEN	45
2.3.1 LAYER-BY-LAYER-DEPOSITION	45
2.3.2 AUFBAU VON POLYELEKTROLYT-MULTISCHICHTEN.....	47
2.3.3 ANWENDUNGSBEREICHE	49
3. METHODISCHER TEIL	52
3.1 SCHWINGUNGSSPEKTROSKOPIE	52
3.1.1 EINFÜHRUNG IN DIE SCHWINGUNGSSPEKTROSKOPIE.....	52
3.1.2 FT-IR-SPEKTROSKOPIE	55
3.1.3 RAMAN-SPEKTROSKOPIE.....	57
3.2 FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE	59
3.2.1 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZ	59
3.2.2 FLUORESZENZ-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE.....	60
3.2.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS: FLUORESCENCE ACTIVATING CELL SORTER) ...	63
3.3 ZETAPOTENTIAL	65
3.3.1 ELEKTROSTATISCHE WECHSELWIRKUNG.....	65

3.3.2	MESSUNG VON ZETAPOTENTIALEN	66
4.	BIOMEDIZINISCH FUNKTIONALISIERTE NANOPARTIKEL.....	69
4.1	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON FERROFLUIDEN	69
4.1.1	SYNTHESE VON MANGAN-ZINK-FERROFLUIDEN	69
4.1.2	CHARAKTERISIERUNG DER SYNTHETISIERTEN MNZN-FERROFLUIDEN.....	70
4.1.3	KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	79
4.2	DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN MODIFIZIERUNGSWEGE VON DEXTRAN	80
4.2.1	CHARAKTERISIERUNG VON DEXTRAN	80
4.2.2	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON POLYALDEHYD-DEXTRAN.....	82
4.2.3	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON CARBOXYMETHYL-DEXTRAN	85
4.2.4	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON ETHYLENDIAMIN-CARBOXYMETHYL- DEXTRAN	87
4.2.5	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON HYDRAZIN-CARBOXYMETHYL-DEXTRAN	90
4.2.6	ZUSAMMENFASSUNG.....	92
4.3	DARSTELLUNG DER FUNKTIONALISIERUNG VON MAGNETISCHEN NANOPARTIKELN.	94
4.3.1	BESCHICHTUNG UND FUNKTIONALISIERUNG DER NANOPARTIKEL	94
4.3.2	ANALYSE DER PH-ABHÄNGIGEN SPALTUNG DER HYDRAZON-BINDUNG	115
4.3.3	CHARAKTERISIERUNG DOXORUBICIN-FUNKTIONALISierter NANOPARTIKEL MITTELS FLUORESCENZ-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (FCS).....	118
4.3.4	LANGZEITSTUDIE ZUR ÜBERPRÜFUNG DER STABILITÄT VON (UN)-BESCHICHTETEN MANGAN-ZINK-MNP-SUSPENSIONEN	122
4.3.5	ABSCHLIEßENDE ZUSAMMENFASSUNG	124
5.	AUFNAHME VON SYNTHETISIERTEN DRUG-DELIVERY SYSTEMEN IN T-ZELLEN	126
5.1	BIOLOGISCHE VORTESTS ZUR SPEZIFITÄT VON BELADENEN T-ZELLEN	126
5.1.1	CHARAKTERISIERUNG DES BISPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERS	126
5.1.2	ANALYSE DER ZYTOTOXISCHEN WIRKUNG VON BESCHICHTETEN PARTIKELN AUF T-ZELLEN.....	128
5.2	AUFNAHME VON DOXORUBICIN-FUNKTIONALISIERTEN MNZN-MNP IN T-ZELLEN ...	130
5.2.1	CHARAKTERISIERUNG VON BELADENEN T-ZELLEN.....	130
5.2.2	ANALYSE DES ZYTOTOXISCHEN EFFEKTS VON DOXORUBICIN-FUNKTIONALISIERTEN NANOPARTIKELN AUF T-ZELLEN.....	137
5.3	ZUSAMMENFASSUNG.....	140

6.	DARSTELLUNG MULTIFUNKTIONALER NANOPARTIKEL MITTELS LAYER-BY-LAYER-TECHNIK	142
6.1	AUFBAU VON MULTISCHICHTSYSTEMEN AUF PARTIKELOBERFLÄCHEN	142
6.1.1	LAYER-BY-LAYER-DEPOSITION VON POLYALLYLAMIN UND POLYARCYLSÄURE	143
6.1.2	LAYER-BY-LAYER-DEPOSITION MITTELS POLYALLYLAMIN UND POLY(4-STYROLSULFONSÄURE-CO-MALEINSÄURE)	149
6.1.3	AUFBAU EINES MULTISCHICHTSYSTEMS MITTELS POLYETHYLENIMIN UND POLY(4-STYROLSULFONSÄURE-CO-MALEINSÄURE)	156
6.2	BIOMEDIZINISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON MULTISCHICHTSYSTEMEN	163
6.2.1	BIOMEDIZINISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON (PAH / PSSA-CO-MA)-BESCHICHTETEN MNZN-MNP	163
6.2.2	BIOMEDIZINISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON (PEI / PSSA-CO-MA)-BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN.....	176
6.2.3	CHARAKTERISIERUNG VON DOXORUBICIN-FUNKTIONALISIERTEN LBL-BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN MITTELS FCS	183
6.3	ABSCHLIEßENDE ZUSAMMENFASSUNG	187
7.	FLUORESZENZ-MARKIERTE NANOPARTIKEL ALS MULTIFUNKTIONALE NANOCARRIERS.....	52
7.1	ÜBERSICHT DER VERSCHIEDENEN BESCHICHTUNGSMÖGLICHKEITEN VON NANOPARTIKEL	190
7.1.1	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON ALENDRONsäURE- ODER 1,1-DIPHOSPHONO-2,3-DICARBONSäURE-BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN	191
7.1.2	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON 6-AMINOHEXANSäURE-BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN.....	198
7.1.3	KAPITELZUSAMMENFASSUNG.....	202
7.2	MODIFIZIERUNG BESCHICHTETER NANOPARTIKEL MITTELS FLUORESZENZMARKERN	204
7.2.1	FUNKTIONALISIERUNG VON BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN MIT FITC.....	204
7.2.2	FUNKTIONALISIERUNG VON BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN MIT DAPI	214
7.2.3	KAPITELZUSAMMENFASSUNG.....	219
8.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	221
9.	ANHANG.....	228
9.1	APPARATIVER TEIL.....	228
9.1.1	RAMAN-SPEKTROMETER	228
9.1.2	FT-IR-SPEKTROMETER	229
9.1.3	UV / VIS-SPEKTROMETER	230

9.1.4	FLUORECENCE ACTIVATED CELL SORTER (FACS) UND FLUORESZENZMIKROSKOP	231
9.1.5	FLUORESZENZSPEKTROMETER	232
9.1.6	FLUORESZENZ-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (FCS).....	233
9.1.7	DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG (DLS)	234
9.1.8	RÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE (XRD).....	235
9.1.9	ZETAPOTENTIAL-MESSUNG.....	237
9.1.10	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM) UND ENERGIEDISPERSIVE RÖNTGENSPEKTROSKOPIE (EDX)	237
9.1.11	VIBRATING SAMPLE MAGNETOMETER (VSM).....	238
9.1.12	PH-MESSUNG UND DIALYSE	239
9.2	VERWENDETE CHEMIKALIEN.....	240
9.3	SYNTHESEVORSCHRIFTEN	242
9.3.1	HERSTELLUNG VON BIOMEDIZINISCH FUNKTIONALISIERTEN MNZN-MNP.....	242
9.3.2	BELADUNGEN VON T-ZELLEN MIT DOXORUBICIN-FUNKTIONALISIERTEN NANOPARTIKELN.....	245
9.3.3	HERSTELLUNG VON MULTIFUNKTIONALEN MNZN-MNP MITTELS LBL-TECHNIK	246
9.3.4	HERSTELLUNG VON FLUORESZENZ-MARKIERTEN NANOPARTIKELN.....	247
9.4	TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER VERSCHIEDENEN SCHWINGUNGSARTEN	248
9.5	ZUSÄTZLICHE ABBILDUNGEN.....	250
9.5.1	TEM-AUFNAHMEN VON DEXTRAN-DERIVAT-MNZN-MNP (KAPITEL 4.3)	250
9.6	WEITERE FT-IR-ABBILDUNGEN ZU KAPITEL 6.1	251
9.6.1	ZUSATZINFORMATIONEN ZU (PEI / PAA)-MULTISCHICHTSYSTEMEN	252
9.7	LITERATURVERZEICHNIS.....	253
9.8	VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONFERENZBEITRÄGE	262
9.8.1	WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN	253
9.8.2	KONFERENZBEITRÄGE.....	263

ABKÜRZUNGEN

abs.	absolut
bzw.	beziehungsweise
CMD	Carboxymethyl-Dextran
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliertes
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Dox	Doxorubicin
Dox-CMD-MnZn-NP	Doxorubicin-Carboxymethyl-Dextran funktionalisierte MnZn-Ferrite
Dox-PAD-MnZn-NP	Doxorubicin-Polyaldehyd-Dextran funktionalisierte MnZn-Ferrite
DS	Substitutionsgrad
DTGS	Deutertes Triglycinsulfat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
Ed-CMD	Ethylendiamin-Carboxymethyl-Dextran
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FT	Fourier-Transformation
Gew.-%	Gewichtsprozent
GT	Gefriertrocknung
H-ATR	Horizontal attenuated total reflectance
Hy-CMD	Hydrazin-CMD
IR	Infrarot
LbL	Layer-by-Layer
MnZn-MNP	Mangan-Zink-Ferrofluid
MNP	magnetische Nanopartikel
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PAA	Polyacrylsäure
PAH	Polyallylamin Hydrochlorid
PAD	Polyaldehyd-Dextran
PBS	Phosphat-Buffer-Saline

PDF	Powder Diffraction File
PEI	Polyethylenimin
PEN	Penicillin
PSSa-co-MA	Poly(4-styrolsulfonsäure-co-Maleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium, wurde an diesem Institut entwickelt)
RT	Raumtemperatur
s. Abb.	siehe Abbildung
Strep	Streptomycin
TEM	Transmissions-Elektronen-Miskroskopie bzw. Transmissions-Elektronen-Miskroskop
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochloride
UV	Ultraviolett
Vis	Visible
VSM	Vibrating Sample Magnetometer
XRD	X-Ray Diffraction, Röntgenbeugung

DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben, herzlich bedanken.

Mein herzliches Dankeschön möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Hempelmann aussprechen, für die interessante Themenstellung, für seine finanzielle Unterstützung, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die mir gewährte Freiheit bei ihrer Durchführung. Des Weiteren möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit geboten hat, an mehreren Konferenzen teilzunehmen. Dadurch konnte ich einen interessanten Einblick in die Bereiche der Wissenschaft erhalten. Vielen Dank!

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Junior-Prof. Dr. M. Schneider, dem Zweitgutachter meiner Dissertation und den Mitarbeitern seines Arbeitskreises (Pharmazeutische Nanotechnologie, Universität des Saarlandes) Dr. X. Le Guével und Qiong Lian für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. G. Jung danke ich für die interessanten Anregungen und die Bereitstellung der dazu gehörigen Messgeräte sowie Dagmar Auerbach für die freundliche Unterstützung, Hilfe und Beantwortung der Fragen.

Während der letzten Jahre durfte ich mit verschiedenen Arbeitsgruppen zusammenarbeiten wofür ich mich hiermit für die guten und konstruktiven Kooperationen bedanken möchte. So gilt mein Dank auch Prof. Dr. F. Bonomi und Dr. M. Marengo von der Universität Mailand.

Im Rahmen der DFG-Projekt-Zusammenarbeit mit dem Koreanischen Institut für Wissenschaft und Technologie (KIST) gilt mein Dank vor allem Ruth Eggers für die schöpferischen Ideen und Hilfen. Weiterhin danke ich Korinna Kochinke, Dr. H. Hohmann, Dr. U. Steinfeld und Dr. H.-H. Lee, die ebenfalls am KIST beschäftigt waren und bei der Realisierung des Projekts mitgeholfen haben. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank ebenfalls Prof. Dr. K. Pachmann vom Universitätsklinikum Jena, die mir in ihrem Institut die Anfertigung Fluoreszenz-mikroskopischer Aufnahmen Doxorubicin-beladener T-Zellen ermöglicht hat.

Dr. G. Moldenhauer (DKFZ, Heidelberg), der freundlicherweise den bispezifischen Antikörper zur Verfügung gestellt hatte, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Sylvia Kuhn danke ich für die Anfertigungen der zahlreichen TEM-Aufnahmen und dass sie nie die Geduld verloren hat.

Für die Hilfe beim Korrekturlesen der Arbeit danke ich Dr. M. Schmitt und Dr. R. Szamocki. Ein riesiges Dankeschön gilt in dem Fall Francesco Arena und Martina Kissel, die mit großer Ausdauer jeden kleinen Fehler gesucht und nie die Geduld verloren haben.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an die gesamten Mitglieder des Arbeitskreises für die schönen, unterhaltsamen Mittagspausen und das angenehme Arbeitsklima. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Büronachbarin / Freundin Melanie Mönkemeyer für die vielen schönen und unterhaltsamen aber auch aufmunternden Gespräche. An dieser Stelle gilt mein Dank auch Matthias Wotocek, der mir eine große Hilfe bei den XRD-Messungen war.

Meiner Mutter und Roland sowie meiner gesamten Familie, meinem Freund und meinen Freunden danke ich von Herzen dafür, dass sie mich bis jetzt auf meinem Lebensweg begleitet und unterstützt haben. **Vielen Dank!**

1. EINLEITUNG UND MOTIVATION

Die genauen Ursachen von Krebs sind trotz intensiver Forschung noch immer unbekannt, obwohl Krebs die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen in der westlichen Welt darstellt. Um die Heilung von Krebs voranzutreiben, verfolgten Wissenschaftler und Mediziner in den letzten Jahren verschiedene Strategien. Neben Operationen, Chemotherapie und Bestrahlung spielt dabei auch die Immuntherapie eine große Rolle. Die Immuntherapie nutzt hierbei die Spezifität und Sensitivität des Immunsystems aus, welches für die vermehrte Ausschüttung der T-Zellen sorgt, die wiederum für die Zerstörung der Tumorzellen zuständig sind.

In den letzten Jahren hat sich parallel dazu ebenfalls der Bereich der Nanotechnologie stark weiterentwickelt und damit neue Wege und Möglichkeiten eröffnet. Diese Weiterentwicklung reichte bis in den biomedizinischen und pharmakologischen Sektor und so wurden nanostrukturierte Materialien als Wirkstofftransportmittel umfunktioniert. Auf diese Weise ist es zum Beispiel möglich, hydrophobe Wirkstoffe in nanostrukturierte Materialien mit einzubauen, die somit eine hydrophile Oberfläche simulieren, um vom Körper aufgenommen zu werden. Sollten Polymere, die langsam im Körper abgebaut werden, zur Verkapselung verwendet werden, kann dadurch gleichzeitig eine gezielte und kontrollierte Wirkstofffreisetzung erreicht werden. Durch den Einsatz von magnetischen Nanopartikeln (magnetische Drug Targeting) können gezielte Wirkstoffpositionierungen im Körper durchgeführt werden, welches gleichzeitig eine Verminderung der Wirkstoffkonzentration und der damit verbundenen Nebenwirkungen generiert. Durch magnetische Drug Targeting besteht so die Möglichkeit die Freisetzung des Wirkstoffs am Bestimmungsort zu erreichen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der magnetisch gesteuerte Wirkstoffpositionierung, d. h. im magnetischen Drug Targeting von in Immunzellen (T-Zellen) befindlichen, Wirkstoff-funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln, sowie eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung für eine zukünftige Krebsbehandlung. Dabei impliziert die kontrollierte Wirkstofffreisetzung die Fähigkeit, die Verteilung des Wirkstoffs im Körper sowohl räumlich als auch zeitlich zu steuern. Ziel ist es somit, in der betroffenen Tumorregion die Wirkstoffkonzentration im hohen therapeutischen Bereich und im restlichen Körper unter der Toxizitätsschwelle zu halten. Durch die damit erhöhte pharmakologische Wirkung kann die Gesamtdosierung verringert und die Nebenwirkungen gesenkt werden. Weiterhin sollen T-Zellen, die mit Wirkstoff-funktionalisierten Nanopartikeln inkubiert sind, diese Partikel vor Angriffen des retikuloendothelialen Systems schützen, um so eine frühzeitige Ausschleusung über die Leber, Nieren und Milz zu vermeiden. Zudem fördern die T-Zellen das selbständige Auffinden des Tumorgewebes, wodurch auch schwer zugängliche Regionen erreicht werden können.

Die ersten Schritte zur Realisierung solcher Drug-Delivery Systeme werden im Rahmen dieser Arbeit durch Wirkstoff-funktionalisierte MnZn-Ferrite umgesetzt. Dazu werden MnZn-Ferrite, welche als Transportsysteme fungieren, mit Hilfe der Kopräzipitationsmethode der korrespondierenden Metallchloride in Natronlauge gefällt und anschließend mit Citrat-Ionen stabilisiert. Auf Grund der besseren Relaxationseigenschaften, der Oxidationsstabilität gegenüber Luftsauerstoff sowie der besseren Volumenleistungsdichte und der damit verbundenen spezifischen Absorptionsrate (SAR) werden MnZn-Ferrite anstelle von Magnetit verwendet. Der einzige Nachteil gegenüber dem bisher verwendeten Magnetit ist die geringere Sättigungsmagnetisierung M_s , die für MnZn-Ferrite (Gew.-% 10) bei $5,52 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ liegt und für Magnetit (Gew.-% 10) bei $11,23 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$.^[1, 2] Der SAR-Wert für MnZn-Ferrit der Zusammensetzung $\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ liegt bei $65 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ (1,95 MHz; Gew.-% 2) wohingegen der SAR-Wert für Magnetit bei denselben Messbedingungen nur einen Wert von $16 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ aufweist. Dabei steht SAR für die Absorption von elektromagnetischen Feldern im biologischen Gewebe, welche zu dessen Erwärmung führt. Dementsprechend sind vor allem Ferrofluide interessant, die hohe SAR-Werte aufweisen, um für spätere wärmebedingte (z. B. Hochfrequenzfelder) Wirkstofffreisetzung verwendet zu werden.

Für die Beschichtung dieser Citrat-stabilisierten MnZn-Ferrofluide kommen verschiedene Verfahren und Substanzen zum Einsatz. Die Beschichtung der Nanopartikel soll dazu führen, dass die Partikel nicht als Fremdkörper angesehen werden; in diesem Fall würden sie den Wirkungsort nicht erreichen können, da sie direkt über die Leber und Nieren ausgeschieden würden.

Die erste Möglichkeit bietet das Polysaccharid Dextran. Dextran ist vor allem auf Grund der biologischen Abbaubarkeit von besonderem Interesse. Im menschlichen Körper wird es durch verschiedene Dextranasen in Leber, Milz und Niere depolymerisiert. Die hohe Biokompatibilität und die Tatsache, dass es weder immunogen noch antigen ist, zeigen weiter, warum Dextrane als Biopolymere für Drug-Delivery Systeme interessant geworden sind. Bevor ein Wirkstoff an das Polymer gebunden werden kann, muss dieses vorher aktiviert werden. Diese Aktivierung besteht darin, verschiedene funktionelle Gruppen, wie beispielsweise Amin- oder Carboxyl-Gruppen, einzuführen. In dieser Arbeit wird dies durch diverse Synthesewege umgesetzt. Anschließend erfolgt die Anbindung des Wirkstoffs über die Dextran-Derivate an MnZn-Ferrite. Auf Grund der Autofluoreszenz und der damit verbundenen Möglichkeit, Fluoreszenz-mikroskopische Analysemethoden zu verwenden, wird Doxorubicin als potentieller Wirkstoff ausgesucht.

Ein mögliches Einsatzgebiet dieser Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-Nanopartikel ist die adoptive Krebsimmuntherapie. Diese Immuntherapie stellt einen neuen Ansatz der Krebstherapie dar, bei der vor allem Immunzellen und besonders T-Zellen als selbständige Drug-Delivery Systeme, mit einer hohen Ziel-Spezifität, verwendet werden. Unterstützend

wirkt hierbei der T-Zell-Effekt, der über einen T-Zell-spezifischen Rezeptor an die Krebszelle andockt und Granula freisetzt, die zytotoxisch auf die Krebszellen wirken. Der Einsatz eines bispezifischen Antikörpers (bsAb) HEA125xOKT3 fördert die verstärkte Bindung der T-Zellen an die Krebszellen. Durch diese Verwendung wird somit eine räumliche Nähe zwischen T-Zellen und Krebszellen erreicht, die eine gezielte Abgabe des Wirkstoffs an der Krebszelle möglich machen. Um die Aktivität dieser Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-Ferrite in beladenen T-Zellen zu charakterisieren, werden verschiedene Fluoreszenz- und konvokal-mikroskopische Untersuchungen sowie diverse Assays durchgeführt. Des Weiteren wird die Interaktion der funktionalisierten Partikel mit T-Zellen näher untersucht.

Die zweite Möglichkeit, die Beschichtung der Citrat-stabilisierten MnZn-Ferrofluide zu realisieren, besteht in der Verwendung des Layer-by-Layer-Verfahrens. Hierzu werden ausgewählte Polyelektrolyten, wie beispielsweise Polyarcylsäure (PAA), Polyallylamin (PAH) oder Polyethylenimin (PEI), verwendet, um ein Multischichtsystem auf MnZn-MNP aufzubauen. Die anziehende Interaktion zwischen den verschiedenen Schichten beruht auf elektrostatischer Wechselwirkung. Durch die Variationsmöglichkeiten der eingesetzten Polyelektrolyten können verschiedene Wirkstoffe oder Biomoleküle in die verschiedenen Schichten eingelagert werden, um so einen geschützten Wirkstofftransport und eine kontrollierte Freisetzung zu erzielen. Dieser geschützte Wirkstofftransport spielt vor allem bei T-Zellen eine wichtige Rolle. Dadurch wird die Überlebensrate der T-Zellen erhöht und das damit verbundene Zeitfenster, in dem die T-Zellen ihren Wirkungsort (z. B. Krebszellen oder Tumore) erreichen können. Im Rahmen dieses Teilgebiets werden erste Versuche zum Aufbau eines Multischichtsystems auf der MnZn-MNP-Oberfläche und die daran anknüpfende Verkapselung des Wirkstoffs unternommen.

Für die Beschichtung der MnZn-MNP kommen zusätzlich ausgewählte Bisphosphonate zum Einsatz. Die Bisphosphonate weisen eine hohe Affinität zu dem in den Knochen vorkommenden Stoff Hydroxylapatit auf. Auf Grund dieser hohen Affinität stellen diese beschichteten Nanopartikel ein mögliches Einsatzgebiet für die Behandlung von Knochenkrebs dar. Die beschichteten Nanopartikel können mit einem für die Behandlung von Knochenkrebs häufig eingesetzten Wirkstoff, wie beispielsweise Herceptin (im Handel als Trastuzumab bekannt), funktionalisiert werden. Allerdings weist dieser Antikörper keine eigene Fluoreszenz auf, weshalb die beschichteten Partikel zur genaueren Charakterisierung zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden müssen. Zur Fluoreszenzmarkierung der beschichteten Partikel müssen zunächst Synthesen entwickelt und optimiert werden, um anschließend mit dem Wirkstoff modifiziert zu werden. Diese Versuche werden in der vorliegenden Arbeit eingehend erläutert.

Abschließend soll auf die Bindungsstärke zwischen den MnZn-MNP und des eingesetzten Beschichtungsmaterials eingegangen werden. Die verschiedenen Bindungen, die näher

charakterisiert werden sollen, basieren einerseits auf der Wechselwirkung zwischen Carboxyl-Gruppen der Dextran-Derivate und Eisen; andererseits werden diese Bindungen durch die elektrostatische Interaktion der Polyelektrolyte des Multischichtsystems mit den Nanopartikeln hervorgerufen. Ebenfalls untersucht werden die Wechselwirkungen zwischen Phosphonat-Gruppen der Bisphosphonate und MnZn-Ferrite. Dies soll Aufschluss darüber geben, welche der zuvor genannten Bindungen die stärkste Affinität zu den Nanopartikeln aufweist. Denn nur so kann gewährleistet werden, dass der Wirkstoff bzw. die Biomoleküle, in gebundener Form auf den MnZn-MNP, den vorgesehenen Zielort erreichen. Dazu werden die Diffusionszeiten der beschichteten MnZn-MNP mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) bestimmt.

2. THEORETISCHER TEIL

2.1 NANOPARTIKEL UND IHRE POTENTIALE FÜR BIOMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN

2.1.1 NANOTECHNOLOGIE: EINE ALLGEMEINE EINFÜHRUNG

Die Nanotechnologie ist ein fachübergreifendes Zusammenspiel aus Wissenschaft und Technologie. So vereint sie Physik, Chemie, Biologie, Medizin und Ingenieurwissenschaften miteinander.

Richard Feynman gilt auf Grund seines im Jahre 1959 gehaltenen Vortrages „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ als Vater der Nanotechnologie.^[3] Dennoch wurde der Begriff Nanotechnologie erst im Jahre 1974 von Norio Taniguchi verwendet. Taniguchi definierte den Begriff folgendermaßen: “Nano-technology mainly consists of the processing of separation, consolidation, and deformation of materials by one atom or one molecule.”^[4]

Die Vorsilbe nano leitet sich vom griechischen Wort „nanos“ ab, welches wiederum für „Zwerg“ bzw. „zwerghaft“ steht und bezieht sich auf die Größe der Partikel, die normalerweise in einem Bereich von 1 nm bis 100 nm liegt. Ein Nanometer entspricht 10^{-9} m. Als weitere nanoskalige Materialien kommen linienförmige Strukturen (z. B. Nanoröhren), Schichtstrukturen, Poren und andere komplexe Strukturen, wie beispielsweise Dendrimere in Betracht. Auf Grund dieser Größe weisen Nanopartikel, im Gegensatz zu größeren Partikeln, besondere physiko-chemische Eigenschaften auf. Sie besitzen wegen des größeren Verhältnisses von Oberflächen zu Volumen eine höhere chemische Aktivität bzw. Oberflächenenergie, zeigen besondere optische Eigenschaften auf (z. B. Quantum Dots). Die Oberflächenladung sowie die thermodynamischen Effekte und die damit verbundene Selbstorganisation gewinnen ebenfalls an Bedeutung.^[5]

Die Herstellungsweise von Nanomaterial kann auf Grund der Ansatzmöglichkeiten in zwei verschiedene Strategien unterteilt werden, die „Top-down“- und die „Bottom-up“-Strategie. Der „Top-down“-Ansatz wird vor allem in der Physik angewandt und geht von der Miniaturisierung durch geeignete Mikrotechnik von Strukturen und Komponenten aus, wie zum Beispiel bei der Verkleinerung von Computerchips. Hingegen werden beim „Bottom-up“-Ansatz komplexe Strukturen gezielt aus Atomen oder Molekülen hergestellt. Diese Strategie ist eher in der Chemie und Biologie von Bedeutung.^[6] Ein klassisches Verfahren der „Bottom-up“-Strategie spiegelt die Sol-Gel-Synthese wider.

Jedoch ist eine Analyse bzw. Charakterisierung der nanoskaligen Materialien ohne geeignete Technologie nicht möglich. Dies erklärt, warum es sich bei der Nanotechnologie

um eine Schlüsseltechnologie handelt, denn auf Grund der Entwicklung neuartiger Effekte und Materialien wurden ganze Technologiebereiche revolutioniert.

In Abbildung 2.1 sind die verschiedenen, weit reichenden Bereiche der Nanotechnologie dargestellt, die von kommerziell erhältlichen Produkten wie Farbe und Lacke, Sonnencreme und verschiedene Kosmetikartikel bis hin zu hochkomplexen, wissenschaftlichen Geräten wie Rastertunnelmikroskop, Datenspeicher oder Biosensor reichen.

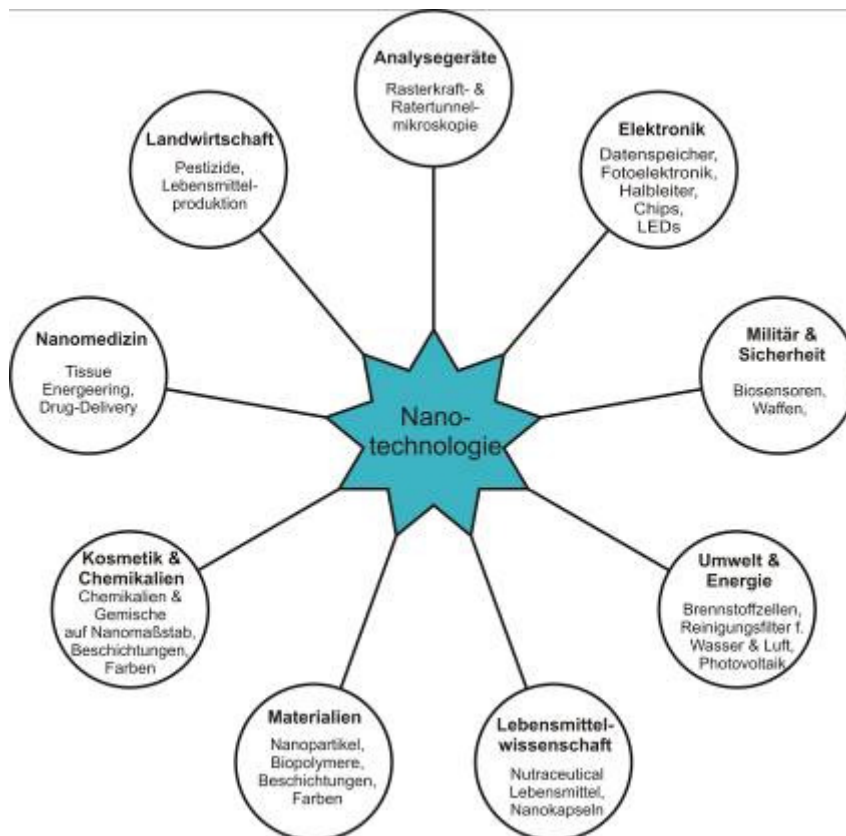


Abbildung 2.1: Darstellung der verschiedenen Anwendungsbereiche der Nanotechnologie.

2.1.2 ANFORDERUNGEN AN NANOPARTIKEL IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN

Magnetische Nanopartikel sind auf Grund ihrer Größe und der damit verbundenen Eigenschaften für die Medizin und für die Biologie von großem Interesse. Durch die Anwendung dieser Partikel öffnen sich neue Wege zur Erforschung und Heilung von Krankheiten, zur Strukturanalyse von Zellen und zur Aufklärung bestimmter Aufnahmemechanismen.

Dabei stellt die Stabilität eine Grundvoraussetzung für die spätere Anwendung von diesen Nanopartikeln dar. In der Medizin ist es zum Beispiel wichtig, ein stabiles Ferrofluid im

physiologischen pH-Bereich zu synthetisieren, da es ansonsten zur Bildung von Agglomeraten kommen kann.

Des Weiteren sind die meisten physiko-chemischen Charakteristika der Partikel von der Größe abhängig. Deshalb müssen die Partikel eine monodisperse Größenverteilung aufzeigen, um die Agglomeratbildung zu unterbinden. Außerdem spielt die Größe der magnetischen Nanopartikel bei den Aufnahmemechanismen in die Zelle eine entscheidende Rolle. Es hat sich gezeigt, dass Partikel einer Größe von 80 nm bis 100 nm bevorzugt aufgenommen werden. Die verschiedenen Aufnahmemechanismen sind in Kapitel 2.1.3 „Zelluläre Aufnahmemechanismen“ beschrieben.

Magnetische Nanopartikel sind auf Grund ihrer hohen Oberflächenenergie bestrebt, diese Energie zu verringern. Dies geschieht in der Regel durch Bildung von Agglomeraten. Die dadurch entstandenen größeren Partikel weisen ein geringeres Oberflächen-zu-Volumen Verhältnis auf. Dieser Prozess wird durch die Stabilisierung der Partikel unterbunden (siehe Kapitel 2.2.3 „Stabilisierung von Ferrofluiden“).

Darüber hinaus ist es notwendig, dass die Nanopartikel bioverträglich und metabolisierbar sind. Ansonsten würden sie als Fremdkörper angesehen und durch Phagozytose direkt aus dem Körper ausgeschieden. Dieser Prozess wird durch die Verkapselung der Nanopartikel mit biologisch verträglichen, nicht toxischen Substanzen erreicht. Solche Substanzen können synthetisch hergestellte Polymere wie Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol oder Polystyrol, aber auch natürlich vorkommende Verbindungen wie Stärke oder Dextran sein. Die verwendeten Polymere binden entweder durch Adsorption oder Wasserstoffbrückenbindungen an der Partikeloberfläche. Trägt das Polymer, welches selbst keine pharmakologische Wirkung zeigt, eine funktionelle Gruppe wie beispielsweise eine Aldehyd-, Amin- oder Carboxyl-Gruppe, so besteht die Möglichkeit, durch kovalente Bindungen ein Therapeutikum an die Außenhülle der Partikel zu binden.^[7] Dabei muss das verwendete Polymer entweder abbaubar sein oder eine poröse Struktur aufweisen, um den Wirkstoff gezielt und kontrolliert abgeben zu können.

Bei Dextranen $[(C_6H_{10}O_5)_n]$ handelt es sich um hoch viskose, hoch molekulare, neutrale Biopolysaccharide auf Basis von Glucose-Monomeren. Die Molekülmasse liegt zwischen 10.000-50.000.000 Da. Dextran wird extrazellulär von Bakterien der Gattung *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* und *L. dextranicum*) mittels Enzymen aus Saccharose hergestellt.^[8] Die Glucosemonomereinheiten sind zu 90 % über α -1,6-Brücken glykosidisch miteinander verbunden. Die Glucoseseitenketten sind hauptsächlich über α -1,3- aber auch durch α -1,4- und α -1,2-Bindungen mit der Hauptkette verknüpft. Eine Kette kann aus 200 bis 450 Glukoseeinheiten bestehen. Eine mögliche Struktur des Dextrans ist in Abbildung 2.2 skizziert.

In der Medizin wird Dextran als Blutplasmaersatzmittel eingesetzt, da eine 6 %-ige Dextran-Lösung die gleiche Viskosität und den gleichen osmotischen Druck wie Blutserum aufweist. Anwendung findet Dextran auch im Lebensmittelsektor. Hier wird es als Verdickungsmittel und als Stabilisator in verschiedenen Back- und Süßwaren sowie in Getränken und Eis verwendet. Auf Grund der Quelleigenschaften werden Dextrane auch als Säulenmaterial für die Gel-Permeation-Chromatographie verwendet.^[9]

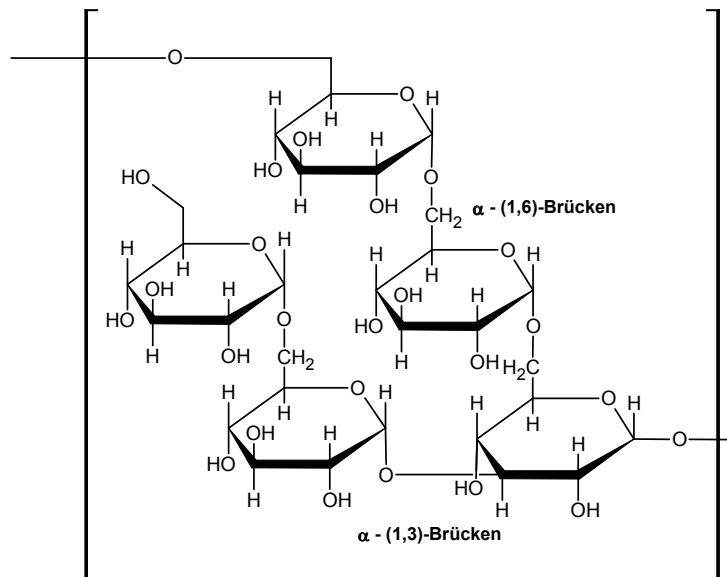


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einer möglichen Struktur von Dextran. Die Glucosemonomereinheiten sind über α -1,6-Brücken miteinander verbunden. Wohingegen die Glucoseseitenketten über α -1,3-Bindungen mit der Hauptkette verknüpft sind.

Als anorganische Substanzen haben sich z. B. Silikatverbindungen und Bisphosphonat-Derivate zur Beschichtung von Partikeln bewährt.

Bisphosphonate sind deshalb in der Medizin von Bedeutung, da sie eine hohe Affinität zu Apatit aufweisen. Apatit ist der anorganische Hauptbestandteil menschlicher Knochen. So können Bisphosphonat-beschichtete Partikel beispielsweise mit einem Wirkstoff funktionalisiert werden, welches gegen Knochenkrebs eingesetzt wird. Bisphosphonate gleichen strukturell gesehen dem Pyrophosphat. Jedoch ist bei den Bisphosphonaten das Sauerstoffatom der P-O-P Bindungen durch Kohlenstoff ausgetauscht. Diese Bindung ist resistent gegen enzymatische Spaltungen.

Durch Änderung der Seitenkette am Kohlenstoffatom kann eine Vielzahl verschiedener Bisphosphonate erhalten werden (siehe Abbildung 2.3). Allerdings hat eine kleine Änderung der Struktur einen großen Einfluss auf die physiko-chemischen sowie auf die biologischen und therapeutischen Eigenschaften der Verbindungen.^[10] Zum Beispiel wirkt Alendronsäure hemmend auf die Aktivität der Osteoklasten (Knochenabbauer), aber fördernd auf die Aktivität der Osteoblasten (Knochenbildner).

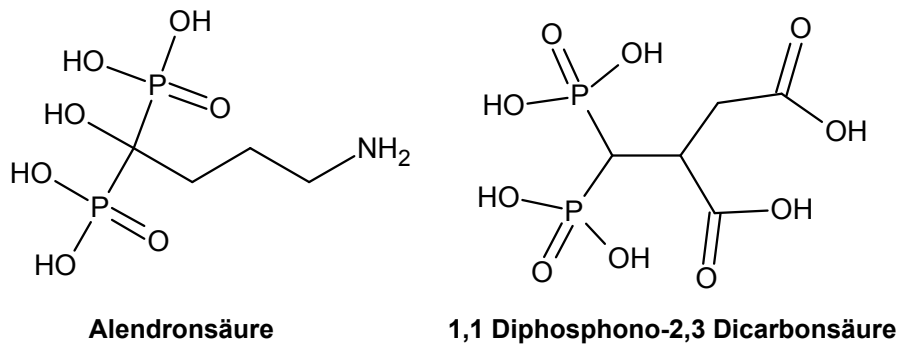


Abbildung 2.3: Darstellung der Struktur ausgewählten Bisphosphonate wie Alendronsäure (links) und 1,1-Diphosphono-2,3-Dicarbonsäure (rechts).

2.1.3 ZELLULÄRE AUFNAHMEMECHANISMEN

Eine Eukaryontenzelle steht in ständiger Verbindung mit ihrer Umgebung, da sie fortwährend auf äußere Reize wie chemische Botenstoffe, Nährstoffangebot, Temperatur und Druck reagiert. Die Zellmembran ist dabei die Struktur, die die Zelle umschließt und den Stofftransport in die Zelle und aus der Zelle hinaus reguliert. Diese Membran ist aus drei Schichten aufgebaut. Die nach außen gerichtete Schicht ist die Glykokalix. Diese besteht aus komplexen Zuckermolekülen, die u. a. zur intrazellulären Kommunikation dienen. Sie ist genetisch festgelegt und für jede Zelle spezifisch. Die darunter liegende Schicht ist eine aus Phospholipiden bestehende Doppelschicht, die 6 nm bis 12 nm dick ist. Dabei zeigen die unpolaren, lipophilen Fettsäureketten in das Innere der Doppelschicht, wohingegen die polaren, hydrophilen Gruppen nach außen gerichtet sind. Diese Doppelschicht wird von innen durch das Zytoskelett stabilisiert.

Das Flüssig-Mosaik-Model kann zur Beschreibung der Membran herangezogen werden. Nach diesem Modell ist die Membran eine zweidimensionale Flüssigkeit, in der bestimmte Proteine, die beispielsweise als Rezeptoren, Ionenkanäle oder Zellkontakte fungieren, verankert sind. Dies lässt sich dadurch erklären, dass eine Membran kein Verbund aus unbeweglichen Schichten starrer Moleküle ist, sondern eine relativ flexible Schicht aus Phospholipiden, die hauptsächlich durch Van-der-Waals-Kräfte miteinander wechselwirken.

In den letzten Jahren rückten sogenannte „Lipid rafts“ in den Fokus der Forschung. Hierbei handelt es sich um Mikrodomänen in der Membran, die einen erhöhten Anteil an Cholesterin, Glycophospholipid und Sphingolipid ausweisen.

Der Transport von Stoffen durch die Membran kann in drei mögliche Mechanismen unterteilt werden. Den ersten Aufnahmemechanismus stellt die Diffusion dar. Durch Diffusion können jedoch nur kleine unpolare Moleküle durch die Plasmamembran transportiert werden,

wohingegen Ionen und andere kleine oder große polare Moleküle diese Barriere nicht überwinden können. Diese Stoffe unterliegen speziellen Aufnahmemechanismen, die in die aktive oder die passive Aufnahme gegliedert werden können. Für den passiven Aufnahmemechanismus von Molekülen in die Zelle wird keine zusätzliche Energie seitens der Zelle benötigt. Entweder diffundieren die Moleküle direkt durch die Lipiddoppelschicht oder sie gelangen durch geöffnete Ionenkanäle in die Zelle. Die passive Aufnahme ist ein Spezialfall der Diffusion, da auch kleine polare Moleküle durch die Membran gelangen können. Größere oder geladene Moleküle passieren nach dem aktiven Aufnahmemechanismus die Membran. So können diese Moleküle entweder durch Passieren von Ionenkanälen oder durch Einstülpung der Membran und das anschließende Abschnüren zu Vesikeln in das Innere der Zelle gelangen. Dieser Prozess lässt sich unter dem Begriff Endozytose zusammenfassen und kann weiter klassifiziert werden.^[11, 12]

Je nach Größe der gebildeten endozytotischen Vesikel wird zwischen Phagozytose („Zell-Fressen“) und Pinozytose („Zell-Trinken“) unterschieden.

Bei der Phagozytose gelangen große, feste, extrazelluläre Partikel (z. B. Mikroorganismen) über Vesikel in die Zelle. Solche Vesikel, deren Durchmesser größer als 250 nm ist, werden als Phagosome bezeichnet (Abbildung 2.4).^[13] Bei der Phagozytose lagern sich die Mikroorganismen zuerst an der Zelloberfläche ab und werden durch Einstülpen der Membran aufgenommen und eingeschlossen. Anschließend werden diese Fremdkörper durch intrazelluläre Prozesse abgebaut („gefressen“). Phagozytose tritt bei bestimmten Zellen, wie zum Beispiel den Makrophagen auf, die eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielen.

Dagegen werden bei der Pinozytose Flüssigkeit und die darin gelösten Stoffe in kleinen Vesikeln (<150 nm im Durchmesser) aufgenommen. Diese Vesikel bilden sich in der Membran aus den sogenannten „Clathrin-Coated Pits“ (Clathrin-bedeckte Mulden). Clathrin ist ein Proteinkomplex, der in der Plasmamembran der Zelle verankert ist.^[13]

Jedoch lässt sich die Pinozytose selbst in vier unterschiedliche Formen gliedern, in die Makropinozytose, die Clathrin-abhängige, die Caveolae-abhängige und die Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose (Abbildung 2.4).^[14] Je nach Größe des Vesikels, Art und Natur des Moleküls (Ligand, Lipid und Rezeptor) und Bildungsmechanismus des Vesikels lassen sich diese vier Formen der Pinozytose unterscheiden. So wird angenommen, dass Partikel zwischen 50 nm und 200 nm eher über die Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen werden, wohingegen Partikel einer Größe von 50 nm bis 80 nm eher den Caveolae-abhängigen Weg folgen.^[15]

Dabei können folgende Prozesse nach der Anlagerung des Stoffs an die Membranoberfläche stattfinden. Nach der Einstülpung der Membran sorgt das Protein Dynamin für das Abschnüren des Vesikels. Direkt nach der Entstehung des Vesikels, welches als frühes Endosom bezeichnet wird, beginnt die Sortierung der aufgenommenen Stoffe. Das Vesikel,

welches noch viele Strukturen der Membran aufweist, wird durch die Zelle transportiert und verändert sich dabei ständig. Der Innenraum des Endosoms weist einen pH-Wert von 6,3 bis 6,8 auf.^[16] Wird das frühe Endosom weiter in die Zelle hinein transportiert, verändert sich das Endosom ständig und wird schließlich zum „späten Endosom“. So fällt beispielsweise der pH-Wert auf 5,0 bis 4,5 ab.^[17] Strukturell gesehen können einige Veränderungen auftreten, zum Beispiel fusionieren mehrere Endosome und bilden somit größere Vesikel aus. Das späte Endosom kann schließlich in einem letzten Umwandlungsschritt in das Lysosom umgewandelt werden.^[18]

Die Ausscheidung von Molekülen aus der Zelle wird als Exozytose bezeichnet. Die Ausschüttung des Vesikels in das umgebende Medium erfolgt, sobald das Vesikel mit der Membran verschmolzen ist.

Für die Biomedizin ist es somit von großem Interesse zu wissen, wie die Drug-Delivery Systeme, seien es Nanopartikel, Mizellen oder Liposomen, in die Zelle aufgenommen werden, wie ihr Verbleib in der Zelle ist und wie sie am Ende wieder abgebaut werden.

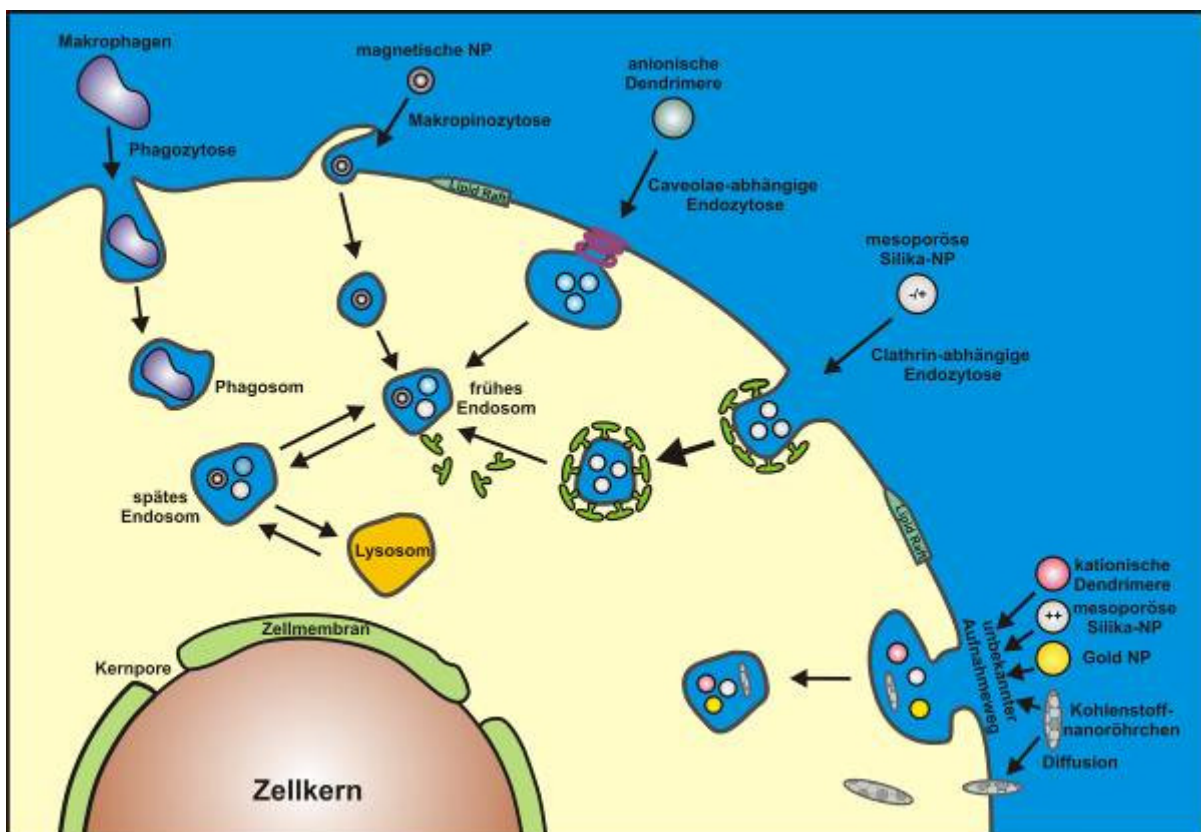


Abbildung 2.4: Darstellung der verschiedenen Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln (NP) in Zellen. Je nach Größe und Art der Nanopartikel unterscheiden sich die Aufnahmewege in die Zelle.

2.1.4 ZELLSYSTEME FÜR BIOMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN

Das Immunsystem kann in das angeborene und das adaptive (erworbene) Immunsystem gegliedert werden. Jedoch stammen alle Zellen des Blutes von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Diese Stammzellen teilen sich in myeloide und in lymphoide Vorläuferzellen auf (siehe Abbildung 2.5).^[19] Die Zellen des angeborenen Immunsystems gehören zu den myeloiden Vorläuferzellen. Aus dieser Reihe entwickeln sich Monozyten, Granulozyten, Blutplättchen und Erythrozyten. Auf Grund des segmentierten Zellkerns werden die Granulozyten auch polymorphkernige Leukozyten genannt. Diese lassen sich wiederum in eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten unterteilen. Die Monozyten differenzieren während der Extravasation in das Gewebe in Makrophagen. Diese Makrophagen zerstören durch Phagozytose eingedrungene Mikroorganismen und werden deshalb auch als Phagozyten bezeichnet. Der wichtigste Speicherort für Monozyten ist die Milz. Die Blutplättchen sind für die Blutgerinnung verantwortlich und die Erythrozyten sind für den Transport von Luftsauerstoff zuständig. Der Hauptbestandteil von Erythrozyten ist Hämoglobin. Circa 99 % aller Infektionen können von dem angeborenen Immunsystem abgewehrt werden.

Die Zellen aus dem adaptiven Immunsystem stammen aus der Reihe der lymphoiden Vorläuferzellen ab. Aus dieser Reihe entwickeln sich T-Lymphozyten, B-Zellen und natürliche Killerzellen. Das Kürzel T oder B steht jeweils für den Ort der Reifung. So reifen die B-Zellen im Knochenmark (englisch Bone Marrow), wohingegen die T-Zellen nach Verlassen des Knochenmarks in den Thymus wandern und dort reifen. Natürliche Killerzellen sind Lymphozyten, die in der Lage sind abnormale Zellen, wie Krebszellen oder infizierte Zellen, zu erkennen und abzutöten. Sie besitzen keinen antigenspezifischen Rezeptor.

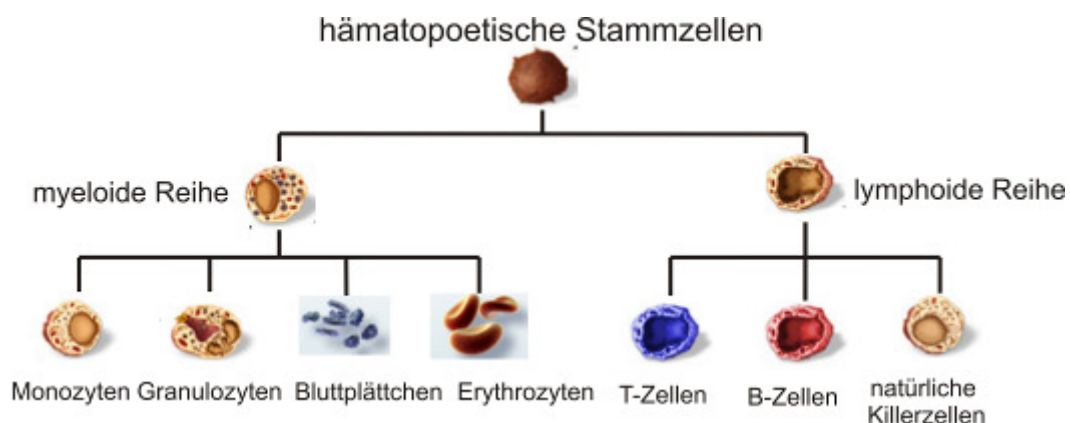


Abbildung 2.5: Graphische Darstellung der Übersicht des hämatopoetischen Stammbaums von Menschen. Die Stammzellen teilen sich in die myeloide und lymphoide Reihe auf.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems erfassen relativ unspezifisch körperfremde Organismen, wohingegen die Antigenerkennung des adaptiven Immunsystems hochspezifisch ist. Jeder Lymphozyt verfügt über einen antigenspezifischen Rezeptor. Dieser ist bei jedem Lymphozyt individuell.

T- Zellen

Die T-Vorläuferzellen entwickeln sich im Thymus zu den reifen T-Zellen. Diese lassen sich in zwei Hauptklassen unterteilen, die T-Zellen, die einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor ($\alpha\beta$ -TCR) tragen und diejenigen mit einem $\gamma\delta$ -Rezeptor ($\gamma\delta$ -TCR).^[19]

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein membrangebundener Rezeptor, der gebildet wird, indem extrazellulär zwei Polypeptidketten über Disulfidbrücken miteinander verknüpft werden. Dabei können entweder α - und β -Ketten oder, in seltenen Fällen, γ - und δ -Ketten miteinander verbunden werden. Der TCR ist verantwortlich für die Erkennung von Antigenen, nicht aber für die Übertragung von Signalen und die damit verbundene Aktivierung der T-Zelle. Dafür fehlt dem Rezeptor die notwendige zytosmatische Domäne. Diese Funktion wird vom CD3-Rezeptor (Proteinkomplex) übernommen, der das Aktivierungssignal in das Innere der T-Zelle leitet. Zusammen mit dem TCR bildet dieser den TCR-CD3-Komplex. T-Zellen mit dem $\alpha\beta$ -TCR lassen sich anhand der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 unterscheiden, welche beide Glykoproteine sind. Diese fungieren als Co-Rezeptoren, welche die Funktion der Zelle nach der Aktivierung und Differenzierung bestimmen. CD4⁺ T-Zellen werden zu Helferzellen und CD8⁺ zu zytotoxischen T-Lymphozyten, genannt Killerzellen.

Die Aktivierung der T-Zellen kommt nur zustande, wenn der spezifische TCR an das Peptid des Antigens gebunden wird. Jedoch erkennen die T-Zellen, im Gegensatz zu den Antikörpern, ihr spezifisches Antigen nur dann, wenn es an MHC-Moleküle gebunden vorliegt. Bei MHC-Molekülen handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine, die vom Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC: Major Histocompatibility Complex) codiert werden.^[20] Diese Proteine lassen sich in zwei Klassen unterteilen, die Moleküle der MHC-I und MHC-II.

Die Proteine, die an MHC-Klasse-I gebunden sind, kennzeichnen eine fremde Zelle als infiziert, wodurch es zur Freisetzung von Killer-T-Zellen kommt und damit zur Zerstörung der Fremdzelle. Moleküle der MHC-Klasse-I sind Peptide von Proteinen, die im Zytoplasma prozessiert (Prozessierung: Veränderungen von Proteinen nach der Translation) wurden. Diese Peptide sind entweder Abbilder der in der Zelle synthetisierten Proteine oder stammen von Virus infiziert Zellen. Die Bindung dieser Peptide an den MHC-Klasse-I geschieht im endoplasmatischen Retikulum der Zelle. Nach dem Transport an die Zelloberfläche wird der Peptid-MHC-Klasse-I von CD8⁺ T-Zellen erkannt.

Die MHC-Klasse-II werden von speziellen Zellen der Immunabwehr erkannt. Zu diesen Zellen gehören unter anderem Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen. Peptide die an MHC-Proteine der Klasse-II gebunden sind, werden von den Helfer-T-Zellen registriert. Diese Peptide stammen von extrazellulären Proteinen, die entweder durch rezeptorvermittelte Endozytose oder durch Phagozytose aufgenommen und prozessiert wurden. Peptide, die an MHC-Moleküle der Klasse-II gebunden sind, werden durch $CD4^+$ T-Zellen registriert. Die Helferzellen lösen mit den Zytokinen (lösliche Botenstoffe) Alarm aus und regen somit die Immunabwehr an, indem diese weitere Immunzellen, unter anderem B-Zellen aussendet.

Die T-Zellen sind also für die Programmierung des Zelltods von entarteten und infizierten Zellen zuständig. Sie steuern nicht nur die Immunantwort, sondern sind auch für viele allergische Reaktionen verantwortlich. Einen intensiveren Einblick in die Welt der Immunologie bietet das Buch von Jürgen Neumann, „Immunologie–Eine Einführung“.^[21]

Da T-Zellen auf Krebszellen reagieren, sind diese vor allem für Drug-Delivery Systeme von Bedeutung. So beschäftigte sich Clement et al.^[22] mit der Beladung von T-Zellen mit Nanopartikeln. In dieser Arbeit konnte eine Interaktion zwischen Dextran-beschichteten, magnetischen Nanopartikeln und Tumorzellen sowie peripheren Blutzellen gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme von Nanopartikeln unter anderem von der Osmolarität des Inkubations-Mediums abhängig ist. Petri-Fink et al.^[28] konnten zeigen, dass die Aufnahmeraten von Nanopartikeln von der Art und Zusammensetzung des für die Beladung verwendeten Mediums abhängen.

Viele dieser Stammzellen sind erfolgreich mit Magnetit-Nanopartikel beladen worden. So befassen sich klinische Studien mit der Regeneration des Herzmuskels nach einem Herzinfarkt mit Hilfe der Stammzellen.^[22, 23] In der Praxis werden die Stammzellen mit einem Kontrastmittel markiert und anschließend mittels MRT wird das gestörte Gewebe sichtbar gemacht.^[24]

2.1.5 ANWENDUNGSBEREICHE VON MAGNETISCHEN NANOPARTIKELN IN DER MEDIZIN

Hochstabile magnetische Nanopartikel werden in der Medizin sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* verwendet. So werden solche Partikel beispielsweise im Bereich der Molekularbiologie routinemäßig zur biomagnetischen Zellseparation verwendet oder dienen *in-vivo* als Kontrastmittel in der Kernspintomographie.

Im therapeutischen Bereich kommen sie vor allem in der Hyperthermie (siehe Kapitel 2.2.7. „Anwendungsbereiche der Ferrofluiden“)^[25-27] zur Anwendung oder bei der lokalen Chemotherapie als Drug-Carrier. Abbildung 2.6 liefert eine allgemeine Zusammenfassung der verschiedenen biomedizinischen Anwendungsgebiete von magnetischen Nanopartikeln. In diesem Zusammenhang soll ebenfalls auf die Review-Artikel von A.-K.Gupta^[28, 29] et al. sowie von M. Namdeo^[26] et al. hingewiesen werden.

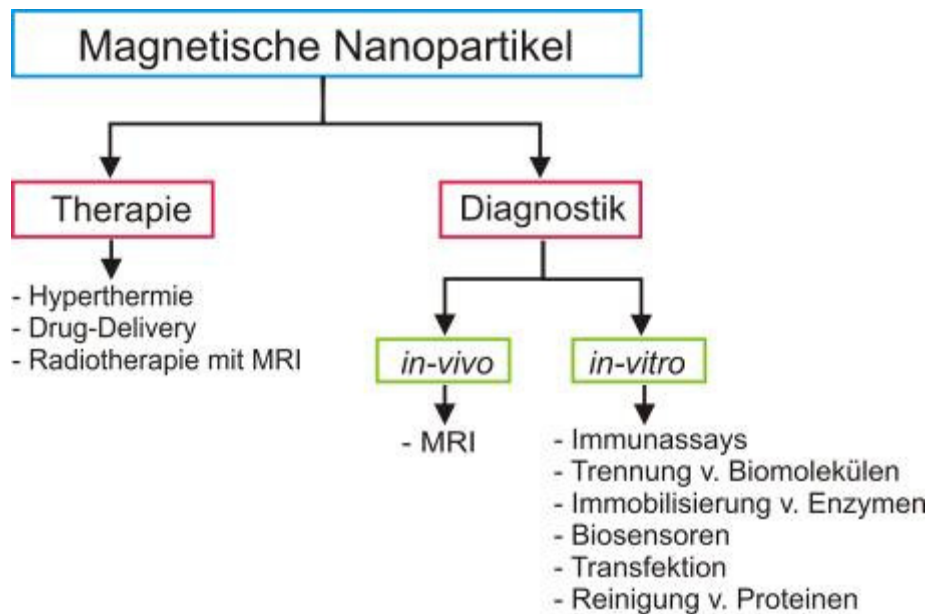


Abbildung 2.6: Biomedizinische Anwendungsmöglichkeiten von magnetischen Nanopartikeln.

Eine Erfolg versprechende Anwendungsmöglichkeit für magnetische Nanopartikel ist der Einsatz als Träger bei der Arzneistoff-Formulierung. In den 70er Jahren wurde von Widder et al.^[30] eine „magnetische Wirkstofflieferung (Drug-Delivery)“ angedeutet. Die Grundidee des magnetischen Drug Targetings besteht darin, dass magnetische Nanopartikel, die mit einem Wirkstoff modifiziert worden sind, mit Hilfe lokalisierter Magnetfeldgradienten an eine bestimmte Region des Körpers geführt werden. Dort sollen diese Partikel bis zum Ende der Therapie festgehalten und anschließend entfernt werden. Die magnetischen Träger können somit eine hohe Dosis des Wirkstoffs transportieren und dadurch eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration herbeiführen. Toxizität und andere Nebenwirkungen, die durch eine hohe Wirkstoffdosierung ausgelöst werden können, werden somit in anderen Teilen des Organismus vermieden.

Für medizinische Anwendungen sind Partikel geeignet, die in einem Größenbereich von 10 nm bis 100 nm liegen. In diesem Bereich erreichen die Partikel auch kleinste Kapillargefäße und entgehen dem retikuloendothelialen System, welches für die Beseitigung von Fremdstoffen verantwortlich ist.

Für die Bioverträglichkeit solcher Partikel werden vor allem Polysaccharide, wie beispielsweise Dextran oder synthetische Polymere, verwendet. Diese Polymerhüllen verfügen über verschiedene funktionelle Gruppen, die den Wirkstoff einschließen (verkapseln) oder binden können.

Darüber hinaus können auch Nanopartikel-beladene Liposome^[31-34], polymere Mizellen^[35-38] oder Dendrimere^[39-41] als magnetische Träger verwendet werden. In Abbildung 2.7 sind verschiedene Transportsysteme von Nanopartikeln dargestellt.

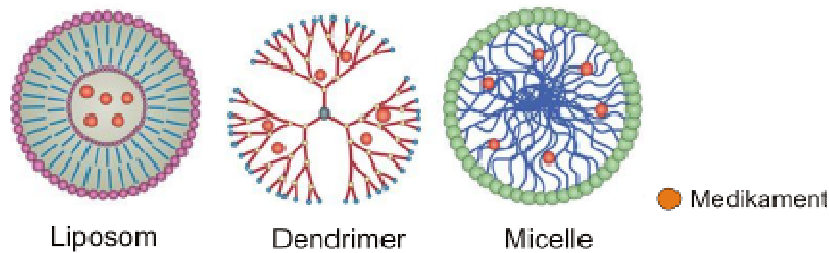


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der verschiedenen Drug-Delivery Systeme.

Als Transportmittel für Wirkstoffe kommen Liposome, Dendrimer oder Mizellen in Frage.^[42]

Als Wirkstoffe dienen unter anderen verschiedene Zytostatika, wie zum Beispiel Doxorubicin oder Daunorubicin, die zur Gruppe der Anthracycline gehören, oder das Taxan Paclitaxel. Des Weiteren finden auch unterschiedliche Antimetabolite wie Methorexat und 5-Fuoruracil Anwendung.

Sowohl die Wirkungsweise als auch die Struktur von Doxorubicin wird näher erläutert, da sie für den weiteren Verlauf der Arbeit von Bedeutung ist.

Als Chemotherapeutikum wird Doxorubicin vor allem zur Behandlung von Leukämien, Hodgkin-Lymphom sowie von Brust-, Magen-, Eierstock- und Schilddrüsenkrebs verwendet. Doxorubicin ruft, wie die meisten Zytostatika, zahlreiche Nebenwirkungen hervor, wie beispielsweise Knochenmarkdepression oder Kardiotoxizität. Chemisch gesehen gehört Doxorubicin (siehe Abbildung 2.8) zur Stoffgruppe der Anthracycline und ist ein Hydroxyl-Derivat des Daunorubicins. Auf Grund der Autofluoreszenz ist Doxorubicin für die Analyse mit bildgebenden Verfahren bestens geeignet.

Der zytotoxische Wirkmechanismus des Doxorubicins beruht auf der Interkalation des Wirkstoffs in die DNA, wie in Abbildung 2.9 dargestellt ist. Hierbei sind das DNA-Rückgrat als hellblaues Band und die Wasserstoffbrücken als gelbe Linien dargestellt. Aminosäuren, die die Wasserstoffbrücken mit Doxorubicin ausbilden, sind grün markiert. Dabei sind Serin (Ser740), Threonin (Thr744), Glutamin (Gln750) und Doxorubicin hervorgehoben. Die Wasserstoffatome sind nicht aufgeführt.

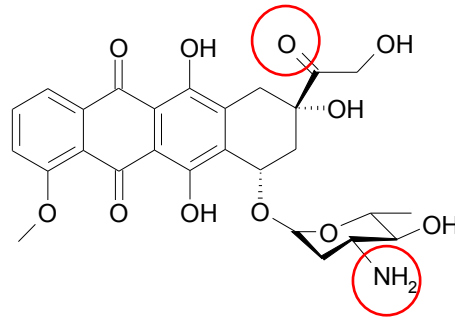


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Doxorubicin-Struktur. Die funktionellen Gruppen, die für eine Anbindung an das Beschichtungsmaterial in Frage kommen, sind rot markiert.

Durch die Interkalation Doxorubicins wird die Topoisomerase-II (Top-2) gehemmt. Dieses Enzym ist an der Replikation und Transkription der Erbsubstanz beteiligt, d. h. an der Zellteilung und der Zellfunktion. Das Enzym Topoisomerase-II gehört zu den DNA-Topoisomerasen, die durch Spaltung und Neusynthese der DNA für die Entfaltung der DNA verantwortlich ist. Durch Doxorubicin wird diese Umwandlung in die entfaltete Form gehemmt, somit kann weder die Transkription noch die Proteinsynthese ablaufen. Der binäre Top-2-DNA-Komplex ist dabei der mutmaßliche Rezeptor des Doxorubicins.

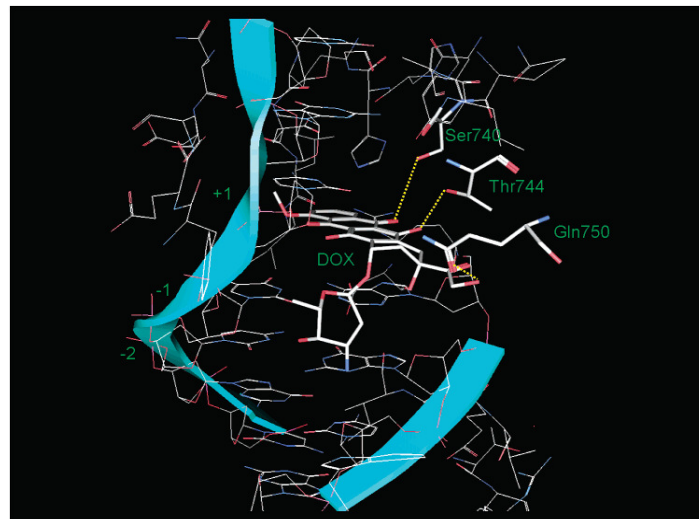


Abbildung 2.9: Darstellung der Interkalation des Doxorubicins in die DNA. Das DNA-Rückgrat ist als hellblaues Band und die Wasserstoffbrücken als gelbe Linien wiedergegeben. Die Aminosäuren Serin (Ser740), Threonin (Thr744) und Glutamin (Gln750) sind grün markiert und Doxorubicin ist hervorgehoben. Wasserstoffatome sind nicht gezeigt.^[43]

Obwohl bereits beträchtliche Leistungen in *in-vivo* Untersuchungen erbracht wurden, sind klinische Studien bislang problematisch. Allerdings konnten Lübke et. al. in einer ersten klinischen Studie zeigen, dass Epirubicin-funktionalisierte magnetische Nanopartikel mit Hilfe eines externen Magnetfeldes zum Tumor vom Patienten geführt werden können, ohne die damit verbundene Organtoxizität auszulösen.^[44, 45] Viele fundamentale Aspekte magnetischer

Wirkstoffträgersysteme müssen noch verbessert werden, z. B. die größenkontrollierte Synthese und Stabilität der Nanopartikel, die Biokompatibilität der Beschichtungen (Polymer oder Silicat), die Bindung des Wirkstoffs an die Nanopartikel und die physiologischen Parameter.^[28, 46]

Eine Verbesserung des magnetischen Drug Targetings wird zum Beispiel durch die Verkapselung der mit Wirkstoff-funktionalisierten Nanopartikel erreicht. So ist es möglich, dass der Wirkstoff zum Einen geschützt, d. h. ohne zuvor abgebaut oder metabolisiert zu werden, an den Zielort gebracht wird, und zum Anderen die Freisetzung des Wirkstoffs über einen längeren Zeitraum kontrolliert dosiert wird. Bei dem Verkapselungsmedium muss es sich jedoch um biologisch abbaubare Polymere handeln. Misra^[47] et al. haben sich mit der Verkapselung von Eisenoxid-Nanopartikeln beschäftigt. In diesen Studien wurden magnetische Eisenkerne mit biofunktionalisiertem Methyl-3-Mercaptopropionat beschichtet, wodurch eine kovalente Eisensulfid-Bindung entstand. Die OCH₃-Gruppe wurde in eine Hydrazon-Bindung umgewandelt, welche mit einem Wirkstoff umgesetzt werden konnte. Anschließend wurden die mit dem Medikament beladenen Partikel mit einem Polymer verkapselt. Dadurch konnte eine thermische und pH-Wert-sensitivierte, kontrollierte Wirkstoff-Freisetzung erreicht werden. Ebenfalls relevant für den geschützten Transport des Wirkstoffs zum Zielort sind die Arbeiten von Hu^[48] et al., die sich mit der Synthese von Core / Single-Crystal-Shell Nanosphären für eine kontrollierte Wirkstoff-Freisetzung beschäftigen. Neue Erkenntnisse, speziell zum Einsatz von magnetischen Nanopartikeln zum Wirkstofftransport, werden in den Review-Artikeln von Arruebo et al.^[23] und Bechet et al.^[25] dargestellt.

Die Anwendung solcher Nanopartikel ist nicht nur auf die Krebstherapie limitiert. Durch die Fähigkeit verschiedenste Biomoleküle, wie zum Beispiel Proteine, Enzyme, Gene oder Nukleinsäuren, an die Partikel anzubinden, eröffnen sich neue Behandlungsmöglichkeiten verschiedener Lebensmittelallergien, der Immobilisierung von Enzymen oder der Gentherapie. So ist es möglich, magnetische Nanopartikel mit einem spezifischen Liganden und / oder Transfektionserreger zu modifizieren, um diese funktionell und effizient in zelluläre und subzelluläre Strukturen einzubauen. Des Weiteren erhalten die Zellen die magnetische Aktivität der Nanopartikel und können so bewegt bzw. separiert werden. Darüber hinaus können mit Hilfe der Nanopartikel die zellulären Funktionen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* beobachtet bzw. überwacht werden. Auf Grund dieser Tatsache ist es möglich, den intrazellulären Weg bestimmter Proteine oder Enzyme, die für bestimmte Allergien (z. B. Laktoseintoleranz, Glutenallergie) verantwortlich sind, zu beobachten, um darauf aufbauend verbesserte Wirkstoffe zu entwickeln.

So beschäftigt sich die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Francesco Bonomi aus Mailand, Italien, mit dem bioaktiven Protein β -Laktoglobulin (BLG, Nahrungsmittelallergen), dem Antikörper

des Allergens, dem Immunglobulin G (IgG), dem Enzym Trypsin, das für die Verdauung der Eiweiße zuständig ist und dem dazugehörigen Nutraceutical. Dazu wird an Carboxymethyl-Dextran-(CMD)-beschichtete MnZn-MNP das Protein bzw. Enzym gebunden und anhand von immunologischen, spektroskopischen und mikroskopischen Analysemethoden charakterisiert. Die Biokompatibilität und die zelluläre Aufnahme der funktionalisierten Nanopartikel werden durch die Zelllinien Mono Mac 6 (Monozyten) und Darmkrebszellen (HT-29) untersucht.^[49] Somit ist es möglich, die funktionalisierten MnZn-MNP als Tracer für die Beobachtung des intrazellulären Wegs von bioaktiven Molekülen sowie zur Immobilisierung von Nahrungsmittelproteinen zu verwenden.^[50] In Abbildung 2.10 ist die Aufnahme von CMD-beschichteten MnZn-MNP Partikeln durch die Wurzel des Hartweizens dargestellt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die verschiedenen Bereiche der Wurzel des Hartweizens, die in Gegenwart der Partikelsuspension gewachsen ist. Zu erkennen ist, dass sich die Partikel als dicke Schicht auf die Wurzelhaare legen. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass Nanopartikel während der Wasseraufnahme an die Oberfläche der Wurzel adsorbieren.



Abbildung 2.10: Lichtmikroskopische Aufnahmen (10-fache Vergrößerung) der CMD-beschichteten Partikel; links: Haar der Wurzel des Hartweizens; rechts: Region oberhalb des Wurzelhaares.^[50]

In der Biotechnologie und Biomedizin können bestimmte Proteine oder andere Biomoleküle effizient und zuverlässig durch magnetische Trennung eingefangen werden. Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel mit aufgepfropftem Dopamin werden zur Trennung von Proteinen verwendet.^[51] Dopamin enthält einen zweizähligen Endiol-Donor, der die unterkoordinierten Eisen-Oberflächenstellen in eine volumenähnliche Gitterstruktur mit einer oktaedrischen Umgebung der Sauerstoff-koordinierten Eisenatome umwandelt, woraus eine feste Bindung des Eisenoxids an das Dopamin resultiert.^[52]

2.1.6 TOXIZITÄT VON NANOPARTIKELN

Im Allgemeinen wird die Nanotoxikologie als der Bereich definiert, der sich mit der Wirkung von Nanomaterialien auf den Organismus befasst.^[53] Dabei ist es wichtig zu differenzieren, in welchen Bereichen die Nanomaterialien eingesetzt werden. So ist zum Beispiel der Einsatz von Nanomaterialien in der Technik, der Elektronik sowie im Automobilsektor im Bezug auf die gesundheitlichen Aspekte von geringfügiger Bedeutung. Wohingegen die Verwendung von Nanopartikeln in der Medizin, Biologie oder Kosmetik mit erheblichen Risiken verbunden sein kann. Für Biologen und Toxikologen hingegen handelt es sich bei Nanomaterialien um Verbindungen, die speziell für den gezielten Transport von Substanzen synthetisiert sind. Dies sind Partikel, die eine Größe zwischen 40 nm und 200 nm oder mehr besitzen.

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der Nanotechnologie und der ständigen Zunahme an Publikationen sind nur wenige Resultate für eine Risikoeinschätzung von Nanopartikeln geeignet. Dies liegt daran, dass es bis zum Jahr 2008 keine standardgemäße Definition der Nanomaterialien gab. Die eingesetzten Methoden zur Untersuchung der Toxizität von Nanomaterialien waren meist fehlerbehaftet, da diese mit nicht ausreichend charakterisierten Proben oder Referenzmaterialien durchgeführt wurden.^[54] So wurde zum Beispiel für Fullerene festgestellt, dass sie in Daphnien sowie in anderen Fischen toxisch wirken und Lipidperoxidation auslösen. Jedoch wurden diese Aussagen wieder revidiert, da die Peroxide nicht aus den Fullerenen, sondern aus dem verwendeten Lösemittel Tetrahydrofuran stammten.^[55] Roller et al.^[56] berichteten von der Tumor-induzierenden Wirkung von Nanopartikeln auf die Lunge. Unberücksichtigt dabei ließen sie allerdings die viel zu hohe Dosis, die während der Experimente verwendet wurden. Die meisten Materialien weisen bei einer zu hohen Dosis eine zytotoxische Wirkung auf, die bis hin zur Tumorinduktion reichen kann, weshalb kein nano-spezifischer Effekt vorliegt. So würden standardisierte Tests und die Verwendung von einheitlichen Referenzmaterialien die Vergleichbarkeit zwischen den untersuchten Nanomaterialien und den durchgeführten Studien fördern.^[57]

Des Weiteren ist es wichtig, verschiedene menschliche Zellsysteme für die toxikologischen Untersuchungen zu verwenden. Yu et al.^[58] zeigten, dass Dextran-beschichtete Magnetit-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 30 nm keine immunmodulatorischen Effekte auf menschliche Makrophagen haben. Wohingegen primäre Peritonealmakrophagen von Ratten und Mäusen, die mit Dextran-beschichteten Nanopartikeln (Durchmesser von 20 nm und 60 nm) beladen waren, die Immunabwehr aktivierten, indem vermehrt Zytokin ausgeschüttet wurde. Weitere Studien zeigen, dass Dextran-beschichtete Partikel weder auf menschliche Makrophagen noch auf dendritische Zellen toxisch wirkten. In der Studie von Jain et al.^[59] wurde gezeigt, dass Dextran-beschichtete Nanopartikel nach intravenöser

Injektion bei Ratten weder einen Effekt auf deren Leberfunktion hatten noch oxidativen Stress in den Zellen auslösten.

Auf Grund der breitgefächerten Anwendungsbereiche von Nanopartikeln gibt es mehrere mögliche Aufnahmewege für Nanomaterialien in den menschlichen Körper. Jedoch ist für die meisten Nanopartikel noch nicht geklärt, wie sie vom Körper aufgenommen, verteilt, verändert, angereichert und ausgeschieden werden. In Abbildung 2.11 sind die bis dato bekannten verschiedenen Aufnahme- und Transportwege von Nanopartikeln dargestellt.

Auf Grund der geringen Größe können diese als Feinstaub über die Atemwege aufgenommen werden und gelangen von dort in die Lunge. Über die sehr dünne Luft-Blut-Gewebeschanke können dann inhalierte Nanopartikel ins Blut gelangen. Des Weiteren können die Nanopartikel durch die Zellmembran in die Zelle hineindiffundieren. Dies hat zur Folge, dass die Zelle zum Einen oxidativem Stress, d. h. der Bildung von freien Sauerstoffradikalen, ausgesetzt ist und zum Anderen die Möglichkeit besteht, dass die DNA, durch Einlagerung der Partikel in den Zellkern, geschädigt wird. Werden diese freien Sauerstoffradikale nicht durch Antioxidantien abgefangen oder durch antioxidative Enzyme abgebaut, reagiert der Körper mit Entzündungsreaktionen. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass Inhalation von nanoskaligem TiO_2 zur Bildung von Fibrosen und bronchialer Granuloma führt, die die Lungenfunktion der Versuchstiere beeinträchtigt. Aber auch bei diesen Versuchen wurden zu hohe Dosen an Partikeln verabreicht, wodurch eine fundierte Aussage über die Toxizität von TiO_2 nicht möglich ist.^[60, 61]

Neben der inhalativen Aufnahme können die Partikel auch ebenfalls dermal aufgenommen werden. Bis zum heutigen Tag konnte jedoch in keiner Studie belegt werden, dass Nanopartikel durch intakte Haut ins Blut gelangen können. Jedoch wurde gezeigt, dass kleine Partikel (Durchmesser kleiner als 10 nm), wie beispielsweise Quantum Dots, sehr wohl in die Epidermis oder Dermis eindringen können.^[62]

Die Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt ist nur von geringer Bedeutung, da die Partikel nicht ohne Weiteres vom Darm in den Blutkreislauf gelangen können. Zudem wurde in einem Versuch die intravenöse mit der oralen Aufnahme verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass 98 % der oral verabreichten Partikel wieder ausgeschieden wurden, wohingegen bei der intravenösen Verabreichung der Partikel nach einer Woche 80 % in der Leber angereichert waren.^[53]

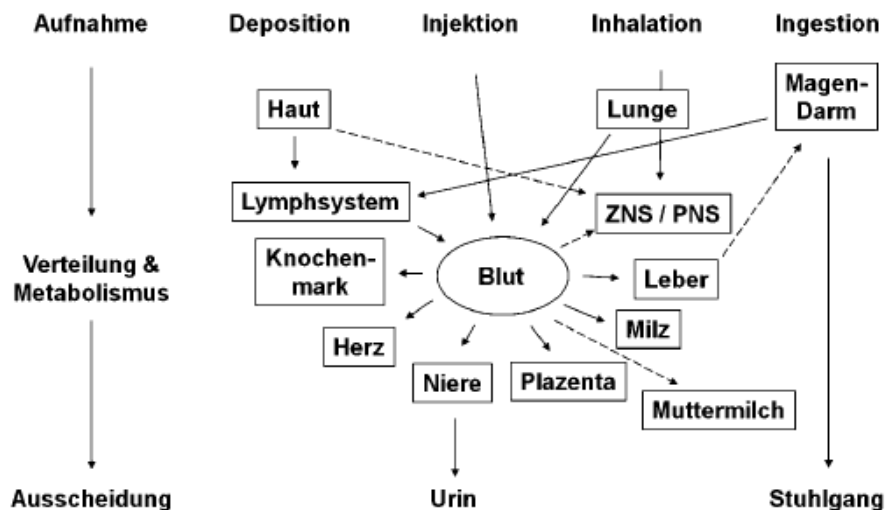


Abbildung 2.11: Nachgewiesene (durchgezogener Pfeil) und mögliche (gestrichelter Pfeil) Aufnahmewege von Nanomaterialien in den Körper.^[53, 54]

Nicht nur die chemische Zusammensetzung der Partikel hat einen Einfluss darauf, wo sich die Nanopartikel im Körper anreichern, sondern auch die Dosis, die Oberflächeneigenschaften sowie die Form der Partikel. Je länger sich die Partikel in der Blutbahn befinden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese in andere Organe wie Herz, Nieren, oder Hirn eindringen können.

Weissleder et al. zeigten, dass sich Eisenoxidpartikel (Magnetit) nach der intravenösen Injektion bei Ratten und Hunden vor allem in der Leber und in der Milz anreicherten. Wohingegen in der Lunge, Niere und im Gehirn nur geringe Anreicherungen vorzufinden waren. Die toxikologischen Untersuchungen ergaben, dass weder eine erhöhte Mortalität noch ein erhöhter Zelltod auftraten. Die injizierte Dosis lag bei 50 μmol bzw. 250 μmol Eisen pro Kilogramm Körpergewicht.^[63, 64]

Da Eisenoxid bereits als Kontrastmittel (siehe Kapitel 2.2.7 „Anwendungsbereiche von Ferrofluiden“) eingesetzt wird, kann es bis dato als toxikologisch unbedenklich eingestuft werden. Es weist weder *in-vitro* noch *in-vivo* toxische Effekte auf. Jedoch werden durch Injektion von magnetischen Nanopartikeln die natürlichen Barrieren, wie beispielsweise die Haut, umgangen und andere, sonst schwer zugängliche Bereiche, wie die Blut-Hirn-Schranke, rücken in den Vordergrund. Diese möglichen Wege müssen noch genauer untersucht werden, um klare Aussagen darüber treffen zu können, ob magnetische Nanopartikel toxisch sind oder nicht.

2.2 FERROFLUIDE

2.2.1 EINE ALLGEMEINE EINLEITUNG

Ein Ferrofluid bezeichnet eine Suspension, die auf ein äußeres magnetisches Feld reagiert. Solche Ferrofluide sind kolloidale, magnetische Suspensionen, zusammengesetzt aus kleinen (2 nm bis 20 nm) ferro- oder ferrimagnetischen Festkörperteilchen, die durch geeignete Oberflächenmodifizierung in einer Trägerflüssigkeit (z. B. Wasser, Hexan oder Methanol) dispergiert sind.^[65] Je nach Polarität der Trägerflüssigkeit wird zwischen hydrophilen oder hydrophoben Ferrofluiden unterschieden.

Unter einem gut dispergierten Ferrofluid wird ein Ferrofluid bezeichnet, das sich weder durch Gravitations- noch durch Magnetfeldkräfte in zwei Phasen trennen lässt. Der Grund hierfür liegt in der Brownschen Molekularbewegung, die die Partikel thermisch stabilisiert, und der Oberflächenmodifizierung, die die Teilchen vor Agglomeration schützt. Ein Ferrofluid besteht aus bis zu 10^{20} Teilchen pro Liter.

Auf Grund der geringen Größe der Partikel ist ihre thermische Energie ausreichend, um eine permanente Bewegung aufrecht zu erhalten. Die Suspension zeigt zunächst nach außen hin keine magnetischen Eigenschaften. Die Reichweite des einzelnen magnetischen Moments ist zu gering, weswegen die Momente untereinander nicht wechselwirken können. Wirkt jedoch ein äußeres magnetisches Feld auf die Flüssigkeit, so richten sich die Partikel in Feldrichtung aus und die Suspension als Ganzes zeigt eine, vom Feld abhängige, Magnetisierung.

Das magnetische Verhalten der Ferrofluide gleicht dem des Paramagnetismus, ist jedoch ca. 10^4 -mal größer als das magnetische Moment eines Atoms oder Moleküls. Dies bewirkt, dass die Wechselwirkung zwischen dem Magnetfeld und den magnetischen Momenten schon bei geringen Magnetfeldstärken sehr groß ist. Magnetisch gesehen werden diese Partikel auf Grund ihrer Größe als Eindomänenteilchen betrachtet und weisen superparamagnetisches Verhalten auf (siehe Kapitel 2.2.5 „Magnetische Eigenschaften“). Abbildung 2.12 stellt die „Rosensweig-Stacheln“ eines Ferrofluids dar, welches mit Ölsäure stabilisiert ist.

Durch die Entwicklung derartiger stabiler Suspensionen eröffnet sich ein neues Forschungsgebiet, die Ferrohydrodynamik, aus dem sich zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für Medizin, Biologie und Technik ergeben.

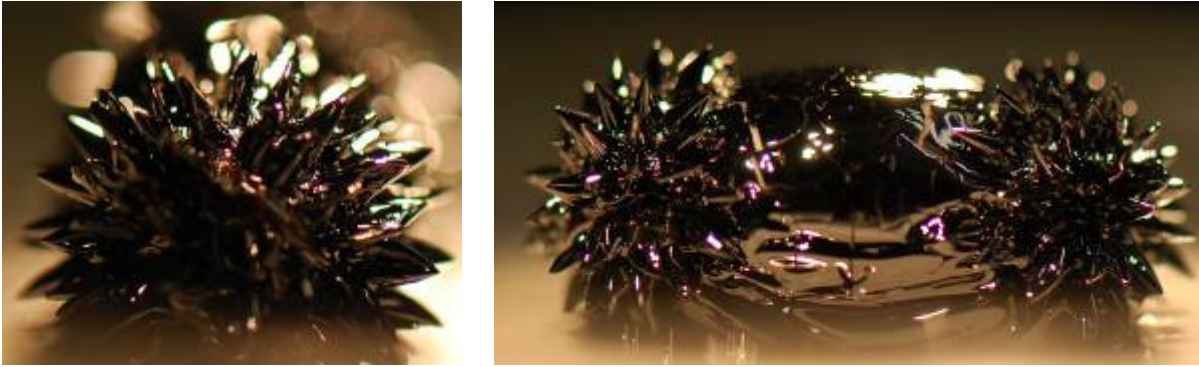


Abbildung 2.12: Bilder eines synthetisierten $\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ -Ferrofluids, welches mit Ölsäure stabilisiert ist.

2.2.2 ALLGEMEINE SYNTHESEROUTEN VON MAGNETISCHEN FLÜSSIGKEITEN

Schon in den 40er Jahren beschäftigte sich Elmore et al.^[66] damit, magnetisches Material in Anwesenheit eines Oberflächenmodifikators und Dispersionsmediums mehrere Wochen lang in Kugelmøhlen zu mahlen. Dabei erhielt er magnetische Suspension, die nur einige Tage stabil waren. Erst zwanzig Jahre später wurde diese Methode von Papell et al.^[67] verbessert, und aus Eisenoxidpulver konnten mit Emulgatoren stabilisierte Partikel im Nanometerbereich (10 nm) synthetisiert werden. Daraus entwickelte sich ein erstes Patent, welches der NASA 1965 erteilt wurde.

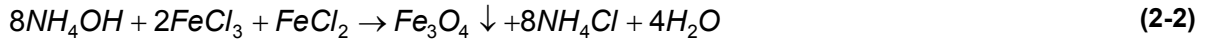
Heutzutage gibt es eine Reihe von verschiedenen Synthesemöglichkeiten zur Herstellung von hochstabilen magnetischen Flüssigkeiten, bei denen die Partikel in monodisperser und kontrollierter Form vorliegen. Zu diesen effizienten Syntheserouten zählen unter anderem die Kopräzipitation, die thermische Zersetzung oder Reduktion, die Mikroemulsion, die Hydrothermalsynthese und die Laserpyrolyse.^[68] Die meisten Ferrofluide basieren auf Eisenoxiden wie Magnetit oder Maghemit. Jedoch erlaubt die Vielzahl an verschiedenen Synthesewegen die Möglichkeit, magnetische Flüssigkeiten in unterschiedlicher Zusammensetzung und Phase herzustellen. So können beispielsweise Legierungen wie FePt ^[69] und CoPt_3 ^[70] oder gezielte Dotierungen von Eisenoxiden mit verschiedenen zweiwertigen Metallen wie Mangan, Zink oder Magnesium zur Synthese von Ferrofluiden herangezogen werden.

Die Mitfällung (kontrollierte Fällung) ist eine einfache und kostengünstige Methode zur Herstellung von Ferrofluiden. Dieser Syntheseweg wurde Anfang der 70er Jahre von Khallafalla et al. entwickelt^[71] und beruht auf der stöchiometrischen Ausfällung von Fe (II)- und Fe (III)-Salzen in alkalischer Lösung.

Die folgenden Reaktionsgleichungen zeigen vereinfacht die Bildungen von Magnetit in Gegenwart von Natronlauge als Base:



Alternativ kann Ammoniak als Fällungsreagenz eingesetzt werden,

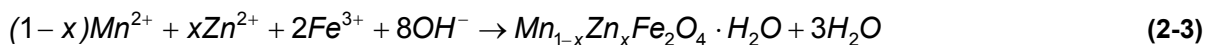


Die dadurch erhaltenen Eisenoxidpartikel werden mittels Emulgatoren in hydrophoben Trägerflüssigkeiten peptisiert und liegen im Größenbereich von 8 nm bis 12 nm

Zu Beginn der 80er Jahre entwickelte R. Massart et al.^[72] eine Methode zur Herstellung von hydrophilen Ferrofluiden, die ebenfalls auf der kontrollierten Fällungsmethode beruht.^[72]

Diese Methode eignet sich gut, um Ferrite herzustellen, die mit anderen zweiwertigen Übergangsmetallionen wie z. B. Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} oder Co^{2+} dotiert sind. Dadurch lassen sich gemischte Ferrite mit folgender Zusammensetzung $\text{A}_x\text{B}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ($0 < x < 1$) synthetisieren.

Die nachfolgende Gleichung gibt die Bildung eines gemischten Ferrits am Beispiel von Mangan und Zink wieder:



Die Größe, Form und Zusammensetzung der magnetischen Nanopartikel hängt stark vom verwendeten Gegenionen (z. B. Chlorid, Sulfat, Nitrat), der Reaktionstemperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Mediums ab.^[68] Zum Beispiel hat die Zugabegeschwindigkeit der Metallionen zur alkalischen Lösung einen erheblichen Einfluss auf die Größe, Polydispersität und die Kristallinität der Kolloide aus. Auch der pH-Wert der alkalischen Lösung übt einen Einfluss auf die Partikelgröße. Deshalb sollten die Metallsalzlösungen schnell und unter starkem Rühren zur alkalischen Lösung zugegeben werden, um relativ monodisperse und kristalline Nanopartikel zu erhalten. Aus der Literatur ist bekannt, dass für die Darstellung von MnZn-Ferriten drei unterschiedliche Basen (NaOH, NH_4OH und $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{OH}$) verwendet werden können. Jedoch nimmt die Partikelgröße mit fallender Basenstärke in der Reihenfolge NaOH (16,8 nm) > $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{OH}$ (11 nm) > NH_4OH (7,3 nm) ab.^[73] Der optimale pH-Bereich für die Bildung MnZn-Ferrite liegt somit zwischen 12 und 13. Bei pH-Werten größer als 13 entstehen zusätzliche Nebenprodukte, wie z. B. Hausmanit $\text{Mn}_3\text{O}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.^[74]

Bei gleichbleibenden Synthesebedingungen, ist die Qualität der magnetischen Nanopartikel vollständig reproduzierbar. Viele dieser Faktoren wurden bereits von Meyer et al.^[75] untersucht und optimiert. Die daraus resultierenden Teilchengrößen liegen im Bereich von 5 nm und 15 nm.

Magnetit-Nanopartikel sind oxidationsempfindlich und werden leicht durch Luftsauerstoff zu Maghemit oxidiert oder in saurer Umgebung aufgelöst. Erfolgt bereits bei der Synthese eine oxidative Umwandlung von Magnetit in Maghemit lässt sich die Partikelgröße nicht mehr steuern und eine enge Größenverteilung kann nicht mehr realisiert werden kann. Diese ist jedoch wichtig, da die Blockierungstemperatur von der Teilchengröße abhängt, und eine breite Größenverteilung zu einem breiten Intervall der Blockierungstemperatur führt. Bei vielen Anwendungen führt dies zu einem nichtidealen magnetischen Verhalten.^[68]

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Ferrofluiden ist die thermische Zersetzung von metallorganischen Vorstufen, d. h. ein modifiziertes Sol-Gel-Verfahren, bei dem die Bildung eines 3D-Netzwerkes durch sterische Stabilisierung verhindert wird. Diese Methode beruht auf der Herstellung von kleinen Nanopartikeln, die als Keime fungieren. Aus diesen gebildeten Keimen können größere monodisperse Nanopartikel synthetisiert werden (Keimwachstum). Diese Nanopartikel können anschließend in unpolaren oder schwach polaren Lösemitteln wie Hexan suspendiert werden. Die so gebildeten hydrophoben Partikel in hydrophile Partikel umzuwandeln, gelingt in Gegenwart von Tetramethylammonium-11-Aminoundecanoat und Dichlormethan als Suspensionsmedium.^[76, 77] Nach Zugabe dieser Lösung zu den in Hexan suspendierten Partikeln wird die Suspension geschüttelt, die Teilchen magnetisch separiert, mit Dichlormethan gewaschen, unter Stickstoffatmosphäre getrocknet und abschließend in Wasser dispergiert.

Als metallorganische Vorstufen werden bei der thermischen Zersetzung Metallacetylacetonate, $[M(\text{acac})_n]$ ($M = \text{Fe, Mn, Co, Ni, Cr}$; $n=2$ oder 3)^[77], Metallcupferronate $M^x\text{Cup}_x$ (M : Metallion; Cup : N-Nitrosophenylhydroxylamin, $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}(\text{NO})\text{O}-$) oder Metallcarbonyl^[78] eingesetzt. Fettsäuren^[79], Ölsäure^[80] und Hexadecylamine^[81] dienen als Tenside, unpolare Lösemittel als Suspensionsmedien. Ein wichtiger Parameter für die Steuerung von Größe und Morphologie der magnetischen Nanopartikel ist das Verhältnis der Edukte. Dazu gehören unter anderem die metallorganischen Verbindungen, die entsprechenden Tenside und das Suspensionsmittel. Reaktionstemperatur, Reaktionszeit und Dauer des Alterungsprozesses können ebenfalls entscheidend sein.^[68]

Zum Beispiel führt die Benutzung von kationischen Metallzentren direkt zu den entsprechenden Oxiden. So zersetzt sich in Phenolether $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ in Gegenwart von 1,2-Hexadecandiol, Ölsäureamid und Ölsäure direkt zu Fe_3O_4 .^[76] Als Dispersionsmittel dient Hexan. Diese Synthese bietet auch die Möglichkeit gemischte Ferrite dispergiert in einem organischen Dispersionsmedium herzustellen.^[77] Eigene Arbeiten (siehe Abbildung 2.13)

belegen, dass sich Mangan-Zink-Ferrite mit Hilfe thermischer Zersetzung herstellen lassen, welche eine gute Monodispersität sowie ein geringes Aggregationsverhalten aufweisen.

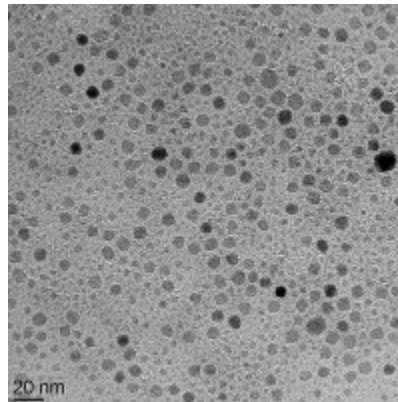


Abbildung 2.13: TEM Aufnahme von $\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ -Partikeln dispergiert in Hexan, Kristallitgröße 13 nm, Verfahren: thermische Zersetzung der entsprechenden Metallacetylacetonaten.

Eine weitere Methode zur Herstellung von magnetischen Flüssigkeiten, auf die kurz eingegangen werden soll, ist die Hydrothermalsynthese. Wang et al.^[82] beschreiben eine Flüssig-Fest-Lösungsreaktion zur Herstellung verschiedener Nanokristalle, die in einem unpolaren Lösemittel stabilisiert werden können. Wie in Abbildung 2.14 gezeigt, basiert diese Strategie auf einem allgemeinen Phasentransfer- und Phasentrennmechanismus, der während der Synthese an den Grenzflächen zwischen der flüssigen, festen Phase und Lösung auftritt.

So können beispielsweise Fe_3O_4 - und CoFe_2O_4 -Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 9 nm bzw. 12 nm synthetisiert werden. Hierzu wird eine Mischung, bestehend aus den entsprechenden Metallprecursoren (Acetate oder Chloride), Natriumlinoleat, Ethanol und Linolsäure, in einen Autoklaven unter Agitation eingeschlossen und 8 bis 72 Stunden auf 140°C bis 200°C erhitzt. Es entsteht ein Drei-Phasen-System, in dem Ethanol und Linolsäure die flüssige Phase darstellen, Natriumlinoleat die feste und Metallsalze die wässrige Lösung. Dabei findet ein spontaner Phasentransfer zwischen dem Metallion der wässrigen Lösung und Natriumlinoleat statt, der auf einem Ionenaustausch beruht. Dabei diffundiert Natrium in die wässrige Lösung und das Metall verbindet sich mit Linoleat zum Metallchelatkomplex. Bei einer bestimmten Temperatur dehydratisiert das Metall in die entsprechenden Oxide durch Fällung. Während dieses Prozesses adsorbiert die Linolsäure *in-situ* an die Metalloberfläche, wodurch hydrophobe Nanopartikel entstehen, die in unpolaren Lösemitteln redispersiert werden können.

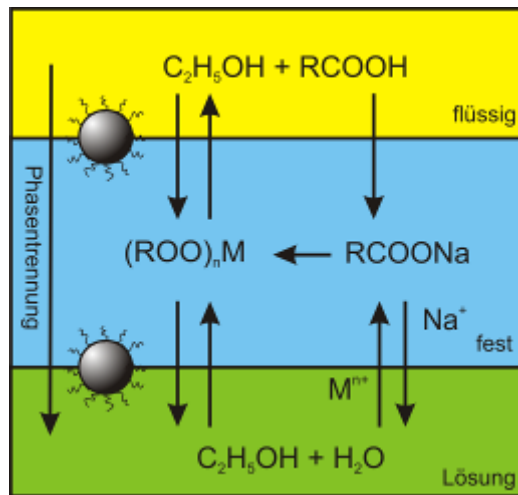


Abbildung 2.14: Strategie des Flüssig-Fest-Lösungs-Phasentransfers. Ethanol oder Linolsäure stellen die flüssige Phase dar, Natriumlinoleat die feste und Metallsalze die wässrige Phase.^[82]

Die einfachste unter den vorgestellten Routen ist die Mitfällung. Die erreichbaren Ausbeuten sind hoch bzw. skalierbar und die Größenverteilung liegt in einem relativ engen Bereich. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, im wässrigen Milieu zu arbeiten. Jedoch lässt sich die Morphologie der Partikel nicht kontrollieren.

Die am weitesten entwickelte Methode ist die thermische Zersetzung. Die Methode bietet die Möglichkeit, monodisperse und formkontrollierte Nanopartikel herzustellen. Die Ausbeute ist skalierbar und der Bereich der Größenverteilung liegt sehr eng. Jedoch gestaltet sich die Synthese sehr schwierig, da zum Einen unter Inertgasatmosphäre gearbeitet werden muss und zum Anderen unter hoher Temperatur (100°C bis 320°C). Ein weiterer Nachteil ist die Dispergierung in organischen Lösemitteln, wodurch die synthetisierten Ferrofluide nicht mehr in jedem Bereich angewendet werden können.

Die Hydrothermalsynthese ist von den vorgestellten Routen die am wenigsten untersuchte Methode. Sie liefert jedoch monodisperse und formkontrollierte Nanopartikel von hoher Qualität. Die Ausbeute ist nur mittelmäßig und die Synthese muss unter hohem Druck stattfinden.

Je nachdem, welche Art und Qualität von Partikeln erwünscht sind, kann zwischen den verschiedenen Routen entschieden werden. So lassen sich beispielsweise durch Mitfällung hydrophile Ferrofluide synthetisieren, die durch Citrat- oder Tartrationen stabilisiert sind. Es kommt zu einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Partikeln und den negativ geladenen Gegenionen. Diese Ferrofluide sind bei einem pH-Wert von 7 stabil. Für hydrophobe Ferrofluide, die sich zum Beispiel durch thermische Zersetzung herstellen lassen, kommen verschiedene Fettsäuren, wie Ölsäure und Laurinsäure, oder diverse Tenside in Frage. Diese Nanopartikel sind sterisch durch die Fettsäuren im organischen Lösungsmittel stabilisiert.

2.2.3 STABILISIERUNG VON FERROFLUIDEN

Da Ferrofluide Suspensionen magnetischer Partikel in einer Trägerflüssigkeit sind, müssen sie sowohl gegen Sedimentation als auch gegen Agglomeration stabilisiert werden. Um die Sedimentation der Partikel, bedingt durch Gravitation oder das magnetische Feld, zu unterbinden, muss die thermische Energie $E_T = k_B T$ (k_B = Boltzmannkonstante mit $1,380658 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$, T = absolute Temperatur) der Partikel größer als ihre Energie im Gravitationsfeld bzw. Magnetfeld sein. Durch einen kleinen Partikeldurchmesser d lässt sich das Sedimentieren im Gravitationsfeld verhindern. Die Energie der Partikel im Gravitationsfeld E_G wird durch folgende Gleichung wiedergegeben:

$$E_G = \Delta\rho g h \pi \frac{d^3}{6} < k_B T, \quad (2-4)$$

mit $\Delta\rho$ als Dichtedifferenz zwischen den Partikeln und der Trägerflüssigkeit, g : Gravitationsbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$), h : Probendicke. Sind die Partikel einem Magnetfeld ausgesetzt, so kann die Sedimentation verhindert werden, solange die thermische Energie groß genug ist, damit sich die Partikel im Magnetfeld frei bewegen können.^[83]

$$\mu_0 M_0 \frac{\pi}{6} d^3 H < k_B T, \quad (2-5)$$

mit μ_0 als Permeabilität des Vakuums ($\mu_0 = 1,2566 \cdot 10^{-6} \text{ Vs} \cdot \text{A}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$), M_0 als spontane Magnetisierung des Materials und H als magnetischer Feldgradient.^[84]

Die kolloidale Stabilität ist aber auch abhängig von der Wechselwirkung zwischen den Partikeln. So neigen Partikel auf Grund attraktiver Kräfte leicht zu Agglomeration. Diese attraktiven Kräfte sind von diversen Parametern, wie Größe, magnetischem Moment oder Polarisierbarkeit, abhängig. Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den Partikeln hat Einfluss auf die kolloidale Stabilität. Diese potentielle Energie der magnetischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung wird durch folgende Gleichung beschrieben

$$U_d = \frac{\mu_0}{4\pi} \left(\frac{\vec{\mu}_1 \vec{\mu}_2}{|\delta^3|} - \frac{3\vec{\mu}_1 \delta \cdot \vec{\mu}_2 \delta}{|\delta^5|} \right), \quad (2-6)$$

wobei δ den Abstand zwischen den beiden Dipolen beschreibt und $\bar{\mu}_i$ das magnetische Moment eines Dipols. Die Partikel agglomerieren, sobald die Dipol-Dipol-Wechselwirkung größer als die thermische Energie ist. Demzufolge nimmt die Stabilität bei größeren Partikeln ab. Durch nachfolgende Gleichung lässt sich der maximale Durchmesser d_{max} von Partikeln berechnen, ohne dass Agglomeration auftritt.^[84]

$$d_{max} < \sqrt[3]{\frac{144k_B T}{\pi\mu_0 M_0^2}} \quad (2-7)$$

Neben den interpartikularen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen begünstigen auch Van-der-Waals-Anziehungen die Bildung von Agglomeraten. Die Van-der-Waals-Anziehung, als attraktives Potential, herrscht immer zwischen zwei Teilchen. Sie ist für zwei Teilchen mit Radius d und Abstand δ zueinander durch folgende Gleichung beschreibbar.^[65]

$$E_{V.d.W.} = -\frac{A}{6} \left\{ \frac{2}{l^2 - 4l} + \frac{2}{(l+2)^2} + \ln \left(\frac{l^2 + 4l}{(l+2)^2} \right) \right\}, \quad (2-8)$$

dabei stellt A die Hamaker-Konstante dar, die von der Materialeigenschaft, der Polarisierbarkeit der Partikel und dem Dispersionsmedium abhängig ist und l ist definiert als $2\delta d^{-1}$. Dieser Ausdruck divergiert für einen abnehmenden Partikelabstand gegen Null, wodurch die Van-der-Waals-Wechselwirkung nicht durch die thermische Energie der Teilchen, d. h. durch die Verwendung ausreichend kleiner Partikel, kompensiert werden kann.

Ein Überblick über das Wechselwirkungspotential attraktiver und repulsiver Kräfte als Funktion des normierten Partikelabstandes l [$2\delta d^{-1}$] ist Abbildung 2.15 dargestellt.^[83]

Wäre die Van-der-Waals-Anziehung die einzige auf die Teilchen wirkende Kraft, so würden diese irreversibel agglomerieren und sedimentieren. Deshalb wird noch eine weitere Kraft, die repulsive Kraft, zur Stabilisierung der Partikel benötigt, die auf sterischer und elektrostatischer Wechselwirkung beruht. Die sterische Stabilisierung basiert auf der Oberflächenfunktionalisierung der Partikel mit langkettigen Molekülen. Die elektrostatische Wechselwirkung hängt von der Oberflächenladung der Teilchen ab. Diese Oberflächenladung wird durch ionische Gruppen (z. B. Amino-, Carboxyl-, oder Hydroxid-Gruppen) erzeugt, die in polar-protischen Dispersionsmedien dissoziieren und eine Gegenionenwolke ausbilden. Durch die Gegenionenwolke kommt es zur Bildung einer elektrischen Doppelschicht. Eine detaillierte Beschreibung gibt die DLVO-Theorie (Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeck) wieder, die wiederum auf der Theorie von Debye und Hückel basiert.^[65]

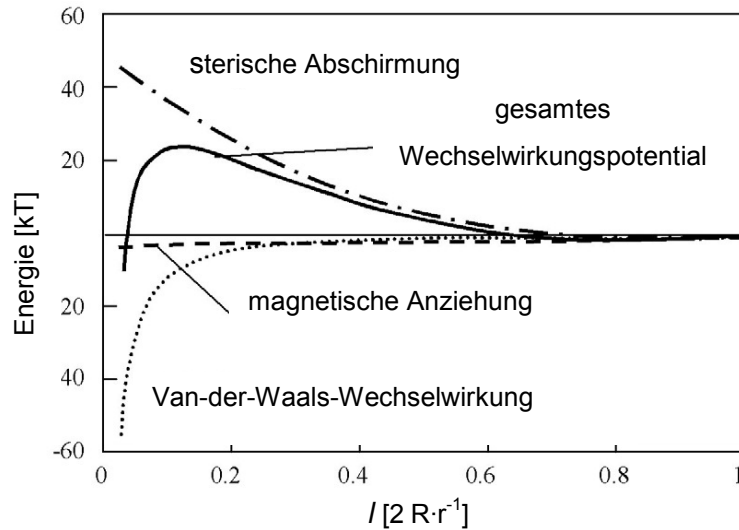


Abbildung 2.15: Attraktive und repulsive Wechselwirkungspotentiale zwischen zwei magnetischen Partikeln. Der Berechnung liegen die Eigenschaften von Magnetitpartikeln mit einer Kristallitgröße von 10 nm und einer Oberflächendicke von 2 nm zu Grunde.^[65]

2.2.4 KRISTALLOGRAPHISCHE EIGENSCHAFTEN

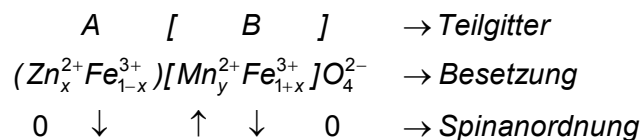
Kristallographisch gesehen handelt es sich bei Ferriten um eisenhaltige Spinelle des Typs $N^{2+}(Fe^{3+})_2O_4$. Ein Spinell ist ein kubisches Kristallsystem, in dem vor allem das Magnesium-Aluminium-Oxid-Mineral mit der chemischen Zusammensetzung $Mg^{2+}(Al^{3+})_2O_4$ kristallisiert. Die Sauerstoff-Anionen bilden dabei eine kubisch-dichteste Kugelpackung (kubisch-flächenzentriert), in der die M^{3+} -Kationen die Hälfte aller in der Struktur vorhandenen Oktaederlücken besetzen. Die Oktaeder sind dabei über Kanten miteinander verknüpft. Die N^{2+} -Kationen besetzen ein Achtel aller in der Struktur vorhandenen Tetraederlücken.^[85]

Magnetit selbst kristallisiert als inverser Spinell. Inverse Spinelle gehorchen ebenfalls der Zusammensetzung $N^{2+}(M^{3+})_2O_4$. Allerdings besetzen die N^{2+} -Ionen ein Viertel der Oktaederlücken, die M^{3+} -Ionen ein Viertel der Oktaeder- und ein Achtel der Tetraederlücken. Somit sind in Summe alle Oktaederlücken zur Hälfte und alle Tetraederlücken zu einem Achtel besetzt. Zwischen normalem und inversem Spinell gibt es in Abhängigkeit der Temperatur, des Drucks oder der chemischen Zusammensetzung beliebige Zwischenstufen, die durch den Inversionsgrad δ gekennzeichnet werden. Des Weiteren bevorzugen manche Metallkationen bestimmte Positionen im Kristallgitter und beeinflussen so den Inversionsgrad δ .

Tabelle 2.1: Darstellung der verschiedenen Spinelltypen (t = Tetraeder, o = Oktaeder).

	Formel	Inversionsgrad δ	Beispiel
Normaler Spinell (NS)	$N^t M_2^o O_4$	0	Zn Fe ₂ O ₄
Inverser Spinell (IS)	$M^t [NM]^o O_4$	0,5	Fe ₃ O ₄
Gemischter Spinell (zwischen NS und IS)	$[M_{2\delta} N_{(1-2\delta)}]^t [N_{2\delta} M_{2(1-\delta)}]^o O_4$	$0 < \delta < 0,5$	MnFe ₂ O ₄ ($\delta=0,2$)

Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe₂O₄ kristallisiert als gemischter Spinell, mit folgender Strukturformel [Zn_{0,2}Fe_{0,8}][Mn_{0,8}Fe_{1,2}]O₄, wobei die Metallkationen [Zn_{0,2}Fe_{0,8}] die Tetraederlücken besetzen und [Mn_{0,8}Fe_{1,2}] die Oktaederlücken einnehmen. Dieser Spinell besteht aus zwei Teilgittern. In dem Teilgitter A sind die Kationen tetraedrisch von Sauerstoffatomen koordiniert. Im Teilgitter B sind die Kationen oktaedrisch von den Sauerstoffatomen umgeben. Die elektronische Wechselwirkung der verschiedenen Kationen in den einzelnen Teilgittern haben unterschiedliche Wirkungen. Die stärkste Wechselwirkung besteht zwischen den Kationen des Teilgitters A und den Kationen des Teilgitters B (AB-Wechselwirkung). Die AA-Wechselwirkung ist zehnmal schwächer als die AB-Wechselwirkung. Die BB-Wechselwirkung ist die schwächste. Dies führt zu vollständigem oder teilweise Antiferromagnetismus, dem Ferrimagnetismus.^[85] Speziell bei MnZn-Ferriten besetzen die diamagnetischen Zink-Ionen im Teilgitter A. Bis zu einem Zinkanteil von 0,4 liegt ein Anstieg der Magnetisierung vor, die durch die nachfolgende Formel beschrieben werden kann:



Für höhere Konzentrationen von Zink ändert sich die Kristallstruktur des gemischten Spinells in die des normalen Spinells. Dies hat eine Verdrängung der Mn²⁺-Kationen aus dem Teilgitter B und der Fe³⁺-Kationen aus dem Teilgitter A zur Folge. Dies führt zu einer Abnahme der AB-Wechselwirkung und die BB-Wechselwirkung gewinnt an Bedeutung, dadurch kommt es zu einer Verringerung der Magnetisierung. Eine graphische Darstellungen der Oktaeder- und Tetraederplätze der Spinellstruktur von Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe₂O₄ befindet sich in Abbildung 2.16 und Abbildung 2.17. Die Strukturen wurden mit dem Programm Diamond, Version 3.1e der Firma Crystal Impact GbR in Bonn angefertigt.

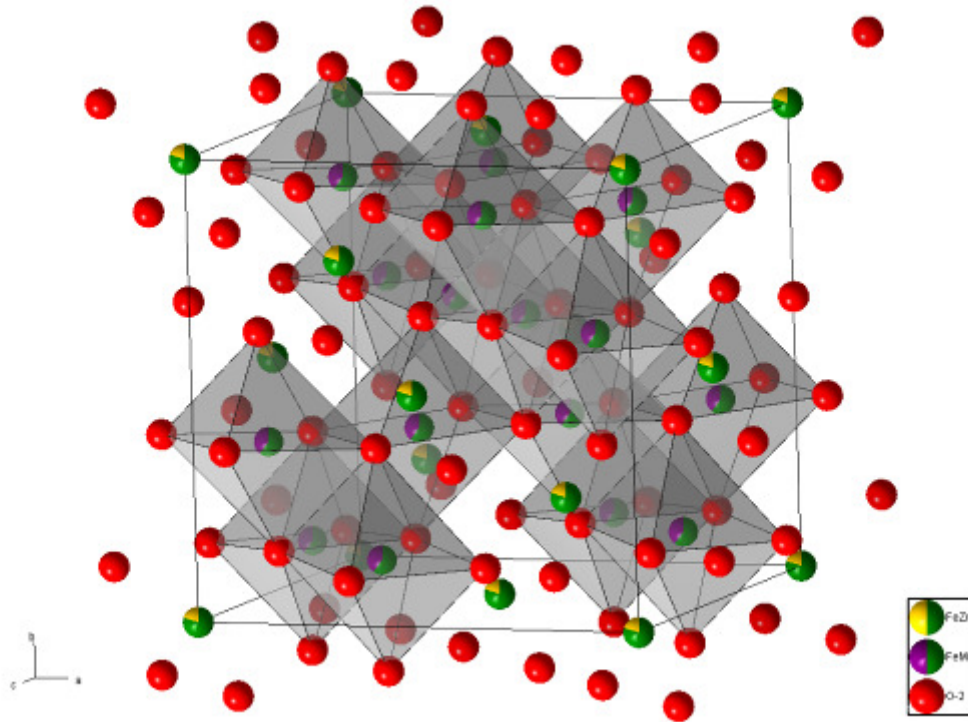


Abbildung 2.16: Graphische Darstellung der Oktaederplätze der Spinellstruktur von $Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe_2O_4$.

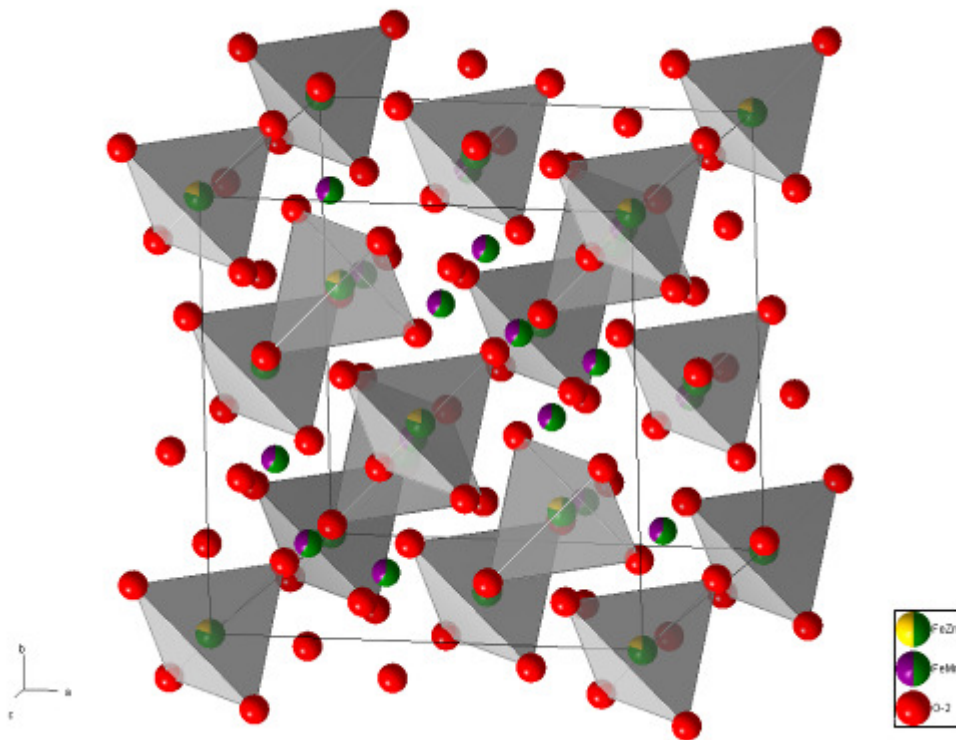


Abbildung 2.17: Graphische Darstellung der Tetraederplätze der Spinellstruktur von $Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe_2O_4$.

In diesem Strukturtyp liegt auch die Ursache für den Ferrimagnetismus von Ferriten. Die magnetischen Momente der Fe^{3+} -Kationen im Teilgitter B sind umgekehrt orientiert zu denen im Teilgitter A, wodurch sich diese kompensieren. Es verbleibt jedoch das magnetische Moment der Fe^{2+} -Kationen.^[85] Im Magnetfeld zeigt sich deshalb ein ferromagnetisches Verhalten (siehe Kapitel 2.2.5 „magnetische Eigenschaften“). So finden Spinell-Ferrite im großtechnischen Maßstab Verwendung als Permanentmagnete, Datenspeicher, magnetische Flüssigkeiten und werden in der Hoch- und Höchsthfrequenztechnik eingesetzt.

2.2.5 MAGNETISCHE EIGENSCHAFTEN

Die Ursache für magnetische Eigenschaften von Stoffen kann auf Grundlage des Bohrschen Atommodells erklärt werden. Demzufolge umkreisen die Elektronen in einem Atom ihre eigene Achse (Spin) und den Atomkern (Bahndrehimpuls) und erzeugen so ein magnetisches Moment. Folglich beruhen die magnetischen Eigenschaften eines Stoffes im Wesentlichen auf den Unterschieden in den Bewegungszuständen aller im Festkörper zur Magnetisierung beitragenden Elektronen. Die Magnetisierung ist abhängig von der Spinorientierung, dem Energieniveau und der Besetzung der Elektronenschalen.

Das Magnetfeld selbst wird durch die magnetische Induktion (magnetische Flussdichte) B und die magnetische Feldstärke (magnetische Erregung) H beschrieben.^[86] Im Vakuum wird der Zusammenhang zwischen den beiden Größen über die magnetische Feldkonstante $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ Vs} \cdot \text{A}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ wiedergegeben und es gilt:

$$B = \mu_0 \cdot H . \quad (2-9)$$

Die SI-Einheit der magnetischen Induktion ist das Tesla (T). Für materieverfüllte Magnetfelder gilt entsprechend^[87]:

$$B = \mu_r \cdot \mu_0 \cdot H . \quad (2-10)$$

Dabei ist μ_r die relative Permeabilität der Materie. Sie gibt die „verstärkende“ oder „schwächende“ Wirkung des jeweiligen Stoffes auf das Magnetfeld gegenüber dem luftleeren Raum an.

Es wird unterschieden zwischen paramagnetischen, diamagnetischen und ferromagnetischen Stoffen. Bei Dia- und Paramagnetismus werden nur Atome, Ionen oder Moleküle betrachtet, die magnetisch isoliert vorliegen. Die magnetischen Momente in

ferromagnetischen Stoffen wechselwirken hingegen mit denen in benachbarten Atomen, Ionen oder Molekülen.

Diamagnetismus tritt bei allen Stoffen auf, deren Atome, Ionen oder Moleküle abgeschlossene Schalen oder Unterschalen besitzen, wie beispielsweise Gold und Silber. Die Spinmomente und die Bahnmomente der Elektronen kompensieren sich gegenseitig. Diese Verbindungen zeigen ohne Anlegen eines äußeren Magnetfeldes kein Magnetismus.

Paramagnetisch sind alle Atome, Ionen und Moleküle, die ungepaarte Elektronen besitzen und somit ein permanentes magnetisches Moment aufweisen. Die Reichweite dieses magnetischen Moments ist allerdings gering, weshalb die Momente untereinander nicht wechselwirken. Diese magnetischen Momente sind wegen der Wärmebewegung ungeordnet; im Magnetfeld stellen sie sich jedoch entgegen der Wärmebewegung bevorzugt in Feldrichtung ein. Die Magnetisierung und damit die magnetische Suszeptibilität χ sind im Allgemeinen temperaturabhängig.

Diese Temperaturabhängigkeit kann durch das Curie-Gesetz beschrieben werden:^[86, 88-90]

$$\chi_{para} = \mu_0 \cdot n \cdot \frac{\mu^2}{3k_B \cdot T} = \frac{C}{T} \quad \text{mit} \quad C = \mu_0 \cdot n \cdot \frac{\mu^2}{3k_B}, \quad (2-11)$$

C stellt die Curie-Konstante dar, T die Temperatur, n die Teilchendichte und μ die potentielle Energie eines magnetischen Dipols.

Es gibt jedoch nur wenige Stoffe, deren magnetisches Verhalten durch dieses Gesetz beschrieben werden kann. Normalerweise folgt die Suszeptibilität, in einem definierten Temperaturbereich, dem Curie-Weis-Gesetz

$$\chi = \frac{C}{T - \theta}, \quad (2-12)$$

in dem die Temperatur durch den Parameter θ korrigiert ist.^[90]

Bei den meisten Ferrofluiden handelt es sich um Ferrite der Zusammensetzung MFe_2O_4 , die in der Spinellstruktur kristallisieren (M steht dabei für alle zweiwertigen Übergangsmetalle). Bevor Néel seine Theorie aufstellte, die zum Ferrimagnetismus führte, wurde angenommen, dass Ferrite ferromagnetisch seien. Der Ferrimagnetismus lässt dabei sich mit Hilfe des Ferromagnetismus erklären.

Im Allgemeinen ist Ferromagnetismus ein kollektives Phänomen, das vorwiegend nur bei Festkörpern auftritt. Ferromagnetismus entsteht dadurch, dass elementare, magnetische Momente eine parallele Ordnung aufweisen. Bereiche gleicher Magnetisierung werden "Domänen" oder "Weiss'sche-Bezirke" genannt. Jedoch ist die Magnetisierung von Domäne

zu Domäne verschieden.^[87] Die „Weiss'schen Bereiche“ (siehe Abbildung 2.18) sind durch sogenannte „Bloch-Wände“ voneinander getrennt.

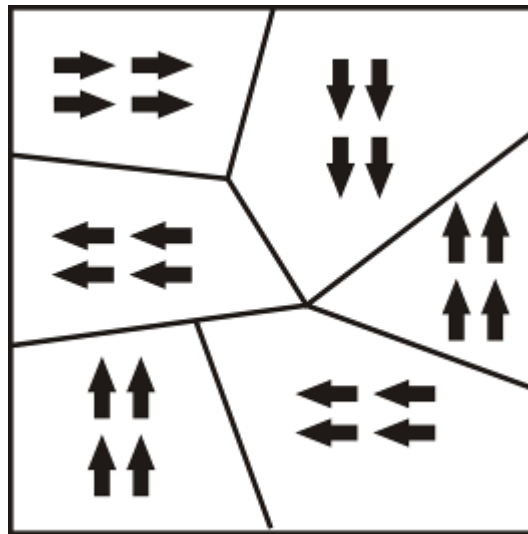


Abbildung 2.18: Mögliche Anordnung „Weiss'scher Bezirke“ in ferromagnetischen Materialien. Die einzelnen Bezirke sind durch „Bloch-Wände“ voneinander getrennt.

Diese „Bloch-Wände“ entstehen durch Fremdatome oder Fehlstellen im Kristallgitter. Durch Rotation der Spins können sich die „Bloch-Wände“ verschieben (siehe Abbildung 2.19), d. h. eine Domäne kann auf Kosten einer anderen Domäne wachsen. Dies hat zur Folge, dass sich die Magnetisierung eines Stoffes ändern kann.

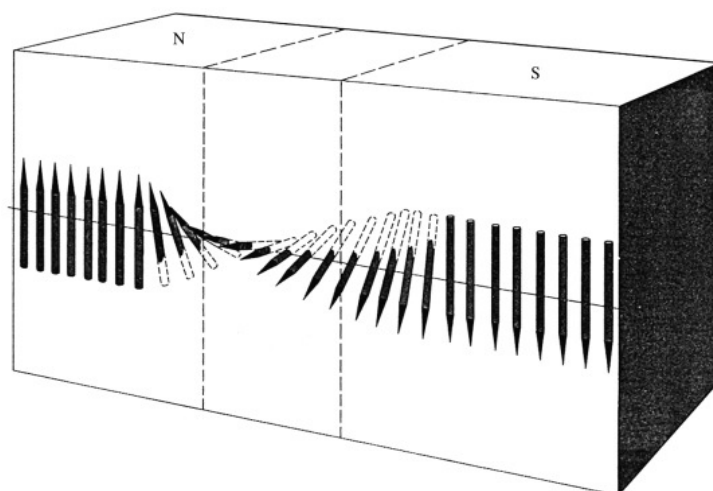


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung der Blochwand zwischen zwei 180° Domänen und Umkehr der Magnetisierung.^[91]

Ferromagnetismus ist abhängig von der Temperatur, d. h. oberhalb einer bestimmten Temperatur, der Curie Temperatur T_C , sind ferromagnetische Stoffe paramagnetisch. Beispielsweise weist Magnetit eine Curie-Temperatur von $T_C = 858$ K, durch Dotierung mit Mangan wird diese auf 573 K gesenkt.

Zusätzliches Einbringen von Zink ($\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$) hat eine weitere Absenkung der Curie-Temperatur auf 483 K zur Folge.^[1, 92] Grund hierfür ist die Zunahme der thermischen Eigenbewegung der Atome, die der Bildung der „Weiss’schen Bezirke“ entgegen wirkt. Der Paramagnetismus bleibt für alle Temperaturen oberhalb der Curie-Temperatur, selbst nach Schmelzen oder Sublimieren bzw. Sieden, erhalten.^[87]

Wird ein ferromagnetischer Stoff einem äußeren homogenen Magnetfeld ausgesetzt, so wird dieser magnetisiert. Das bedeutet, dass die Bezirke mit parallelen Spins in Nähe des Magnetfeldes auf Kosten der anderen Bezirke wachsen. Dies passiert jedoch nicht kontinuierlich als Funktion der Magnetfeldstärke, sondern sprunghaft durch das Umklappen magnetischer Momente ganzer Domänen. Diese sprunghafte Änderung wird als Barkhausen-Effekt bezeichnet. Ab einer materialabhängigen Feldstärke H_S , sind alle Spins der gesamten Probe parallel angeordnet, die Probe weist ihre Sättigungsmagnetisierung M_S auf und \vec{B} nimmt nur noch linear mit \vec{H} zu (Proportionalitätsfaktor ist μ_0).^[93]

Wird die magnetische Feldstärke ab diesem Punkt $H = 0$ wieder erniedrigt, nimmt das Magnetfeld ab. So bleibt auch nach Abschalten des äußeren Feldes eine Restmagnetisierung erhalten, da die „Bloch-Wände“ nur teilweise oder überhaupt nicht in ihre ursprüngliche Position zurückkehren. Dieses Phänomen wird als magnetische Remanenz M_R bezeichnet. Wird anschließend ein entgegengesetztes Magnetfeld mit gleicher Feldstärke, der sogenannten Koerzitivfeldstärke $-H_C$, angelegt, so verschwindet die Restmagnetisierung der Probe ($M = 0$, negativer Bereich).

Bei wachsender Feldstärke baut sich schließlich eine entgegengesetzte Magnetisierung auf. So wird bei der Feldstärke $-H_S$ die negative Sättigungsmagnetisierung $-M_S$ erreicht.^[86] Dieser Effekt wird als Hysterese bezeichnet und hat zur Folge, dass der Magnetisierungszustand eines ferromagnetischen Stoffes nicht allein von den aktuellen Bedingungen, sondern auch von seiner magnetischen Vorgeschichte abhängt.^[87, 94]

In Abbildung 2.20 ist eine Hystereseschleife eines Ferromagneten mit der Magnetisierung M in Abhängigkeit eines äußeren Feldes H dargestellt. Die Initialpunkt $M = 0$ und $H = 0$ kann, nach Durchlaufen solch einer Schleife, nicht mehr erreicht werden.

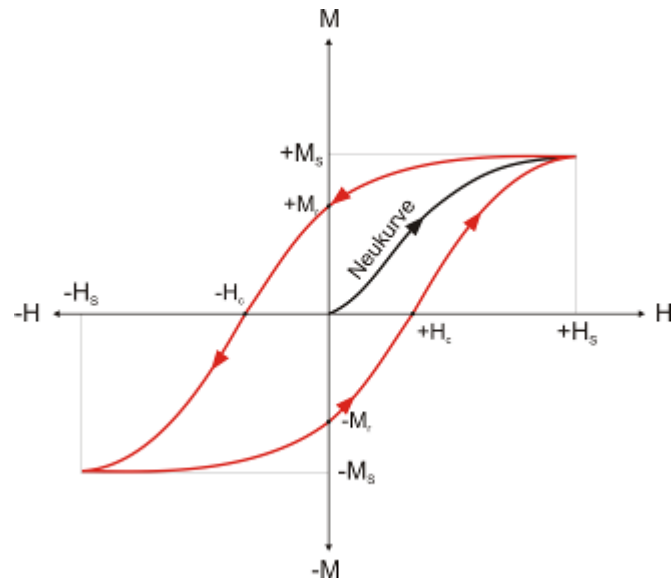


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung einer Magnetisierungs-Hysterese eines Ferromagnetens.

Zudem werden Ferromagnete in magnetisch harte und weiche Stoffe unterteilt. Magnetisch harte Stoffe besitzen eine große magnetische Remanenz und eine hohe Koerzitivfeldstärke, wodurch es zu einer Verbreiterung der Hysteresekurve kommt. Bei magnetisch weichen Stoffen ist dies genau umgekehrt.^[86] Diese Stoffe weisen eine verengte Hysteresekurve auf. So handelt es sich zum Beispiel bei Magnetit und MnZn-Ferriten um magnetisch weiche Stoffe und bei Barium-Ferrit um einen magnetisch harten Stoff.

Bei ferrimagnetischen Stoffen erfolgt unterhalb der Curie-Temperatur und innerhalb der „Weiss’schen Bereiche“ eine antiparallele Kopplung verschieden großer Spinnomente. In Abbildung 2.21 ist eine mögliche Anordnung antiparalleler Spinnomente im ferrimagnetischen Material dargestellt.

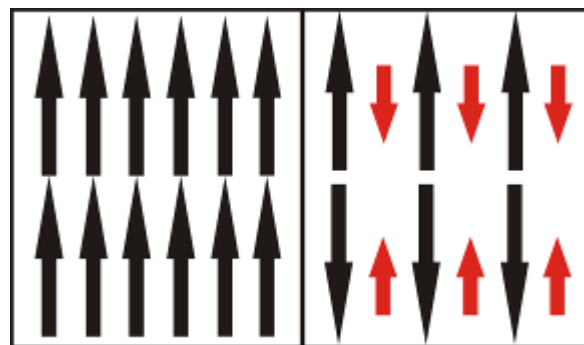


Abbildung 2.21: Links: Ausrichtung der atomaren Spins innerhalb einer Domäne eines Ferromagnetens. Rechts: Die magnetischen Momente der Spins in dem einen Untergitter sind wesentlich schwächer als die Spins des anderen.

Es resultiert ein magnetisches Moment und eine spontane Magnetisierung findet statt. Auf Grund der statistischen Verteilung der Momente der einzelnen Domänen tritt nach außen hin

keine Magnetisierung auf. Die Magnetisierung erfolgt erst beim Anlegen eines äußeren Feldes. Die Abhängigkeit der Magnetisierung von der Temperatur und dem äußeren Feld ist gleich der von ferromagnetischen Stoffen.

Bei Ferrofluiden zeigt sich ein weiteres Phänomen, von der Partikelgröße herrührend, der sogenannte Superparamagnetismus. Bei Ferromagneten hängen die magnetischen Eigenschaften von der Kristallitgröße ab. Das bedeutet, dass mit abnehmender Kristallitgröße die Anzahl der „Weiss’schen Bereiche“ pro Kristallit sinkt. Unterhalb einer kritischen Größe ist es deshalb energetisch ungünstiger, Domänenwände auszubilden. Ein solcher Kristallit wird daher als Eindomänen- bzw. Einbereichteilchen bezeichnet, d. h. alle atomaren, magnetischen Momente eines Kristallits sind parallel zueinander angeordnet. Unterhalb einer weiteren kritischen Größe ist bei endlichen Temperaturen eine stabile Ausrichtung des magnetischen Gesamtmoments nicht mehr möglich, da die zur Ummagnetisierung benötigte Energie kleiner als die thermische Energie ist. Der Festkörper als Ganzes verhält sich paramagnetisch mit der Besonderheit, dass die magnetischen Momente nicht einzeln, sondern in Blöcken auf externe Magnetfelder reagieren. Partikel, die auf Grund ihrer Größe eine Vielzahl magnetischer Domänen beinhalten, zeigen weitgehend konstante Werte bezüglich Remanenz M_R und Koerzitivfeldstärke H_C . Unterschreiten die Partikel eine Größe von ca. $100 \mu\text{m}$, nimmt die Anzahl der magnetischen Domänen innerhalb der Partikel ab. Dies wird von einem Anstieg der Koerzitivfeldstärke und einem Rückgang der Suszeptibilität begleitet.^[95] Für noch kleinere Partikel sinkt die Koerzitivfeldstärke rasch ab und erreicht den Wert Null. Die Eigenschaft der verschwindenden Remanenzen ist bei Ferrofluiden wichtig, um eine bleibende Agglomeration der Einzelpartikel zu vermeiden.^[95] In Abbildung 2.22 ist ein möglicher Hystereseverlauf eines superparamagnetischen Stoffes dargestellt.

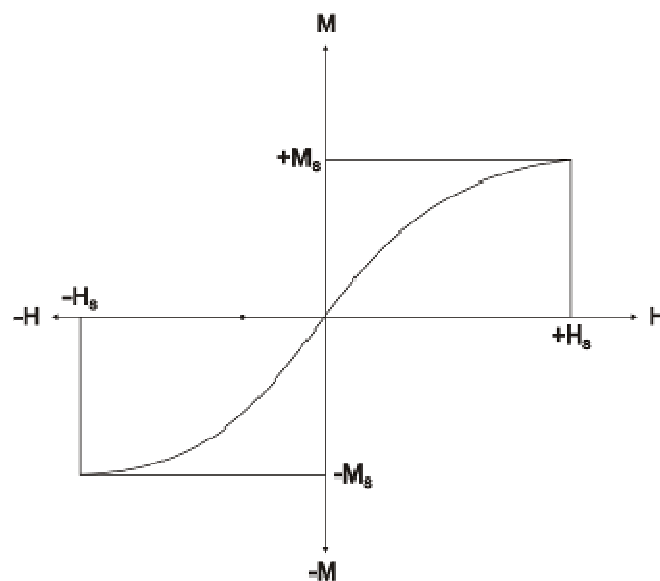


Abbildung 2.22: Schematische Darstellung einer Magnetisierungskurve von superparamagnetischen Stoffen.

2.2.6 RELAXATIONSVERHALTEN VON FERROFLUIDEN

Die Abnahme der Magnetisierung von Ferrofluiden nach Änderung des äußeren Magnetfeldes kann anhand zweier Prozesse beschrieben werden. Der erste Prozess beruht auf der Änderung der Magnetisierung durch die Rotation des gesamten Partikels um seine eigene Achse. Das magnetische Moment ist an die Kristallstruktur des Partikels gebunden. Dieses wird als Brown'sche Relaxation bezeichnet. Dabei beschreibt die Brown'sche Relaxation die Änderung der Magnetisierung durch rotatorische Diffusion. Auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung des Suspensionsmediums verlieren die Teilchen ihre ursprüngliche Ausrichtung.^[83] Die Geschwindigkeit der Brown'schen Relaxation τ_B wird durch nachfolgenden Zusammenhang wiedergegeben:

$$\tau_B = \frac{3 \cdot V_{Hydro} \cdot \eta}{k_B \cdot T} \quad (2-13)$$

V_{Hydro} steht für das hydrodynamische Volumen des Teilchens und η für die Viskosität des Suspensionsmediums.

Der zweite Prozess, genannt Neel'sche Relaxation, beruht auf der Umorientierung des magnetischen Moments innerhalb eines Partikels. Nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes nehmen die magnetischen Momente, aus energetischen Gründen, im Bezug auf die Kristallachse und bzw. oder der äußeren Form des Kristalls eine Vorzugsorientierung an. Dies wird als Anisotropie bezeichnet und durch die Konstante K definiert.^[83] Die Anisotropiekonstante ist abhängig von der Kristallstruktur und der Partikelmorphologie. Zur Umorientierung des magnetischen Moments muss die Energiebarriere KV überwunden werden. Demzufolge muss die thermische Energie ($KV = k_B T$) hoch sein, damit die Umorientierung im Teilchen ausgelöst wird. Entsprechend ergibt sich für die Neel'sche Relaxationszeit τ_N folgender Ausdruck:

$$\tau_N = f_0^{-1} \cdot \exp\left(\frac{K \cdot V}{k_B \cdot T}\right) \quad (2-14)$$

V ist das Volumen des magnetischen Kerns des Teilchens und f_0^{-1} ist die Auslöschzeit und wird mit $\sim 10^9 \text{ s}^{-1}$ angenähert.^[83]

Während die Neel'sche Relaxation eine exponentielle Abhängigkeit von der Partikelgröße aufweist, ist die Brown'sche Relaxation deutlich weniger vom hydrodynamischen Volumen beeinflusst. In Abbildung 2.23 ist die Abhängigkeit der Brown'schen und Neel'schen Relaxation vom Partikelvolumen dargestellt. Im Allgemeinen liegt der Prozess mit der

kürzesten Relaxationszeit vor. Jedoch treten auf Grund der Größenverteilung der Partikel beide Prozesse auf. Die effektive Relaxationszeit τ_{eff} lässt sich wie folgt berechnen:

$$\tau_{eff} = \frac{\tau_B \cdot \tau_N}{(\tau_B + \tau_N)} \quad (2-15)$$

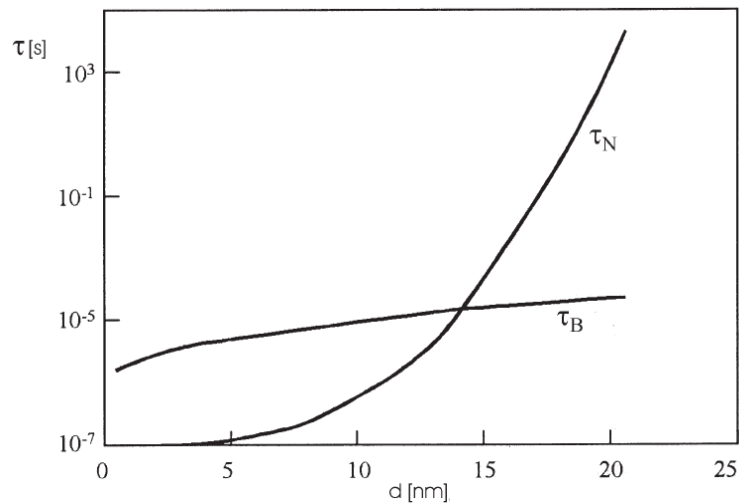


Abbildung 2.23: Darstellung der Brown'schen und Neel'schen Relaxationszeit eines Ferrofluids als Funktion des Partikelvolumens.^[83]

2.2.7 ANWENDUNGSBEREICHE

Auf Grund der besonderen Eigenschaften von Ferrofluiden finden diese in vielen Bereichen der Technik, Mechanik und Medizin Verwendung. Die wohl bekannteste Anwendung für Ferrofluide ist die zur reibungsarmen Abdichtung von rotierenden Achsen. Hierzu wird zwischen die Achsen, die aus einem hochpermeablen Material angefertigt sind, und den Permanentmagnet ein Tropfen Ferrofluid gegeben. Diese starken magnetischen Kräfte reichen aus, um die Achsen abzudichten. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Dichtungsmaterialien weist dieses Verfahren eine verringerte Reibung und einen erniedrigten Verschleiß auf.^[83] Standardgemäß wird diese Methode zur Abdichtung von Röntgen-Drehanoden oder Festplattenlaufwerken eingesetzt (siehe Abbildung 2.24).

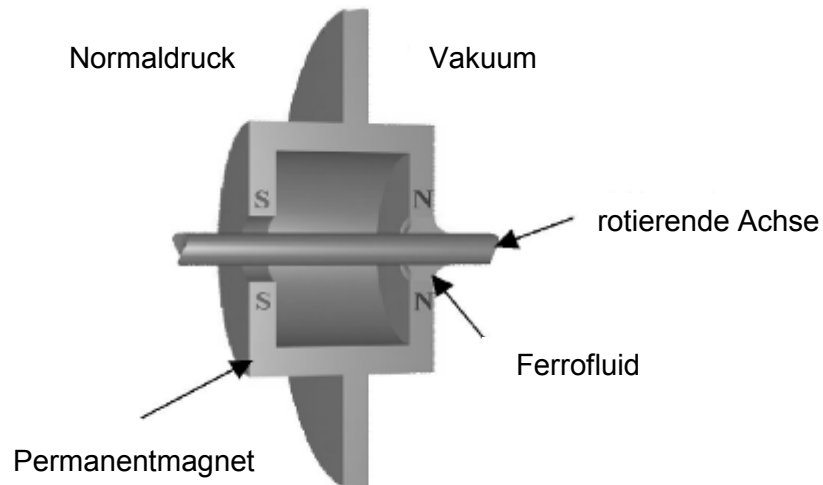


Abbildung 2.24: Schematische Darstellung der Abdichtung einer rotierenden Achse mittels eines Ferrofluids.^[83]

Ein weiteres aktuelles Anwendungsgebiet von Ferrofluiden ist die Kühlung von Lautsprechern. Das Ferrofluid umgibt die Schwingspule und bewirkt, dass Wärme, die zwischen der Schwingspule und dem Permanentmagneten entsteht, besser abgeleitet und dadurch die Bewegung der Membran gedämpft wird. Zudem wird die magnetische Kraft des Fluids durch die vergrößerte magnetische Suszeptibilität erhöht.^[83]

Des Weiteren können Ferrofluide dazu verwendet werden nichtmagnetische Stoffe genügend verschiedener Dichte voneinander zu trennen. Die zu trennenden Stoffe werden zusammen mit dem Ferrofluid in ein inhomogenes Magnetfeld eingebracht, das sich zwischen zwei Polen eines Elektromagnetens ausbildet. Dadurch entsteht, zusätzlich zur der schon vorhandenen Schwerkraft, eine nach oben gerichtete Kraft, die dafür sorgt, dass die Stoffe einen zusätzlichen Auftrieb erfahren. Wird die Stärke des Magnetfeldes geändert, verändert sich damit auch die Auftriebskraft. So kann die Stärke des Magnetfeldes an die Dichte der zu trennenden Materialien angepasst werden. Materialien mit einer größeren Dichte sinken dann zu Boden, alle anderen Stoffe treiben an die Oberfläche. So ist es möglich, durch Veränderung des Feldes ein Stoffgemisch zu trennen. Anwendung findet diese Methode bei der Gewinnung von Gold und Edelsteinen. Außerdem wird sie in der Automobilindustrie zur Rückgewinnung von Metallen aus Autoteilen sowie bei der Entsorgung von Elektronikschrott eingesetzt.^[1]

Eine bedeutende medizinische Anwendung der Ferrofluide ist die Hyperthermie. Diese stellt eine Ergänzung zu den bisherigen Behandlungen, wie Chemotherapie, Radiotherapie und chirurgische Eingriffen in der Krebstherapie, dar.^[28, 96] Der Grundgedanke ist die Verwendung magnetischen Induktionshyperthermie. Diese beruht auf der vom magnetischen

Hystereseverlust und den Relaxationsprozessen (siehe Kapitel 2.2.6 „Relaxationsverhalten von Ferrofluiden“) produzierten Wärme, wenn magnetischen Nanopartikel einem variierenden magnetischen Feld ausgesetzt sind.^[97, 98]

In der Medizin definiert sich der Begriff der Hyperthermie als die künstliche Überwärmung des Gesamtorganismus auf 40,0°C – 42,0°C (systemische Hyperthermie) oder begrenzter Körperregionen auf über 42,0°C (regionale Hyperthermie). Sie wird meistens mit anderen Krebsbehandlungsmethoden wie Chemo- oder Strahlentherapie kombiniert, denn erhöhte Temperaturen begünstigen eine verstärkte Durchblutung im Tumorgewebe und führen dadurch zu einer signifikant verbesserte Wirkung von Strahlung oder Zytostatika (Chemotherapiesubstanzen). Der so genannte synergistische Effekt der Hyperthermie führt zu einer Potenzierung der Wirksamkeit bei Kombination der Standardtherapien mit therapeutischer Hyperthermie. Zytostatika wirken bei Temperaturen über 40°C deutlich aggressiver als bei normaler Körpertemperatur. Darüber hinaus sind die thermisch vorgeschädigten Tumorzellen leichter durch die Strahlentherapie zu bekämpfen, da ihre Reparaturfähigkeiten herabgesetzt sind. Bei einer Strahlentherapie erfolgt der wärmebedingte Funktionsverlust der Reparaturenzyme, die sonst die Strahlenschäden an der DNA reparieren würden und so das Überleben von Tumorzellen ermöglichen würden. Werden diese Enzyme durch Wärme geschädigt, sterben die Tumorzellen bereits bei kleineren Strahlendosen ab. Durch Wärme werden auch andere Proteine beeinträchtigt, die zum Beispiel dafür verantwortlich sind, dass chemoresistente Tumorzellen die für sie schädlichen Zytostatika aus den Zellen wieder herausschleusen. Diese Proteine werden durch Wärme ebenfalls zerstört, wodurch die chemoresistenten Tumorzellen sterben, da die Wirkstoffe weiterhin in den Zellen verbleiben. Bei der Magnetflüssigkeits-Hyperthermie werden mit Hilfe eines externen Magnetfeldes die Nanopartikel in die Tumorregion gebracht und dort mittels elektromagnetischer Wechselfelder (Frequenzen im 100 kHz-Bereich) aufgeheizt. Dies hat den Vorteil, dass nur das Tumorgewebe erhitzt wird und es zu keiner Schädigung des restlichen gesunden Gewebes kommt.^[27, 99-102]

Bei dem sogenannten Magnetic Resonance Imaging (MRI) handelt es sich um ein Verfahren, das ebenso wie die Magnetresonanztomographie magnetische Felder nutzt. Während im Magnetresonanztomographen die Wasserstoffatome im Körper selbst magnetisiert werden, lassen sich mit Hilfe von MRI räumliche Aufnahmen dadurch erzeugen, dass die Magnetisierung magnetischer Nanopartikel gemessen wird (siehe Abbildung 2.25). Der Bildkontrast basiert auf den unterschiedlichen Relaxationszeiten sowie dem unterschiedlichen Gehalt an Wasserstoffatomen in den diversen Geweben, wie beispielsweise den Knochen oder den Muskeln.^[103] Durch gezielte Markierung des zu untersuchenden oder des umgebenden Gewebes kann mit Hilfe der Partikel Einfluss auf den Kontrast genommen werden. Diese Partikel können als Kontrastmittel, zum Beispiel in der

Blutbahn eines Patienten, eingesetzt werden. Allerdings müssen die Nanopartikel mit bioverträglichen Substanzen, beispielsweise Dextran, maskiert werden.^[29, 104-109] So werden bereits Magnetit Partikel erfolgreich zur Abbildung des Magen-Darm-Trakts, der Leber und von Gehirntumoren eingesetzt.

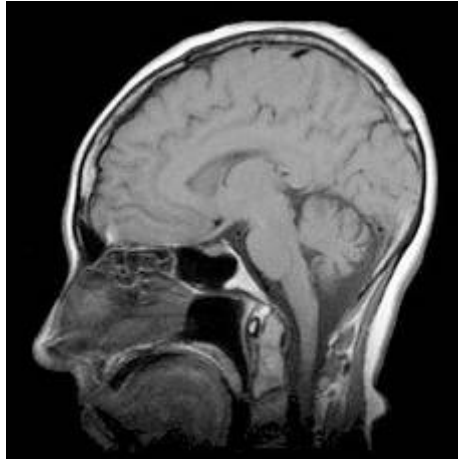


Abbildung 2.25: MRI-Aufnahme eines menschlichen Kopfes.^[110]

Bereits auf dem Markt erhältlich ist das Kontrastmittel Endorem[®]. Kurz vor der Zulassung steht das Kontrastmittel Resovist[®]. Beide dienen zur Detektion von Lebertumoren und werden intravenös appliziert. In Endorem[®] wirken Dextran-stabilisierte Nanopartikel, mit einer Größe zwischen 100 nm und 300 nm, bei Resovist[®] handelt es sich um Carboxymethyl-Dextran-beschichtete Partikel mit 60 nm Durchmesser. Die dabei implizierte Dosis liegt bei 6 μmol bis 11 μmol Eisen pro Kilogramm Körpergewicht und somit weit unter der Menge, die bei toxikologischen Tests eingesetzt wurden (siehe Kapitel 2.1.6 „Toxizität von Nanopartikeln“).

2.3 LAYER-BY-LAYER-VERFAHREN ZUM AUFBAU VON MULTIFUNKTIONALEN SCHICHTEN

2.3.1 LAYER-BY-LAYER-DEPOSITION

Das Layer-by-Layer-Verfahren ist eine effektive und einfache Methode zur Herstellung von funktionalisierten Oberflächen und dünnen Filmen. Es kann nahezu jede beliebige Oberfläche modifiziert werden, dabei adsorbieren beispielsweise Polykationen und Polyanionen sukzessiv an diese Oberfläche. Das Verfahren selbst wurde 1990 von Gero Decher^[111, 112] publiziert und ist seitdem in vielen Bereichen der Chemie und Oberflächentechnologie angewandt und weiterentwickelt worden.

Zum Zusammenhalt der einzelnen Schichten können verschiedene Arten von Wechselwirkungen in Betracht gezogen werden. Es können beispielsweise elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, kovalenten Bindungen, Charge-Transfer Wechselwirkung oder Wechselwirkungen, die auf Grund von Stereo- oder Metallkomplexen entstehen, verwendet werden. Auf die elektrostatische Wechselwirkung wird in Kapitel 3.3 näher eingegangen. Für einen intensiveren Einblick ist folgende Literaturstelle zu empfehlen.^[113]

Auf Grund von Wasserstoffbrückenbindungen ist es möglich pH- und temperatur-abhängige Materialien zu verwenden. Des Weiteren können definierte Strukturen zur Vernetzung zwischen den Schichten eingesetzt werden. Durch die hohe Anzahl an verschiedenen Polymeren kann sowohl im Wässrigen als auch in organischen Medien gearbeitet werden. Im wässrigen Medium können beispielsweise Poly(acrylamid) und Poly(vinylalkohol) verwendet werden, im organischen Medium kommen zum Beispiel Poly(4-vinylpyridin) und Poly(4-vinylphenol) zum Einsatz (Struktur der Polymere siehe Abbildung 2.27).^[114-116]

Die Charge-Transfer-Wechselwirkung beruht auf der Interaktion zwischen einer Elektronen-Donor- und einer Elektronen-Akzeptor-Gruppe. Für solche Wechselwirkungen kommen Polymere wie Polyethylenimin als Donor und Poly(4-vinylpyridin) als Akzeptor^[117] oder Poly(maleinanhydrid-co-styrol) und organische Amine^[118] in Betracht.

Die Wechselwirkungen, die über Stereokomplexe erzeugt werden, beruhen zum Beispiel auf der Interaktion zwischen isotaktischen und syndiotaktischen Polymeren wie Poyl(methylmethacrylat) und Enantiomeren, wie L- und D-Polylactid. Zum Beispiel ist es möglich bei Poyl(methylmethacrylat) LbL-Filmen andere Materialien wie Enzyme oder Antikörper mit einzubauen.^[119]

Auf Grund der verschiedenen Anwendungsbereiche haben sich auch unterschiedliche Verfahrensmethoden zum Aufbau solcher Multischichten entwickelt. Im Folgenden soll kurz auf die einzelnen Methoden eingegangen werden. Einen intensiveren Einblick in die

Verfahrenswelt von Multischichten liefert zum Beispiel das Buchkapitel in *Comprehensive Polymer Science*, 2nd ed. von E. Seyrek und G. Decher.^[113]

Alle Verfahrenstechniken, die zum Aufbau von Multischichten verwendet werden können, beruhen auf dem gleichen Grundprinzip. Die Variation besteht in der Auftragungsart des Polyelektrolyten auf die Oberfläche.

Bei dem ersten Verfahren handelt es sich um die Dipping-LbL-Technik. Dazu kann ein negativ geladenes Substrat in eine Lösung, bestehend aus einem Polykation eingetaucht. Nach einer gewissen Adsorptionszeit wird das beschichtete Substrat wieder herausgeholt und mit einer Waschlösung gereinigt. Da mehr Polymer, als zur Ladungskompensation nötig wäre, adsorbiert wird, tritt eine Ladungsinversion auf und das jetzt positiv geladene Substrat wird in eine Lösung, bestehend aus einem negativ geladenen Polyelektrolyten, getaucht. Nach einer bestimmten Zeitspanne wird das negativ geladene Substrat wieder herausgeholt und mit einer neuen Spüllösung gewaschen. Diese Schritte werden so lange wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an Schichten erreicht wurde. Die schematische Darstellung dieser Verfahrenstechnik ist in Abbildung 2.26 wiedergegeben.

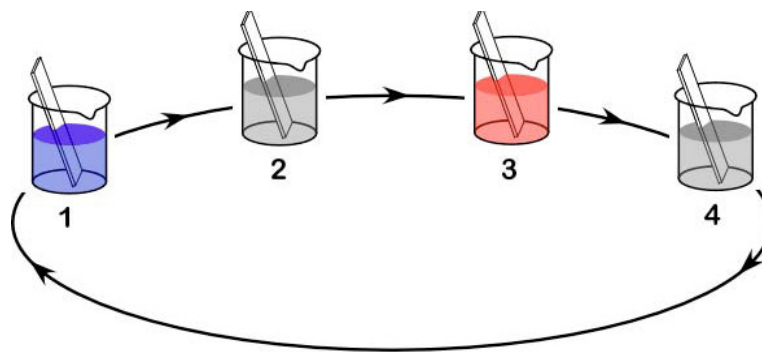


Abbildung 2.26: Schematische Darstellung der LbL-Depositions Technik zur Herstellung von multifunktionalen Schichten auf Oberflächen. 1) Eintauchen der Schicht in die Polyanion-Lösung, 2) Spüllösung, 3) Eintauchen des negativ geladenen Substrats in die Polykation-Lösung, 4) Spüllösung. Die Wiederholung der einzelnen Schritte erfolgt solange, bis die gewünschte Anzahl an Schichten erreicht ist.^[111]

Diese Methode eignet sich auch, um multifunktionale Schichten auf Kolloiden auszubilden. Hierbei wird der Schritt des Herausziehens aus der Polyelektrolyt-Lösung durch Zentrifugieren ersetzt. Handelt es sich bei den Kolloiden um magnetische Partikel, so können diese durch magnetische Trennung oder Dialyse gereinigt werden.

Stehen einmal die Parameter, wie Dippzeit, Konzentration der Polymerlösungen, Ionenstärke, Temperatur, pH-Wert, etc. fest, eignet sich die Methode sehr gut um stabile und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass nach dem Herausholen des Substrats ein Konzentrationsgefälle an dem Polymer auf der Oberfläche entstehen kann. Dies wird bei Verwendung des Spray-LbL-Verfahrens

vermieden. Bei diesem Verfahren werden das Polymer und die Waschlösung nacheinander auf das Substrat gesprüht. Vorteil dieser Methode ist die Ausbildung einer gleichmäßig verteilten Polymerschicht. Bei dem hydrodynamischen LbL-Verfahren entsteht die Schicht auf Grund von Massentransport durch Konvektion. Dabei dreht sich das Substrat während es in eine Polyelektrolytlösung / Waschlösung getaucht wird oder die umgebende Lösung bewegt sich. Die Spin-LbL-Technik ähnelt dem hydrodynamischen Verfahren. Im Unterschied zum hydrodynamischen Verfahren dreht sich hier die Fläche, auf der sich das Substrat befindet, mit einer hohen Geschwindigkeit. Auf Grund der Scherströmung, die durch die Zentrifugalkraft, die auf die Flüssigkeit wirkt, entsteht, adsorbiert das Polymer in wenigen Sekunden an der Oberfläche. Durch die Sprüh- bzw. Spin-Technik kann das LbL-Verfahren um einen Faktor 100 beschleunigt werden.

2.3.2 AUFBAU VON POLYELEKTROLYT-MULTISCHICHTEN

Für LbL-Depositionen gibt es eine weite Palette an Polymeren, die von anorganisch bis organisch, von hoher bis geringer Molmasse und von starken bis schwachen Elektrolyten reicht. Daneben können auch verschiedene Wechselwirkungen auftreten, weshalb es für die Layer-by-Layer-Deposition von entscheidender Bedeutung ist, welche Polyelektrolyten verwendet werden. Je nach Anwendungsmöglichkeit und verwendeter Technik kommen dabei verschiedene Polymere in Betracht.

Zum Beispiel werden für den Aufbau von multifunktionalen Schichten für den elektronischen und optoelektronischen Bereich, wie LEDs oder Photovoltaikzellen, andere Polymere benötigt als für den biomedizinischen Sektor. So müssen die verwendeten Polymere in der Medizin biokompatibel, biologisch abbaubar und vor allem ungiftig sein. Diese Eigenschaften spielen bei den organischen und polymeren Halbleitern keine entscheidende Rolle. Hier werden vor allem Farbstoffe und Nanopartikel verwendet, die n- und p-Halbleiter Eigenschaften aufweisen. So werden für p-Halbleiter verschiedene Arylamin-Derivate und für n-Halbleiter perfluorierte Oligophenylene oder fluorierte Oligothiophene eingesetzt.

Für biomedizinische Anwendungen kommen eher Polymere wie Polyethylenimin (PEI), Polypeptide (z. B. Poly(L-Lysin)), Biopolyelektrolyte (z. B. DNA, Chitosan), Polyarylsäure (PAA) oder Polyallylamin (PAH) in Frage. Abbildung 2.27 stellt die Struktur von verschiedenen Polyelektrolyten dar.

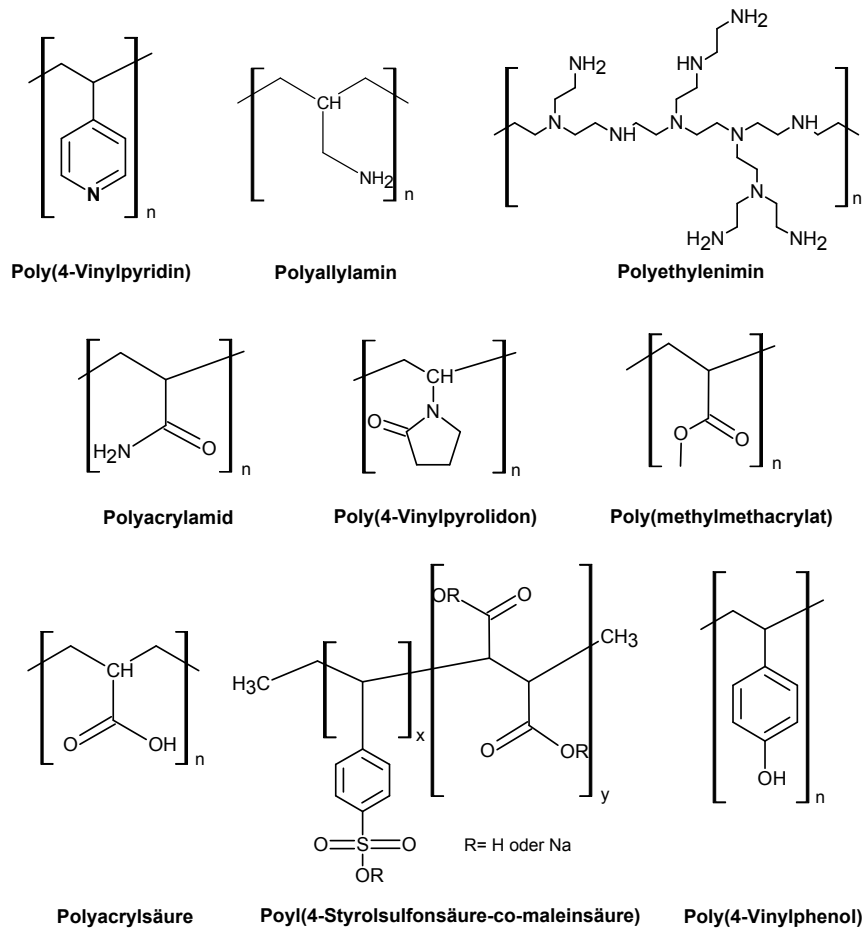


Abbildung 2.27: Darstellung der Strukturen von einsetzbarer Polyelektrolyten zum Aufbau von multifunktionalen Schichten.

Des Weiteren kommt es auf die Art der Wechselwirkung an, die zwischen den einzelnen Schichten herrschen soll. So werden bei der Charge-Transfer-Wechselwirkung eher Polymere verwendet, die entweder eine Elektronen-Akzeptor- oder eine Elektronen-Donor-Gruppe tragen, während bei der Wechselwirkung, bedingt durch Stereokomplexe, eher isotaktische bzw. syndiotaktische Polymere eingesetzt werden.

Bei schwachen Polyelektrolyten, wie beispielsweise Polyacrylsäure und Polyallylamin, kommt es stark auf den pH-Bereich an, in dem gearbeitet wird. Bei diesen Polymeren können die Ladungsverteilungen und Dichte in Abhängigkeit des pH-Werts variiert werden. Nimmt die Ladungsdichte ab, nimmt auch die intramolekulare Wechselwirkung zwischen den Schichten ab. Dies hat zur Folge, dass der schwache Elektrolyt nicht so stark adsorbiert wird, somit Loops ausbildet und eine dickere Schicht entsteht. Die Schichtdicke ist demzufolge von der Ladungsdichte und dem pH-Wert abhängig.^[120, 121] Auch ist es möglich, die Ladungsdichte der Schicht nach der Adsorption zu ändern. Dies übt einen Einfluss darauf aus, wie viel von dem gegen-geladenen Polymer adsorbiert werden kann. Der zuvor beschriebene Effekt tritt aber auch bei hoher Ladungsdichte auf, nur in umgekehrter Weise,

d. h. eine hohe Ladungsdichte sorgt für eine starke Adsorption des Polymers und somit zur Bildung einer dünneren Schicht.

Shiratori et al.^[122] berichteten von verschiedenen pH-Wert-Bereichen, in denen PAH / PAA Multischichten gebildet werden können. In einem pH-Bereich von 6 bis 7,5 weisen beide Polymere eine volle Ladungsdichte auf und die daraus resultierenden Schichten sind dünn und eben, so wie es bei starken Elektrolyten der Fall ist. Für einen höheren pH-Wert-Bereich (pH 7,5 bis 9) liegt PAH deprotoniert und demzufolge gering geladen vor, wohingegen PAA immer noch vollständig geladen vorliegt. Dies führt zu einer teilweisen Desorption des Polymers PAH, wodurch sich eine dicke und unebene Schicht ausbildet. Diese Schicht kann bis zu 15mal dicker sein als die im pH-Bereich 6 bis 7,5 gebildete Schicht. Das gleiche Phänomen tritt bei einem pH-Wert-Bereich von 4,5 bis 6 ebenfalls für PAA auf. In einem pH-Wert-Bereich von 2,5 bis 4,5 liegt PAA mit einer geringeren Ladungsdichte vor, während PAH vollständig geladenen ist. Dies führt dazu, dass die PAA Schicht mit sinkendem pH-Wert dicker wird, die Ladungsdichte der PAH Schicht jedoch zunimmt, wodurch diese dünner wird.

Die Ionenstärke hat ebenfalls einen Einfluss auf Schichtmorphologie und Topologie. So liegen Polymere bei einer geringen Ionenstärke I ($0 \leq I \leq 0,01$ M) eher linear vor. Dies dazu führt, dass das Wachstum der Schichten gleichmäßig ist und die Ausbildung von dünnen Schichten begünstigt wird. Mit Zunahme der Ionenstärke ($I \leq 0,01$ M) nimmt auch die Dicke der Schicht zu, da die Ladungen teilweise durch die vorhandenen Gegenionen kompensiert werden und es somit zur Bildung von Loops kommt.^[123-125] Trotzdem erfolgt die Zunahme der Schichtdicke sowie die Anzahl der adsorbierten Polymere in Abhängigkeit der Ionenstärke in einem linearen Bereich.

2.3.3 ANWENDUNGSBEREICHE

Hinsichtlich der Variationsmöglichkeiten bei den Layer-by-Layer-Techniken werden LbL-Depositionen in vielen verschiedenen Bereichen der Chemie, Biologie, Medizin und Technik angewandt.^[113] Beispielsweise werden Filme für Sensoren oder optische Bauelemente mit dem Layer-by-Layer-Verfahren beschichtet. So konnten elektronisch-optische Berührungssensoren entwickelt werden, die aus verschiedenen Schichten von Gold und Halbleitern-CdS-Nanopartikeln bestehen. Diese Schichten sind mit Hilfe von dielektrischen Barrieren, die wiederum aus verschiedenen PSS und PAH Schichten bestehen, voneinander getrennt.^[126] So können LbL-funktionalisierte Filme auch als Nanoreaktoren zur Herstellung von metallischen und magnetischen Nanopartikeln sowie von

Halbleiter Nanopartikeln fungieren.^[127-131] LbL-funktionalisierte Filme finden unter anderem als Energiespeicher wie in Lithium-Ionen-Batterien^[132] oder als Energiewandler wie in Brennstoffzellen Anwendung.^[133, 134] Die LbL-Filme bieten in solchen Geräten den Vorteil eines effektiven Ionentransports, da die Ionenleitfähigkeit in den multifunktionalen Schichten im feuchten sowie im trockenen Zustand funktionieren kann. Einen weiteren Anwendungsbereich stellen die Biosensoren und Solarzellen^[135] dar. Vor kurzem wurde ein Fliesinjektionsglucosesensor entwickelt. Bei diesem Sensor wurde ein Anionenaustauscherharz via LbL-Verfahren mit Glucoseoxidase und Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) abwechselnd beschichtet und in eine amperometrische Zelle gepackt.^[136]

Durch das LbL-Verfahren eröffnen sich in der Biomedizin eine Reihe neuer und interessanter Wege für die Entwicklung von Drug-Delivery Systemen, Biosensoren oder Tissue Engineering.^[137] Es bietet die Möglichkeit, unter milden und wässrigen Bedingungen multifunktionale Systeme aufzubauen, die unter bestimmten Bedingungen die entsprechende Wirkung freisetzen oder aktiviert werden. So können beispielsweise in verschiedene Schichten verschiedene Biomoleküle (z. B. DNA, Proteine, Zellen, etc.) eingebaut werden, die weder ihre Aktivität noch ihre Struktur verlieren.^[138, 139] Dadurch besteht die Option, Wirkstoffe in die einzelnen Schichten einzubauen, um eine kontrollierte Wirkstoff-Freisetzung zu erzielen. Diese kontrollierte Freisetzung kann durch bestimmte Bedingungen wie pH-Wert-Änderung, Bindungsspaltung oder Abbau der Schichten erreicht werden. Einen guten Überblick über die biomedizinischen Anwendungsgebiete der LbL-Assembly bietet das Buchkapitel von G. Decher „Multifunctional Layer-by-Layer Architectures for Biological Applications“.^[113]

Die Verkapselung durch Mizellen bietet zum Beispiel die Möglichkeit, hydrophobe Wirkstoffe unter wässrigen Bedingungen in die Schichten mit einzubauen.^[116, 140]

So beschichteten Majewski et al. Eisenoxide abwechselnd mit PAA und PAH und setzten das Copolymer Poyl(ethylenimin)-Poly(ethylenglycol) als äußerste Schicht, um die kolloidale Stabilität zu fördern. An diese Schicht wurde das Medikament Cisplatin angebunden. Anschließend inkubierten sie Jurkat-Zellen mit diesen Partikeln und stellten fest, dass der Zelltod mit weniger als der Hälfte der Maximalkonzentration im Vergleich zum freien Cisplatin, welches sonst in den Tests verwendet wird, erreicht werden kann.^[141]

Kim et al. synthetisierten Mizellen bestehend aus Poly(ethylenoxid)-block-Poly(ϵ -caprolacton), und verkapselten diese mit dem Bakteriostatikum Triclosan. Anschließend wurde ein Layer-by-Layer-Assembly aus dem Polyethylenoxid der Mizellen und der Polyacrylsäure aufgebaut. Die Schichten sind durch Wasserstoffbrückenbindungen untereinander verknüpft. Steigt jetzt der pH-Wert auf 7, so lösen sich die Bindungen und setzen dadurch das Bakteriostatikum frei (siehe Abbildung 2.28).

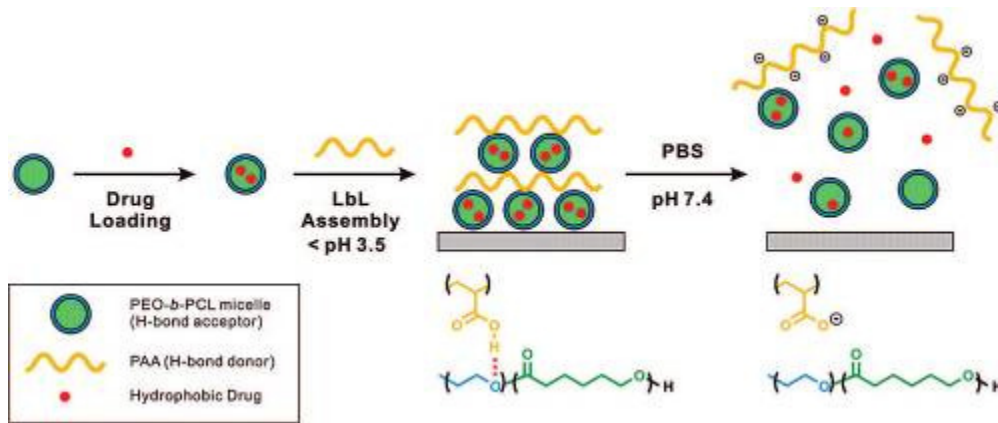


Abbildung 2.28: Schematische Darstellung der kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung mittels LbL-Assembly.^[140]

Weiterhin soll noch kurz auf die Arbeiten der Forschungsgruppe von Prof. F. Caruso eingegangen. Diese Forschungsgruppe synthetisierte biokompatible Kapseln, in die hydrophobe Stoffe eingeschlossen werden können (siehe Abbildung 2.29).^[142] Dazu wird in Gegenwart von hydrophoben Stoffen (z. B. Wirkstoffe, mit Ölsäure stabilisierte magnetische Nanopartikel oder Quantum Dots) eine Mizelle, bestehend aus Dimethyldiethoxysilan (DMDES) hergestellt. Anschließend wird diese Zelle mit Polydopamin (PDA) beschichtet und mit Hilfe von Ethanol der DMDES Kern wieder aufgelöst. So entsteht eine Polydopamin Kapsel, die mit hydrophoben Stoffen beladenen ist. Durch diese Synthese ist es möglich auch hydrophobe Wirkstoffe in den Körper einzuschleusen und mit Hilfe eines äußeren Magnetfeldes an den Zielort zu navigieren.

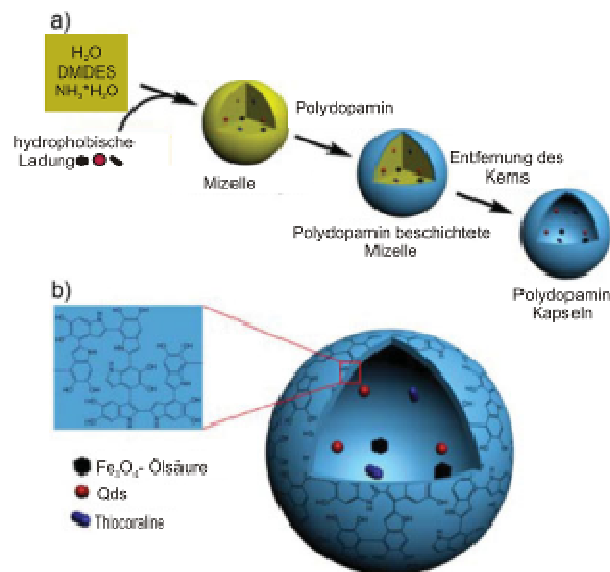


Abbildung 2.29: a) Schematische Darstellung der Verkapselung von hydrophoben Stoffen in PDA-beschichteten Mizellen. b) Vergrößerte Darstellung der beladenen Mizellen.^[142]

3. METHODISCHER TEIL

3.1 SCHWINGUNGSSPEKTROSKOPIE

3.1.1 EINFÜHRUNG IN DIE SCHWINGUNGSSPEKTROSKOPIE

Die Wechselwirkung (Absorption oder Streuung) zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie wird im Allgemeinen als Spektroskopie bezeichnet. Dabei kann das Licht entweder als Welle oder als Strahlung von Teilchen (Photon, Lichtquant) angesehen werden. So besitzt die elektromagnetische Strahlung eine Frequenz ν und eine Wellenlänge λ , die mit der Lichtgeschwindigkeit c über folgende Gleichung in Zusammenhang gebracht werden kann:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}. \quad (3-1)$$

Wird hingegen Licht als Strahlung von Teilchen betrachtet, so berechnet sich die Energie E , die notwendig ist, um ein Photon in den angeregten Zustand zu versetzen, nach de Broglie mit folgender Gleichung

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}, \quad (3-2)$$

wobei h die Plancksche Konstante ($\sim 6,627 \cdot 10^{-34}$ J·s) darstellt. Die Energiedifferenz ΔE ist definiert als $\Delta E = E_1 - E_2$, mit $E_{1,2}$ als zwei benachbarte Energieniveaus.

Bei der Schwingungsspektroskopie wird eine Schwingung nur angeregt, wenn dem Molekül die dazu notwendige Energie ΔE zugeführt wird. Dies geschieht durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung. Wird die Frequenz dieser Anregung gemessen, so kann eine Aussage über die Struktur des zu untersuchenden Moleküls getroffen werden. Bei der Raman-(Stokes) und FT-IR-Spektroskopie wird die Anregung der Molekülschwingung und -rotation hervorgerufen. Bei der FT-IR-Spektroskopie wird die Absorption der infraroten Strahlung gemessen, wohingegen die Raman-Spektroskopie auf der Detektion von Streustrahlung basiert. Einen ausführlicheren Einblick in die Spektroskopie bieten die Werke von Ferraro et al.^[143] und Hollas et al..^[144] Das Tabellenwerk von G. Socrates wurde in der Arbeit für die Charakterisierung der verschiedenen Schwingungen herangezogen.^[145]

Die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ stellt den reziproken Wert der Wellenlänge dar und gibt die Lage der Absorptionsbande im Spektrum an. Somit ist die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ direkt proportional zu der Energie E und der Frequenz ν :

$$E = h \cdot c \cdot \tilde{\nu}. \quad (3-3)$$

Die Grundlage der Schwingungsspektroskopie kann unter Verwendung des harmonischen Oszillators aus der klassischen Quantenmechanik erklärt werden. Dieses Modell bezieht sich auf zweiatomige Moleküle. Dabei wird angenommen, dass eine Auslenkung r aus der Ruhelage proportional zur entgegengesetzt wirkenden Rückstellkraft der Bindung zwischen den beiden Atomen ist (siehe Abbildung 3.1). Die potentielle Energie $V(r)$ eines Moleküls wird dabei in Abhängigkeit von der Auslenkung durch eine Parabel nach Gleichung (3-4) mit k als Kraftkonstante und r_0 als Gleichgewichtsabstand beschrieben:

$$V(r) = \frac{1}{2} k \cdot (r - r_0)^2. \quad (3-4)$$

Auf Grund der quantenmechanischen Vorstellungen können die einzelnen Energieniveaus nur ganzzahlige, diskrete Werte annehmen. Diese Werte müssen größer oder gleich Null sein. Beim Modell des harmonischen Oszillators sind diese Energieniveaus äquidistant (siehe Abbildung 3.1). Da die Molekülschwingungen gequantelt sind und aus einer Grundschwingung ($n = 0$) und Oberschwingungen ($n = 1, 2, 3, \dots$) bestehen, müssen die Energieniveaus definierte Werte annehmen. Unter Berücksichtigung dieser Randbedingung ergibt sich für die Energie E_n der Schwingungsniveaus folgende Gleichung:

$$E_n = h \cdot \nu \cdot \left(n + \frac{1}{2}\right), \quad (3-5)$$

mit n als Schwingungsquantenzahl. Die Frequenz ist dabei wie folgt mit μ als reduzierte Masse dargestellt

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}}. \quad (3-6)$$

Jedoch werden in Wirklichkeit die Energiedifferenzen zwischen den einzelnen Schwingungsniveaus mit zunehmendem n immer kleiner, wodurch das Modell des harmonischen Oszillators nicht mehr angewendet werden kann (siehe Abbildung 3.1). Es

existiert eine Dissoziationsgrenze, an der das Molekül in seine Atome gespalten wird. Dieser Potentialverlauf wird durch das Morse Potential

$$V(r) = D_E \cdot \left[1 - e^{-a \cdot (r - r_0)} \right]^2 \quad (3-7)$$

exakter wiedergegeben. Dabei ist D_E die Dissoziationsenergie und $a = \sqrt{\frac{k}{2 \cdot D}}$.

Die Energie dieser Schwingungsniveaus ist durch Gleichung (3-9) definiert:

$$E_n = h \cdot \nu \cdot \left(n + \frac{1}{2} \right) - x_D \cdot h \cdot \nu \cdot \left(n + \frac{1}{2} \right)^2, \quad (3-8)$$

mit x_D als Anharmonizitätskonstante, die sich wie folgt berechnen lassen kann

$$x_D = \frac{a^2 \cdot \hbar}{2\mu \cdot \nu}. \quad (3-9)$$

In Abbildung 3.1 sind die beiden Potentialverläufe des harmonischen und des anharmonischen Oszillators (Morse-Potential) einander gegenübergestellt.

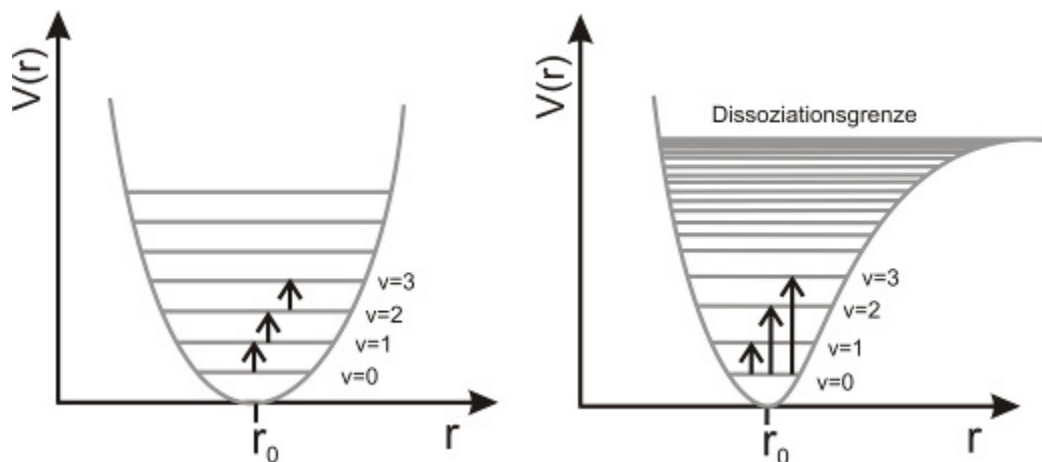


Abbildung 3.1: Schema der Energieniveaus des harmonischen (links) und des anharmonischen Oszillators (rechts).

Im Gegensatz zu den Übergängen bei dem harmonischen Oszillator, bei denen die Auswahlregel $\Delta n = \pm 1$ gilt, sind beim anharmonischen auch Übergänge mit $\Delta n = \pm 2, \pm 3, \dots$ erlaubt.

Auf Grund der Boltzmann-Verteilung ist bei Raumtemperatur grundsätzlich der Schwingungsgrundzustand des Moleküls besetzt. Dies bedeutet, dass die Absorptionsspektren, die bei Raumtemperatur gemessen werden, hauptsächlich Übergänge zwischen dem nullten und dem ersten Schwingungsniveau aufweisen.

Werden die Atome in einem Molekül betrachtet, so können diese in alle 3 Raumrichtungen Bewegungen ausführen. Diese Normalschwingungen sind zum Einen von der Anzahl der Atome und zum Anderen von der Geometrie des Moleküls abhängig.

So besitzt ein lineares Molekül (z. B. CO_2) $3N-5$ Schwingungsfreiheitsgrade, wohingegen ein gewinkeltes Molekül (z. B. H_2O) $3N-6$ Freiheitsgrade besitzt. N ist dabei gleich der Anzahl der Atome. Bei einem linearen, zweiatomigen Molekül beträgt somit die Anzahl der Grundschnwingungen $3N-5 = 1$.

Diese Normalschwingungen können wiederum in Valenzschwingungen und Deformationsschwingungen gegliedert werden. Bei Valenzschwingungen ändert sich die Bindungslänge, dies kann sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch erfolgen. Wohingegen sich bei der Deformationsschwingung der Bindungswinkel zwischen den Atomen ändert. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Schwingungen die gleiche Frequenz und somit die gleiche Energie aufweisen. Diese Schwingungen gelten als entartet und führen zu einer Absorptionsbande im Spektrum. Des Weiteren können out-of-plane Schwingungen bei planaren Molekülen auftreten. Out-of-plane bedeutet, dass sich die Atome aus der Molekülebene heraus bewegen.

3.1.2 FT-IR-SPEKTROSKOPIE

Die infrarote Strahlung liegt in einem Wellenzahlbereich von 13000 cm^{-1} bis 10 cm^{-1} . Weiterhin wird in nahes (13000 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1}), mittleres (4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1}) und fernes (400 cm^{-1} bis 10 cm^{-1}) Infrarot unterteilt.

Bei der FT-IR-Spektroskopie wird die direkte Absorption von der IR-Strahlung gemessen. Durch diese Energieabsorption werden Schwingungen der Atome des Moleküls angeregt. Dabei wird in IR-aktive und -inaktive Schwingungen unterschieden. IR-aktiv sind solche Molekülschwingungen, die entweder ein permanentes Dipolmoment aufweisen, wie zum Beispiel Salzsäure oder Kohlenmonoxid, oder bei denen während des Schwingungsvorgangs eine Änderung des Dipolmoments auftritt. Dies ist beispielsweise bei den Deformationsschwingungen des Kohlenstoffdioxids der Fall. Diese Änderung des Dipolmoments befähigt die Moleküle mit der elektromagnetischen Lichtquelle in Wechselwirkung zu treten. Molekülschwingungen die über kein permanentes Dipolmoment (z. B. homonukleare Moleküle wie Cl_2 oder N_2) verfügen oder bei denen keine

Dipolmomentänderung und damit auch keine Strahlungsabsorptionen auftritt, werden als IR-inaktiv bezeichnet. So ist die symmetrische Valenzschwingung von CO_2 IR-inaktiv, wohingegen die asymmetrische Valenzschwingung des Moleküls IR-aktiv ist.

Für IR-spektroskopische Untersuchungen gibt es verschiedene Messmethoden, wie beispielsweise die Messung der Transmission, die diffuse Reflexionsspektroskopie oder die abgeschwächte Totalreflexionsspektroskopie. Bei der verwendeten Messmethode handelt es sich um die abgeschwächte Totalreflexionsspektroskopie.

Die abgeschwächte Totalreflexion (engl. Attenuated Total Reflectance, ATR) beruht auf der Lichtreflexion zweier optisch verschieden dichter Medien. Vor allem für Proben, die nicht in Transmission analysiert werden können, da sie kaum oder undurchlässig für IR-Strahlung sind, ist die ATR-Technik von Bedeutung.

Fällt ein Strahl durch ein optisch dichtes Medium (hier: Prisma) mit einem hohen Brechungsindex n_1 unter einem größeren Einfallswinkel α als dem Grenzwinkel der Totalreflexion auf die Grenzfläche zu einem optisch dünnerem Medium (hier: Probe) mit einem kleineren Brechungsindex n_2 , so wird die Strahlung in das optisch dichtere Medium zurückreflektiert. Ein Teil der elektromagnetischen Energie dringt, auf Grund der Welleneigenschaften des Lichts, in das optisch dünnere Medium ein und wird dabei etwas versetzt reflektiert, siehe Abbildung 3.2. Von Totalreflexion wird dann gesprochen, wenn der Strahl wieder vollständig in das optisch dichtere Material zurückreflektiert wird. Es handelt sich um eine abgeschwächte Totalreflexion, da ein Teil der elektromagnetischen Strahlung vom optisch dünneren Material absorbiert wird.

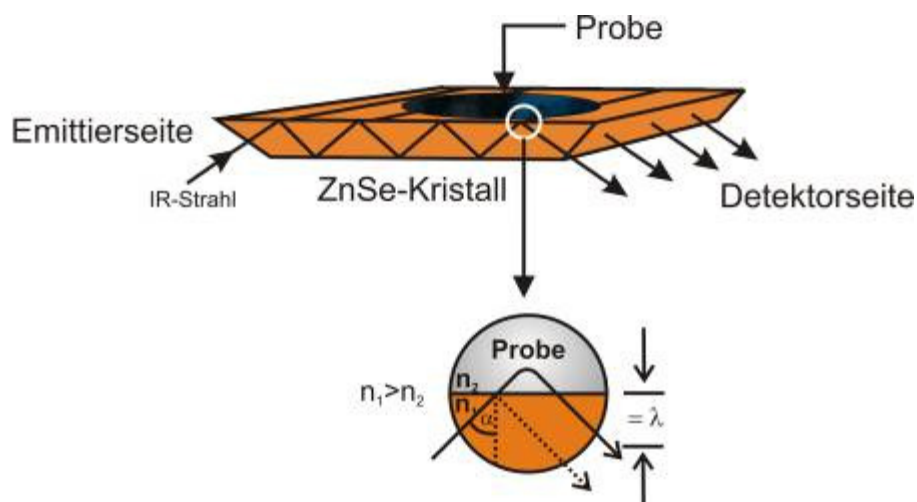


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines ATR-Prismas mit dem dazugehörigen Strahlenverlauf.

Bei einer Wellenlänge beispielsweise eines Schwingungsübergangs kommt es zur Reduktion der reflektierten Strahlungsintensität, da die Probe IR-Strahlung absorbiert.^[146] Die

Eindringtiefe d_p (= Depth of Penetration) dieser evaneszenten Welle wird wie folgt berechnet

$$d_p = \frac{\lambda}{2 \cdot \pi \cdot n_1 \cdot \sqrt{\left(\sin^2 \alpha - \left(\frac{n_1}{n_2} \right)^2 \right)}} \quad (3-10)$$

und gibt den Abstand an, bei dem die Strahlungsintensität auf $1/e$ abgesunken ist. Dabei nimmt die evaneszente Welle exponentiell mit zunehmender Entfernung zur Grenzfläche hin ab. Demzufolge ist die Eindringtiefe abhängig vom Einfallswinkel, vom Brechungsindexverhältnis der beiden Medien und von der Wellenlänge. So ist bei gleichem Einfallswinkel die Eindringtiefe in die Probe gering, wenn das Brechungsindexverhältnis klein ist. Ein weiterer limitierender Faktor für die Eindringtiefe ist der Kontakt zwischen der Probe und dem Kristall. Ein enger Kontakt zwischen der Probe und dem Kristall wird dadurch erzielt, dass die Probe entweder mit Druck auf das Prisma gedrückt wird oder die zu untersuchende Dispersion auf der Kristalloberfläche eingedampft wird. Die zu untersuchende Probe befindet sich auf einem IR-durchlässigen, trapezförmigen Prisma (siehe Abbildung 3.2). Dieses Prisma besteht aus einem speziellen Einkristall, entweder aus Zinkselenid (ZnSe), Germanium oder Diamant. Zinkselenid-Einkristalle sind für Wellenlängen des mittleren Infrarots ausreichend transparent und haben einen großen Brechungsindex.

3.1.3 RAMAN-SPEKTROSKOPIE

Bei der Raman-Spektroskopie wird im Gegensatz zur FT-IR-Spektroskopie nicht die Absorption von Strahlung gemessen, sondern die Streustrahlung des Lichts. Die Existenz dieser Photonenstreuung wurde bereits 1923 von Smekal^[147] postuliert und 1928 von Raman und Krishnan experimentell nachgewiesen.^[148]

Trifft monochromatisches Licht auf eine Probe, so tritt ein Teil der Strahlungen ungehindert durch die Probe, d. h. ohne dass dieser in Wechselwirkung mit den Molekülen tritt. Dies wird als Transmission bezeichnet. Weiterhin wird ein kleiner Teil der Strahlung mit der gleichen Frequenz wie der des eingestrahlenen Lichts in alle Richtungen gestreut. Bei dieser Streuung, die auch Rayleigh-Streuung genannt wird, handelt es sich um einen elastischen Prozess, bei dem die Energie der Photonen unverändert bleibt. Jedoch regt ein noch kleinerer Teil der Photonen beim inelastischen Stoß mit Molekülen diese zu Schwingungen an. Dadurch überträgt sich ein Teil der Energie in Form von Schwingungsenergie auf die Moleküle,

wodurch das Licht eine geringere Frequenz aufweist als das eingestrahle Licht. Diese Streuung wird als Raman-Streuung (Stokes-Streuung) bezeichnet. Bei der Wechselwirkung mit Molekülen, die sich bereits im ersten angeregten Schwingungszustand S_1 befinden, ist die Lichtstreuung mit Abgabe der Schwingungsenergie an das Streulicht verbunden. Somit ist das Streulicht energiereicher und weist eine höhere Frequenz auf als das eingestrahle Licht. In diesem Fall wird von Anti-Stokes-Streuung gesprochen. Da sich nach der Boltzmann-Verteilung bei Raumtemperatur die meisten Moleküle im Grundzustand S_0 befinden, ist die Intensität der Stokes-Streuung stärker als die der Anti-Stokes-Streuung. In Abbildung 3.3 sind die verschiedenen Streuprozesse schematisch wiedergegeben.

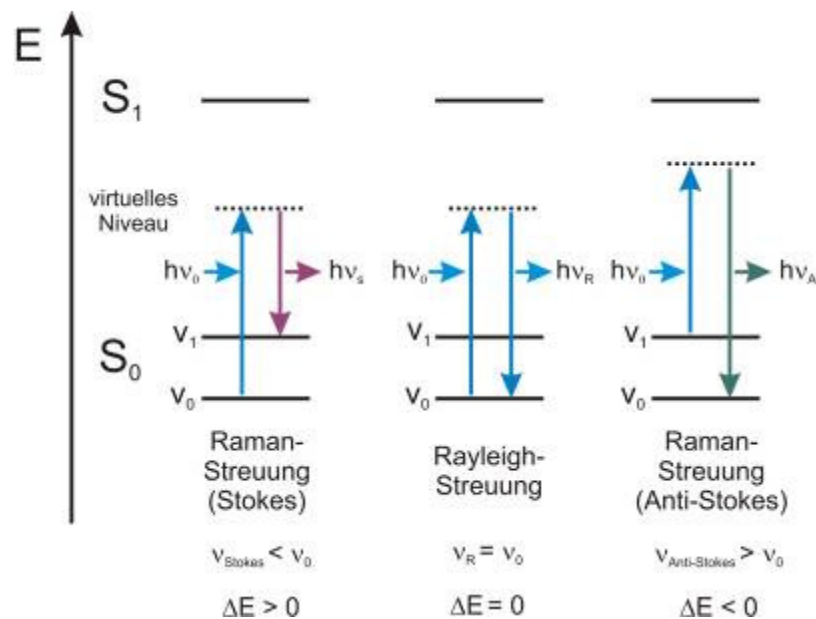


Abbildung 3.3: Gegenüberstellung der Energiezustände der verschiedenen Streuprozesse. S_0 stellt den Grundzustand des Moleküls dar und S_1 den ersten angeregten Schwingungszustand.

Raman-aktiv sind solche Moleküle, bei denen es während der Schwingung zu einer Änderung der Polarisierbarkeit kommt. Dies sind zum Beispiel homonukleare Moleküle wie Wasserstoff, Stickstoff oder Chlor.

Liegt bei dem Molekül ein Inversionszentrum vor, so gilt das Alternativ-Verbot. Dieses Verbot besagt, dass IR-aktive Schwingungen Raman-inaktiv sind und umgekehrt. Ein Beispiel dafür ist Kohlenstoffdioxid. Jedoch ist die symmetrische Valenzschwingung Raman-aktiv, aber IR-inaktiv. Bei der asymmetrischen Valenzschwingung von CO_2 ist dies genau umgekehrt. Die Atome können nicht simultan die Polarisierbarkeit und das Dipolmoment ändern.

Im Allgemeinen gilt jedoch, dass polare Bindungen, die schwer zu polarisieren sind, eine geringere Raman-Intensität aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen unpolare Gruppen ein starkes Raman-Signal.

3.2 FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE

3.2.1 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZ

Allgemein wird unter Fluoreszenz die spontane Emission von Licht verstanden, die nur so lange anhält, wie das Molekül durch die Absorption von Licht angeregt wird.^[149]

Diese Lichtabsorption von Molekülen wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d. \quad (3-11)$$

A bezeichnet die Absorbanz, I_0 die Intensität des eingestrahnten Lichts, I die Intensität des transmittierten Lichts, c die Konzentration der Probe und d die Dicke der Küvette. ε_λ stellt den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten dar, der für jeden Stoff spezifisch und abhängig von der Wellenlänge ist.

Auf Grund der Absorption von elektromagnetischer Strahlung kann ein Molekül vom elektronischen Grundzustand S_0 in elektronisch angeregte Singulett-Zustände S_1 oder S_2 übergehen. Das Elektron absorbiert dabei die Energie $h\nu_A$ des Photons. Dieser Übergang findet innerhalb von 10^{-15} s statt. Abhängig von der eingestrahnten Wellenlänge kann das angeregte Molekül in jedem dieser elektronischen Zustände in einer Anzahl verschiedener Schwingungsniveaus existieren, die mit 0, 1, 2 usw. bezeichnet werden.

Die Relaxation in den elektronischen Grundzustand kann auf verschiedenen Wegen erfolgen und wird schematisch in einem Jablonski-Diagramm in Abbildung 3.4 dargestellt.

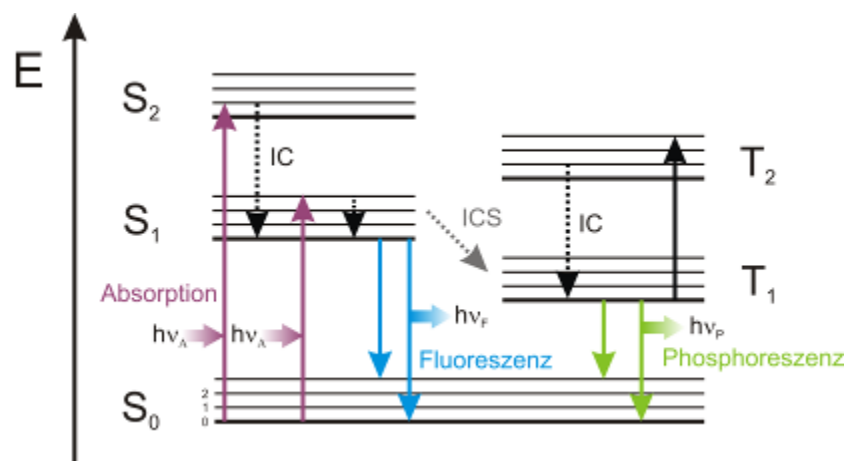


Abbildung 3.4: Eine Darstellungsform des Jablonski-Diagramms. S_0 stellt den elektronischen Grundzustand des Moleküls dar, S_1 und S_2 die elektronisch angeregten Singulett-Zustände.^[150]

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das Elektron im S_2 -Zustand unter Abgabe von Energie, die meist strahlungslos erfolgt, in den ersten angeregten Zustand S_1 relaxiert. Dies erfolgt innerhalb von Pikosekunden und wird als interne Konversion (*Internal Conversion, IC*) bezeichnet. Diese Konversion erfolgt ohne Änderung der Spin-Multiplizität, unter Abgabe der Energie in Form von Wärme. Auf Grund der Tatsache, dass die interne Konversion innerhalb von 10^{-12} s abläuft, ist diese bereits abgeschlossen, bevor die Fluoreszenz (Lebensdauer 10^{-8} s) auftritt.^[150] Dementsprechend wird die Fluoreszenz aus höher angeregten Zuständen fast nie beobachtet und erfolgt nur aus dem energetisch niedrigsten elektronisch angeregten Zustand S_1 (Regel von Kasha).^[150]

Erfolgt jetzt die Relaxation aus dem niedrigsten Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustands S_1 in den Grundzustand unter Emission eines Photons, so wird dieser Vorgang als Fluoreszenz bezeichnet. Dabei ist die Energie der Fluoreszenz $h\nu_F$ geringer als die absorbierte Energie $h\nu_A$. Dies hat zur Folge, dass die Fluoreszenz bei höheren Wellenlängen auftritt als die Absorption. Dieser Energieverlust basiert auf dem zuvor beschriebenen Prozess der internen Konversion und wird als Stokes'sche Regel bezeichnet.

Ein Elektron kann von dem ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 unter Spinumkehr in den niedrigsten angeregten Triplett-Zustand T_1 übergehen. Dabei findet dieser Prozess, der als Interkombination (*InterSystem Crossing, ISC*) bezeichnet wird, strahlungslos statt. Dieser Übergang ist energetisch zwar erlaubt, da der Triplett-Zustand energetisch tiefer liegt als der jeweilige Singulett-Zustand, aber auf Grund der Spin-Auswahlregel $\Delta S = 0$ verboten. Die Verweildauer im Triplett-Zustand liegt im Bereich von Millisekunden bis Sekunden.^[150]

Die Relaxation aus dem Triplett-Zustand wieder zurück in den Grundzustand, die unter Emission eines Photons der Energie $h\nu_P$ abläuft, wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Die Rückkehr in den Grundzustand ist spinverboten und erfolgt somit verlangsamt. Dies erklärt den Unterschied zur Fluoreszenz, bei der die Lichtabgabe innerhalb von Nanosekunden nach der Anregung erfolgt, wohingegen die Emission bei der Phosphoreszenz bis zu einigen Stunden andauern kann.

3.2.2 FLUORESZENZ-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE

Bei der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) handelt es sich um eine Einzelmolekülspektroskopie. Diese Methode wurde in den frühen 70er Jahren entwickelt. Auf Grund von technischen Entwicklungen (z. B. konfokale Mikroskopie) gewann sie erst in den letzten Jahren an Bedeutung. Die Vorteile liegen in der hohen lokalen Auflösung. So können,

trotz kleinster Probenmengen und kurzer Aufnahmezeit von nur wenigen Sekunden, einzelne fluoreszierende Moleküle betrachtet werden.^[151-157]

Die FCS stellt eine der am häufigsten verwendeten Methode in biophysikalischen Untersuchungen dar. Sie bietet die Möglichkeit, Diffusion sowie intra- / intermolekulare Wechselwirkungen diverser fluoreszenzmarkierter Partikel zu untersuchen. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus des Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometers befindet sich in Kapitel 9.1.5.

Die FCS basiert auf der Analyse fluoreszierender Moleküle in Lösungssystemen, die sich im thermodynamischen Gleichgewicht befinden. Durch die Beobachtung von Intensitätsfluktuationen werden kleinste stochastische Abweichungen vom Gleichgewicht detektierbar. Diese Intensitätsschwankungen des Fluoreszenzlichts resultieren auf der einen Seite aus der Bewegung der Teilchen durch Diffusion (Brown'sche Bewegung) in das Detektionsvolumen hinein und wieder hinaus. Auf der anderen Seite können Übergänge in nicht-fluoreszierende Zustände, z. B. Triplett-Zustände oder andere Dunkelzustände auftreten. Im einfachsten Fall von frei diffundierenden Farbstoffmolekülen ohne Dunkelzustände sind die Fluktuationen im Fluoreszenzsignal eine Folge statistischer Fluktuationen der Anzahl von Molekülen, die in das Beobachtungsvolumen eintreten und es wieder verlassen.^[158]

Um quantitative Informationen aus dem stochastischen Intensitätssignal zu erhalten, wird das angeregte Fluoreszenzsignal $F(t)$ einer Korrelationsanalyse unterzogen. Hierzu wird die normierte Autokorrelationsfunktion zu unterschiedlichen Zeiten t und $t + \tau$

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3-12)$$

mit der Intensitätsfluktuation $\pm \delta F(t)$ berechnet. Diese Intensitätsfluktuation $\delta F(t)$ errechnet sich aus dem zeitlichen Mittelwert $\langle F(t) \rangle$ des gemessenen Fluoreszenzsignals $F(t)$, d. h. $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$.

Voraussetzung für die quantitative Beschreibung von Fluktuationen ist eine stark verdünnte Lösung, die sich im thermodynamischen Gleichgewicht befindet. Die Farbstoffmoleküle gehen untereinander keine Wechselwirkung ein. Abbildung 3.5 zeigt verschiedene Autokorrelationsfunktionen in Abhängigkeit von der Konzentration und von dem Partikeldurchmesser.

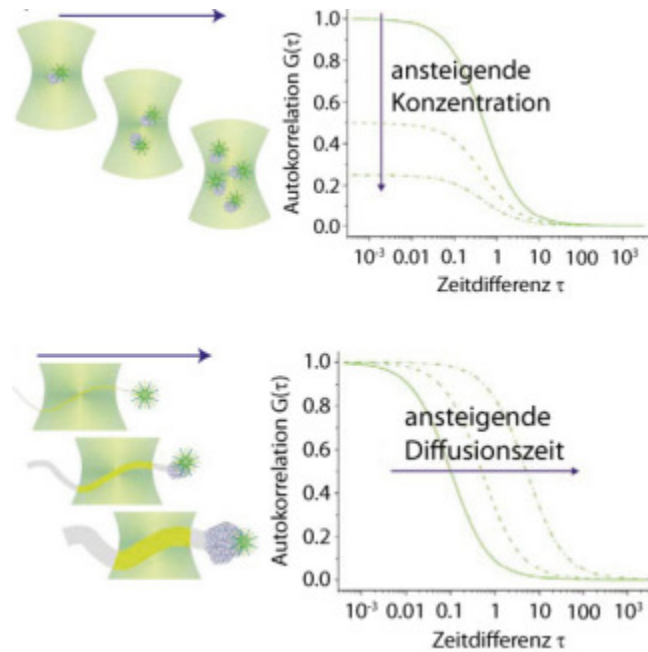


Abbildung 3.5: Verschiedene Autokorrelationsfunktionen a) bei variierender Konzentration; b) bei Zunahme des Partikeldurchmessers. Mit steigender Konzentration sinkt die Amplitude $G(\tau)$ proportional zur Teilchenzahl und bei Vergrößerung des Partikeldurchmessers wird eine längere Aufenthaltsdauer im Detektionsvolumen und somit ein Anstieg der Diffusionszeit bewirkt.^[159]

Ist die Konzentration ausreichend gering, so ist die Signalfuktuation abhängig von einer Konzentrationsfluktuation δC . Gleichzeitig ist die Signalintensität über einen weiten Bereich proportional zur Anregungsintensität. Durch Fokussieren des Lasers auf $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ wird das Fluoreszenzsignal verstärkt und die Konzentrationsfluktuation korreliert mit dem Anregungsprofil. Die Form vom Fokus lässt sich in lateraler Richtung x durch zwei Gauss-Funktionen, in axialer Richtung z durch eine Lorentzfunktion beschreiben.^[160]

Für den Fall konfokaler Detektion und bei genügend kleinen Lochblenden kann die Lorentzfunktion als Gauss-Funktion angenähert werden, um eine analytische Lösung zu erhalten:

$$W(r) = \exp\left(-\frac{2 \cdot (x^2 + y^2)}{\omega_x^2}\right) \cdot \exp\left(-\frac{2 \cdot (z^2)}{\omega_z^2}\right). \quad (3-13)$$

Dabei stellt $W(r)$ das Anregungsprofil und $\omega_{x/z}$ die laterale bzw. axiale Halbwertsbreite dar. Für ein monomolekulares System diffundierender Teilchen gilt unter Verwendung der Gleichung (3-12) und (3-13) folgenden Zusammenhang

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{CV_{eff}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{4D}{\omega_x^2} \tau} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{4D}{\omega_z^2} \tau}}, \quad (3-14)$$

wobei CV_{eff} die Teilchenanzahl (Anzahl Moleküle, die sich gleichzeitig im Detektionsvolumen V_{eff} befinden) und D den Diffusionskoeffizient darstellt.

Gilt $\omega_z \gg \omega_x$, so wird die Autokorrelationsfunktion von der Diffusion in lateraler Richtung dominiert und Gleichung (3-15) reduziert sich zu nachfolgender Formel:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{CV_{eff}} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \quad (3-15)$$

mit der charakteristischen Diffusionszeit τ_D :

$$\tau_D = \frac{\omega^2}{4D} \quad (3-16)$$

Bei bekannter lateraler Ausdehnung des Beobachtungsvolumens kann daraus die Diffusionskonstante des fluoreszierenden Objektes bestimmt werden.^[161-163]

3.2.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS: FLUORESCENCE ACTIVATING CELL SORTER)

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren zur Analyse von fluoreszenzmarkierten Zellsuspensionen. Das Prinzip des Analyseverfahrens beruht dabei auf der gleichzeitigen Messung des Streulichts sowie des Fluoreszenzsignals einzelner Zellen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten). So können zum Einen die Morphologie, d. h. die Größe, die Membranstruktur und die intrazellulären Strukturen der Zellen analysiert werden und zum Anderen werden verschiedenen Zellen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern quantifiziert. Diese Antikörper richten sich gegen einzelne Epitope. Epitop ist der Bereich eines Antigens, an dem der vom Immunsystem gebildete Antikörper anbinden kann. Die Klassifizierung dieser Antikörper erfolgt anhand der von ihnen erkannten Antigene. Hierbei handelt es sich um eine CD-Nomenklatur (CD: Cluster of Differentiation). So ist zum Beispiel CD-45 ein membranständiges Protein, das eine Tyrosinphosphatase Aktivität aufweist. Dieses CD-45, welches mit FITC markiert sein kann, reagiert mit dem spezifischen Antigenrezeptor von T-Zellen. Anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität kann eine Aussage über die Anzahl der vorhandenen markierten Zellen getroffen werden.

Das Messprinzip beruht darauf, dass die zu untersuchende Zellsuspension mit Überdruck in durch eine Kapillare geführt wird. Dadurch passieren die Zellen einzeln den Fokus des Laserstrahls. Die Zellmorphologie wird mit zwei verschiedenen angeordneten Detektoren, dem Vorwärtsstreulicht- (Forward SCatter, FSC) und dem Seitwärtsstreulicht-Detektor (Side SCatter, SSC) charakterisiert (vgl. Abbildung 3.6). Der FSC befindet sich in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls und misst vor allem die Größe der Zelle. Dies bedeutet, dass kleine Zellen, wie Lymphozyten, ein geringes Signal hervorrufen, wohingegen Granulozyten ein großes Streulicht erzeugen. Der SSC-Detektor ist im Unterschied dazu in einem 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl angeordnet. Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch von der Granularität und der Membranbeschaffenheit der Zelle sowie von der Struktur des Zellkerns ab. Folglich weisen Granulozyten auf Grund ihrer rauen Oberfläche und der hohen Anzahl an Vesikel im Inneren eine hohe Seitwärtsstreulichtintensität auf, während T-Zellen nur ein kleines Signal hervorrufen.^[164]



Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Messprinzips eines FACS-Gerätes sowie die Auftragung der Ergebnisse in der Dot-Plot-Darstellung, d. h. jeder Punkt repräsentiert eine Zelle.

Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgt ebenfalls im 90° Winkel. Mit Hilfe von verschiedenen Spiegeln und optischen Interferenzfiltern werden die Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzmarker (z. B. FITC 519 nm, Phycoerythrin 578 nm, Peridinin Chlorophyll Protein Komplex 678 nm) getrennt und durch Photomultiplier detektiert. Die Nomenklatur dieser Detektoren richtet sich nach dem spektralen Abstand zum Anregungslicht, d. h. wird mit einem Argonlaser (488 nm) angeregt, so erkennt der erste Detektor grünes Licht (FL1), der zweite oranges (FL2) und der dritte rotes Licht (FL3).^[165] Durch diesen Aufbau ist es möglich, gleichzeitig alle Farbstoffe einzeln zu detektieren und zu analysieren. In Abbildung 9.6 ist der Aufbau des verwendeten Durchflusszytometers schematisch dargestellt. Die dazugehörigen Daten können in Kapitel 9.1.4 nachgelesen werden.

3.3 ZETAPOTENTIAL

3.3.1 ELEKTROSTATISCHE WECHSELWIRKUNG

Die elektrostatische Wechselwirkung basiert auf der Interaktion von gegensätzlich geladenen Polyelektrolyten. Nach der Adsorption eines Polyelektrolyten an einer Oberfläche, kommt es zur Umkehr des Oberflächenpotentials und damit zur Änderung des elektrischen Potentials an dieser Grenzfläche. Eine solche Oberflächenladung kann mit Hilfe des Zetapotentials bestimmt werden. An einer Grenzfläche sind die elektrischen Ladungen der Ionen asymmetrisch verteilt. Diese Ladungsverhältnisse an der Phasengrenze und die Kompensation der Oberflächenladung in der diffusen Schicht werden durch das Schichtmodell nach Stern, Helmholtz und Gouy-Chapman erläutert (s. Abbildung 3.7).

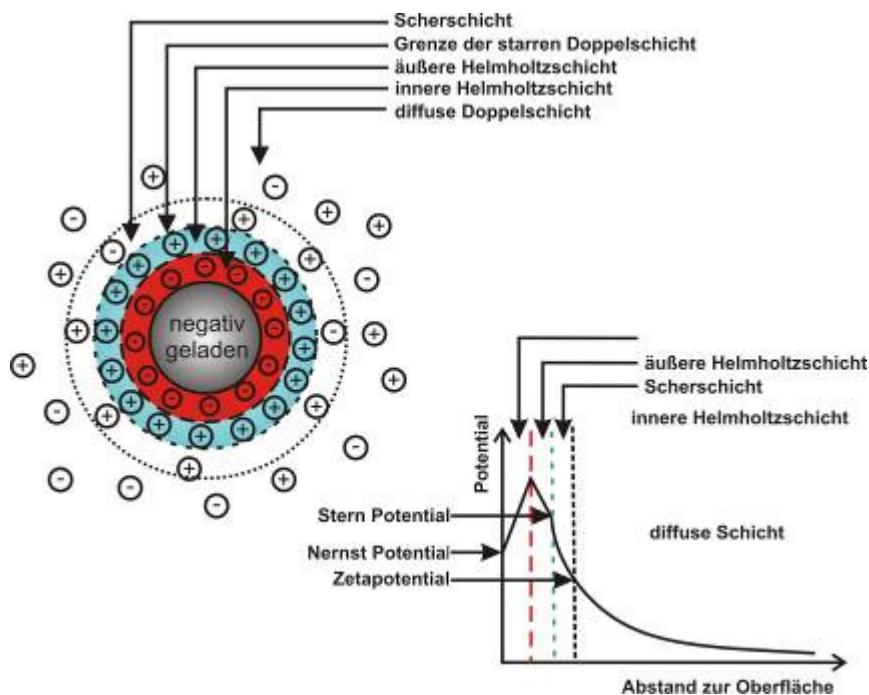


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der elektrischen Doppelschicht nach dem Schichtmodell von Stern, Helmholtz und Gouy-Chapman.

Die meisten Partikel in Dispersionen besitzen eine negative Oberflächenladung, (Nernst-Potential). Bei der Ausbildung der elektrolytischen Doppelschicht lagern sich selbst an diese negativen Oberflächen bevorzugt negativ geladene Ionen aus dem Suspensionsmedium an. Es entsteht eine starre, innere Helmholtzschicht, auf die eine starre, äußere Helmholtzschicht folgt, die wiederum aus starren, hydratisierten positiven Ionen besteht. An dessen äußere Grenze bildet sich das sogenannte Stern-Potential aus. Dieses Potential wird nach Gouy und Chapman durch eine diffuse Schicht aus beweglichen Ionen kompensiert. Der Abfall des Potentials erfolgt exponentiell, bis ein genügend großer

Abstand zur Oberfläche des Teilchens erreicht ist und somit einen konstanten Wert angenommen hat. Bei jeder relativen Bewegung zwischen der festen und flüssigen Phase wird die diffuse Schicht ganz oder teilweise abgeschert. Das Potential an dieser Schergrenze ist das so genannte Zeta- oder elektrokinetische Potenzial (ζ).^[166]

Der Absolutwert des Zetapotentials ist somit ein Maß für die elektrostatische Stabilisierung von Partikeln in Suspension und ist abhängig vom Partikelmaterial, dem Suspensionsmedium und der Ladungsträgerdichte (z. B. pH-Wert oder Ionenstärke). Im Allgemeinen sind Zetapotential-Messungen an der Oberfläche diverser Feststoffe wie beispielsweise Platten, Folien, Membranen und Partikel durchführbar.

3.3.2 MESSUNG VON ZETAPOTENTIALEN

Das Zetapotential stellt einen wichtigen Parameter für die physikalische Stabilität von Dispersionen dar.^[166] Es legt das Abstoßungsverhalten von gleichgeladenen Partikeln in der Suspension fest. Je größer das Zetapotential eines Partikels ist, desto größer sind die elektrostatischen Abstoßungen zwischen den Teilchen und umso stabiler ist das Fluid.

Zur Bestimmung des Zetapotentials können verschiedene Methoden, wie die Elektrophorese, die Elektroosmose, das Sedimentationspotential oder das Strömungspotential herangezogen werden. Die Elektrophorese und das Strömungspotential sollen näher erläutert werden. Für die restlichen Methoden sei auf die angegebene Literatur verwiesen.^[166] Während die Elektrophorese zur Messung des Zetapotentials kleiner Partikel verwendet wird, dient das Strömungspotential in erster Linie zur Vermessung makroskopischer Oberflächen wie Platten, Filme, Fasern oder Membranen.^[166]

Das Strömungspotential entsteht, wenn eine Flüssigkeit nicht durch ein angelegtes elektrisches Feld, sondern durch Druck an einer ruhenden Festkörperoberfläche vorbei strömt, z. B. einer Kapillarwand. Die Doppelschichtladungen an der Kapillarwand werden in Flussrichtung mitgezogen, wodurch ein elektrisches Feld aufgebaut wird. Dieses Feld verläuft in entgegengesetzter Richtung zum Strom der Flüssigkeit. Das im Gleichgewicht eingestellte Potential entlang der Kapillare wird als Strömungspotential bezeichnet. Das Strömungspotential kann durch zwei in einem Strömungskanal positionierte Elektroden abgegriffen und mit Hilfe der folgenden Gleichung bestimmt werden.^[166]

$$\zeta = \frac{\Delta U \cdot L \cdot \eta}{\Delta p \cdot Q \cdot \varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot R} \quad (3-17)$$

ΔU ist das Strömungspotential, Δp ergibt sich aus der Druckdifferenz, L und Q stellen die Länge und den Querschnitt des Strömungskanals dar und R steht für den elektrischen Widerstand.

Als Elektrophorese wird die Wanderung von Partikeln durch ein angelegtes elektrisches Feld beschrieben. Die feste Phase ist dabei stationär und nur die Partikel der zweiten Phase (entweder Flüssigkeit oder Gas) bewegen sich. Auf Grund dieser Bewegung kommt es zur Reibung der Gegenionen an der Doppelschicht, so dass diese teilweise abgeschert werden. Nach außen hin wirkt das Teilchen nicht mehr elektrisch neutral sondern erhält eine Nettooberflächenladung, die als Zetapotential gemessen wird.^[166]

Die elektrophoretische Mobilität μ der Partikel steht somit im direkten Zusammenhang mit dem Zetapotential und kann mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung berechnet werden. Die Gleichung ist wie folgt definiert

$$\zeta = \mu \cdot \frac{4\pi \cdot \eta}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0}, \quad (3-18)$$

wobei ε die Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmediums, ε_0 die Influenzkonstante ($\varepsilon_0 = 8,8542 \cdot 10^{-12} \text{ C} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) und η die Viskosität darstellen.^[166] Die elektrophoretische Mobilität ist von der Partikelgröße, dem Dispersionsmedium sowie von der Ladungsdichte auf der Partikeloberfläche abhängig. Mit Hilfe einer Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) wird die elektrophoretische Mobilität der geladenen Partikel in Suspension nach Gleichung (3-19) bestimmt. Bei der LDA erfährt ein Laserstrahl eine Dopplerfrequenzverschiebung, wenn er auf ein bewegtes Teilchen trifft, wobei diese Frequenzverschiebung in der Größenordnung von wenigen 100 Hz liegt. Gegenüber der Frequenz des Laserlichts von $6 \cdot 10^{14}$ Hz ist diese Frequenzverschiebung durch Filter- oder Interferometrie-Methoden nicht detektierbar. Der prinzipielle Messaufbau des Zetasizers ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

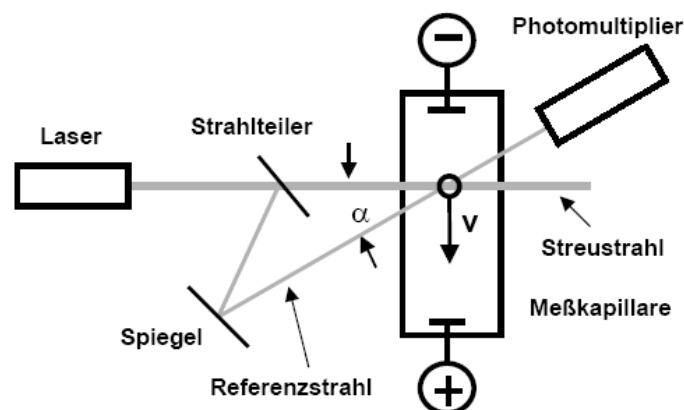


Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau des Zetasizers in heterodyner Messanordnung. Als Anregungsquelle dient ein He-Ne-Laser.^[166]

Durch die Überlagerung von zwei kohärenten heterodynen Laserstrahlen (hier: He-Ne-Laser, Laserwellenlänge $\lambda = 632,8 \text{ nm}$) ist es möglich, die Frequenzverschiebung zu messen. Heterodyn bedeutet, dass ein intensitätsschwacher Referenzstrahl mit einem intensiven Streustrahl gekreuzt wird und der Detektor in Richtung des Referenzstrahls steht. Am Kreuzungspunkt der kohärenten Laserstrahlen entsteht ein Interferenzmuster, durch welches sich die Partikel hindurchbewegen. Anhand der Frequenzverschiebung f_D (Dopplerfrequenz) kann mit Hilfe der nachfolgenden Gleichung die Mobilität der Partikel μ berechnet werden (α ist der Winkel zwischen den zwei Laserstrahlen, s. Abbildung 3.8):

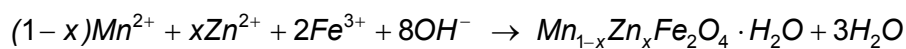
$$f_D = \frac{2 \sin(\alpha / 2)}{\lambda} \cdot \mu. \quad (3-19)$$

4. BIOMEDIZINISCH FUNKTIONALISIERTE NANOPARTIKEL

4.1 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON FERROFLUIDEN

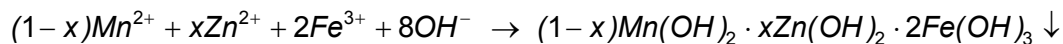
4.1.1 SYNTHESE VON MANGAN-ZINK-FERROFLUIDEN

Die Kopräzitationsmethode ist eine der gängigsten Methoden zur Herstellung von gemischten Ferrofluiden (vgl. Kapitel 2.2.2). Bei den synthetisierten Ferrofluiden handelt es sich um Mangan-Zink-Ferrite (MnZn-MNP) der Zusammensetzung $Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe_2O_4$, deren Bildung sich durch folgende Reaktionsgleichung darstellen lässt:



mit $0 \leq x \leq 1$.

Diese Reaktion unterteilt sich in 2 Schritte. Im ersten Schritt erfolgt die Bildung der Metallhydroxide durch Fällung der Metalle im alkalischen Medium (pH-Wert > 10):



Im zweiten Schritt wird durch Erhitzen des Zwischenproduktes in der Mutterlauge das Endprodukt $Mn_{1-x}Zn_xFe_2O_4$ gewonnen. Um ein stabiles Ferrofluid zu erhalten, ist es notwendig eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Partikeln zu erreichen. Dies wird zum Einen durch die Behandlung der Oberfläche der Partikel mit Salpetersäure und zum Anderen durch die Protonierung der Oberfläche mit Hilfe von Nitrat-Ionen erzielt. Dadurch entsteht eine elektrochemische Doppelschicht.

Das gewonnene Ferrofluid weist einen pH-Wert um 2 auf. Voraussetzung für die Anwendung im biomedizinischen Bereich ist allerdings ein Ferrofluid, welches bei einem pH-Wert um 7 stabil ist. Dazu werden die Nitrat-Ionen durch Citrat-Ionen ausgetauscht. Die Synthesevorschrift eines Ferrofluids kann in Kapitel 9.3 des Anhangs nachgelesen werden.

4.1.2 CHARAKTERISIERUNG DER SYNTHETISIERTEN MNZN-FERROFLUIDEN

Die Bestimmung der Kristallitgröße erfolgt anhand der Auswertung von XRD-Reflexen mit Hilfe der Scherrer-Theorie. In Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2 sind charakteristische Diffraktogramme von MnZn-Ferriten dargestellt. Die blauen Linien repräsentieren die kennzeichnenden Reflexe (Jacobsite zincian, PDF 74-2402) der $Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe_2O_4$ -Verbindung aus der Kristalldatenbank.

Die Bestimmung des volumengemittelten Kristallitdurchmessers erfolgt mittels des Scherrer-Verfahrens durch Heranziehen der signalintensivsten Reflexe. Diese Reflexe werden zuerst mit Hilfe der Basislinienkorrektur angepasst und unter Verwendung einer Lorentz-Anpassung die Halbwertsbreite (FWHM) der Reflexe bestimmt. Durch die Verwendung der nachfolgenden Formel (4-1) kann aus den ermittelten Parametern die Kristallitgröße bestimmt werden

$$L_{vol} = \frac{K \cdot \lambda}{FWHM \cdot \cos(\theta)}, \quad (4-1)$$

dabei ist K als Scherrer-Konstante definiert, die im Rahmen dieser Arbeit als eins angenommen wird, L_{vol} als mittleren Korndurchmesser der Kristallite, λ als Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung und θ als Winkel der Bragg-Brentano-Geometrie. Durch Multiplikation mit $4/3$ wird die Säulenlänge L_{vol} in den Kristallitdurchmesser D_{vol} umgerechnet.

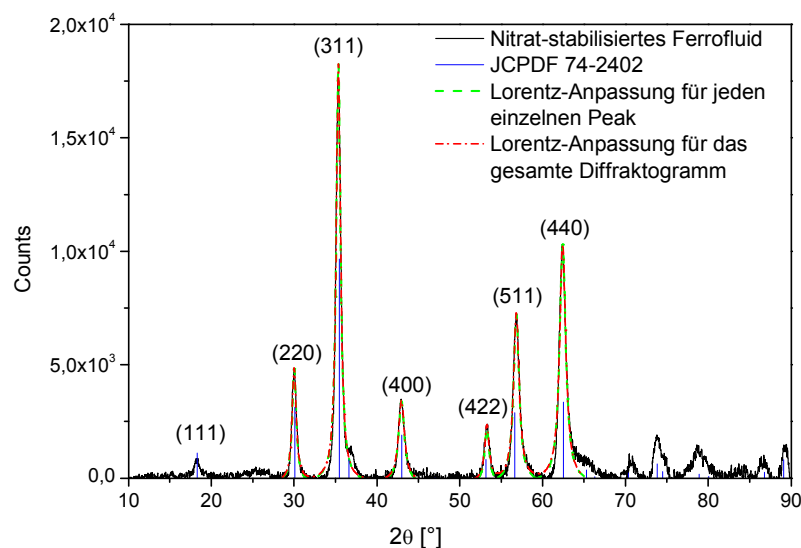


Abbildung 4.1: Basislinienkorrigiertes Diffraktogramm eines Nitrat-stabilisierten MnZn-Ferrits mit den charakteristischen Reflexen (schwarz), der dazugehörigen Lorentz-Anpassung (rot und grün) und den Referenzreflexen (blau) aus der Datenbank.

Anhand der aufgenommenen Diffraktogramme lässt sich erkennen, dass nur die Reflexe des synthetisierten Ferrofluids vorhanden sind und Fremdphasen somit ausgeschlossen werden. Des Weiteren weisen die Partikel eine nahezu vollständige Kristallinität auf, da amorphe Phasen im Diffraktogramm nicht zu erkennen sind.

In Tabelle 4.1 sind die kalkulierten Säulenlängen sowie die daraus erhaltenen Kristallitdurchmesser für die verschiedenen Reflexe zusammengefasst. Der gemittelte Durchmesser des Nitrat-stabilisierten Ferrofluids beläuft sich auf $17,8 \text{ nm} \pm 1,2 \text{ nm}$.

Tabelle 4.1: Tabellarische Zusammenfassung der Scherrer-Kalkulation für die signalintensivsten Reflexe eines Nitrat-stabilisierten Ferrofluids.

<i>hkl</i>	220	311	400	422	511	440
2θ [°]	30,013	35,351	42,963	53,276	56,833	62,429
<i>FWHM</i> [°]	0,595	0,628	0,866	0,657	0,815	0,884
L_{vol} [nm]	15,4	14,8	11,0	15,0	12,3	11,7
D_{vol} [nm]	20,5	19,7	14,7	20,0	16,4	15,6
$\emptyset D_{vol}$ [nm]	$17,8 \pm 1,2$					

Abbildung 4.2 zeigt das Diffraktogramm eines Citrat-stabilisierten MnZn-Ferrofluids. Wie zu erwarten, zeigen beide Diffraktogramme identische Reflexe und reproduzierbare Kristallitdurchmesser.

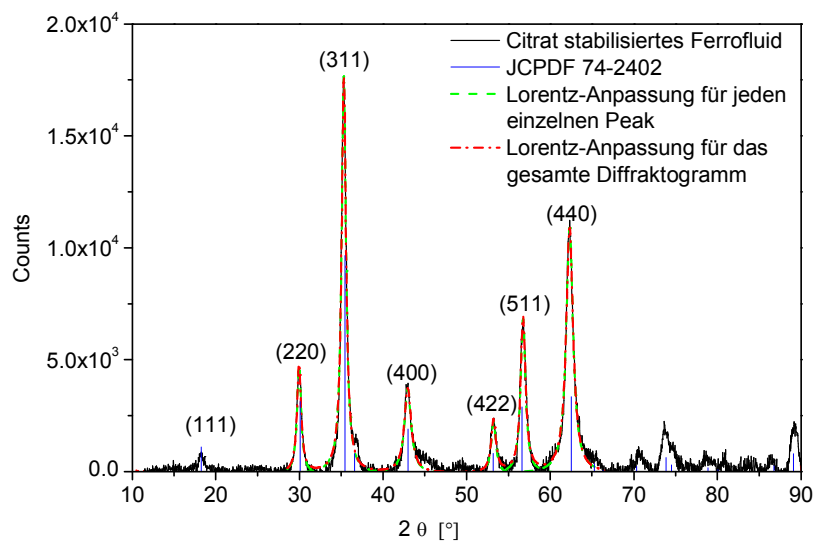


Abbildung 4.2: Repräsentatives Diffraktogramm (mit Korrektur der Basislinie) eines Citrat-stabilisierten MnZn-Ferrits mit den charakteristischen Reflexen (schwarz), den dazugehörigen Lorentz-Anpassungen (rot und grün) und den Referenzreflexen (blau) aus der Datenbank.

Eine Zusammenfassung der berechneten Werte der Säulenlänge und des Kristallitdurchmessers ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Kristallitgröße eines Citrat-stabilisierten Ferrofluids beträgt $17,6 \text{ nm} \pm 1,2 \text{ nm}$.

Tabelle 4.2: Tabellarische Zusammenfassung der Scherrer-Kalkulation für Citrat-stabilisierten Ferrofluide.

<i>hkl</i>	220	311	400	422	511	440
2θ [°]	29,962	35,310	42,967	53,224	56,754	62,326
<i>FWHM</i> [°]	0,589	0,636	0,989	0,672	0,710	0,987
L_{vol} [nm]	15,5	14,6	9,6	14,7	14,1	10,5
D_{vol} [nm]	20,7	19,5	12,8	19,6	18,8	14,0
$\emptyset D_{vol}$ [nm]	$17,6 \pm 1,2$					

Als bildgebendes Verfahren hat sich die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zur Bestimmung der Kristallitgröße der Partikel ebenfalls bewährt. Durch die angefertigten TEM-Aufnahmen lässt sich nicht nur eine Aussage über die Kristallitgröße, sondern auch über die Form und die Agglomeratenbildung der Partikel machen. Anhand der aufgenommenen TEM-Aufnahmen können durch Auszählen direkte Rückschlüsse auf die Größenverteilung der Partikel gezogen werden. Dazu wird die Größe von ca. 400 Partikeln bestimmt und aus den diskreten Datensätzen wird mit Hilfe der Log-Normal-Verteilung die Kristallitgröße bestimmt. In Abbildung 4.3 sind beispielhaft die Auszählungen verschieden stabilisierter Partikel, der gleichen Kopräzipitations-Charge, in Histogrammen dargestellt.

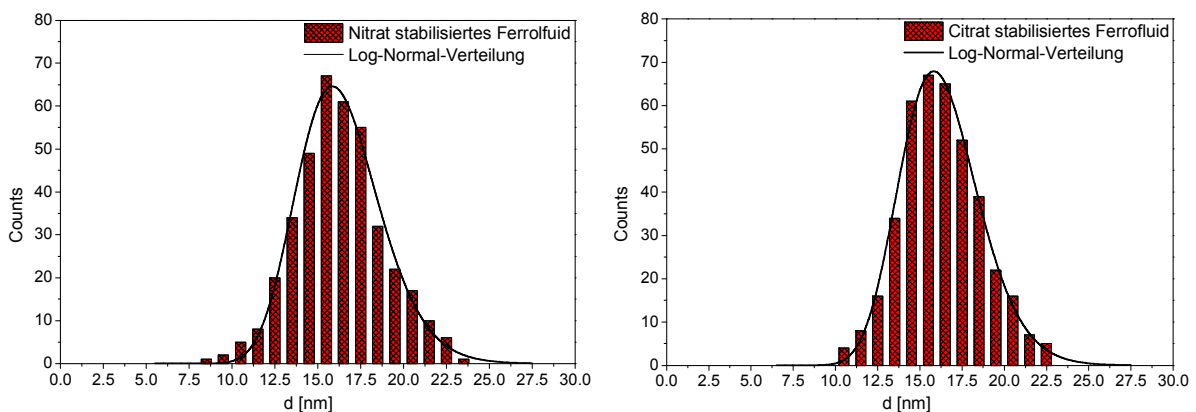


Abbildung 4.3: Charakteristische Histogramme basierend auf TEM-Analyse eines Nitrat-stabilisierten (links) und eines Citrat-stabilisierten Ferrofluids (rechts), mit der jeweiligen Log-Normal-Anpassung.

Die Citrat-stabilisierten und die Nitrat-stabilisierten MnZn-MNP weisen eine Kristallitgröße von 16 nm auf.

Anhand der TEM-Aufnahmen ergibt sich für die volumengemittelte Kristallitgröße von Nitrat- sowie Citrat-stabilisierten MnZn-MNP jeweils $16,2 \text{ nm} \pm 1,2 \text{ nm}$. Dieses Ergebnis ist in sehr guter Übereinstimmung mit den Kristallitgrößen, die mittels des Scherrer-Verfahrens anhand der XRD-Daten ermittelt wurden. In Abbildung 4.4 sind TEM-Aufnahmen von Nitrat-stabilisierten Nanopartikeln dargestellt.

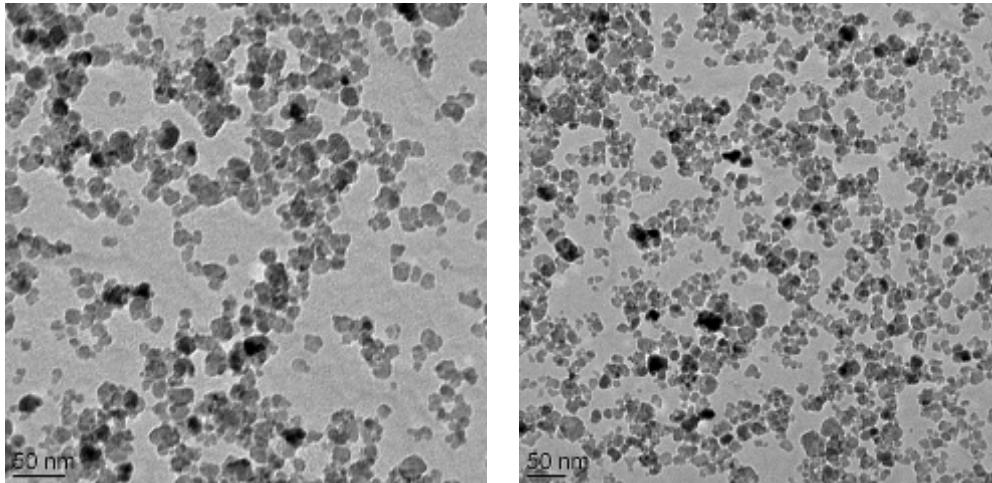


Abbildung 4.4: TEM-Aufnahmen eines Nitrat-stabilisierten MnZn-Ferrits mit einer guter Polydispersität und geringen Aggregationsgrad.

Zum Vergleich sind in Abbildung 4.5 TEM-Aufnahmen Citrat-stabilsierter MnZn-MNP dargestellt. Beide Ferrofluide weisen eine gute Größenverteilung auf. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Partikel nicht zur Agglomeratbildung neigen, eine wichtige Voraussetzung für die spätere Anwendung im biomedizinischen Sektor.

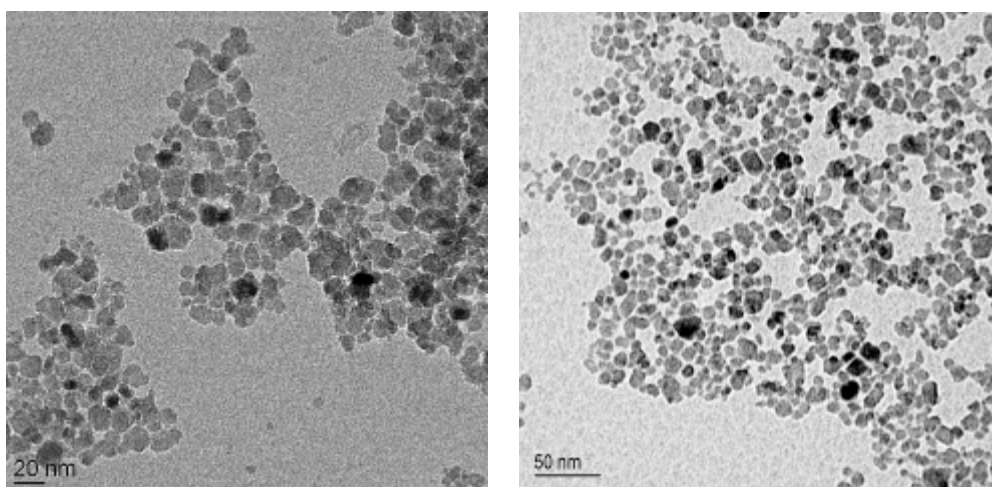


Abbildung 4.5: TEM-Aufnahmen von Citrat-stabilisierten MnZn-MNP. Die Partikel zeigen gute Monodispersität und keine Agglomeratenbildung.

In Abbildung 4.6 ist eine TEM-Aufnahme eines Citrat-stabilisierten Ferrofluids dargestellt, auf der verschiedene Netzebenen der Kristalle zu erkennen sind. Der Netzebenenabstand beträgt 0,24 nm bzw. 0,49 nm. Unter Verwendung der Gleichung (4-2)

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin(\theta), \quad (4-2)$$

kann aus den gemessenen Netzebenenabstände d die entsprechenden 2θ -Werte berechnet werden. Dabei ist λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung (1,5406 Å) und n die Beugungsordnung, die als 1 angenommen wird.

Der Netzebenenabstand wird durch arithmetische Mittlung aus 10 Messungen bestimmt. Aus dem Abstand 0,24 nm errechnet sich ein 2θ -Wert von $37,44^\circ \pm 0,09^\circ$ und somit die (222)-Ebene. Der Netzebenenabstand 0,49 nm kann mit einem 2θ -Wert von $18,09^\circ \pm 0,01^\circ$ der (111)-Ebene zugeordnet werden. In der Kristalldatenbank des entsprechenden MnZn-Ferrits ist dem Reflex (111) der 2θ -Wert von $18,03^\circ$ und dem Reflex (222) der Wert $36,53^\circ$ zugeordnet (siehe Abbildung 4.6).

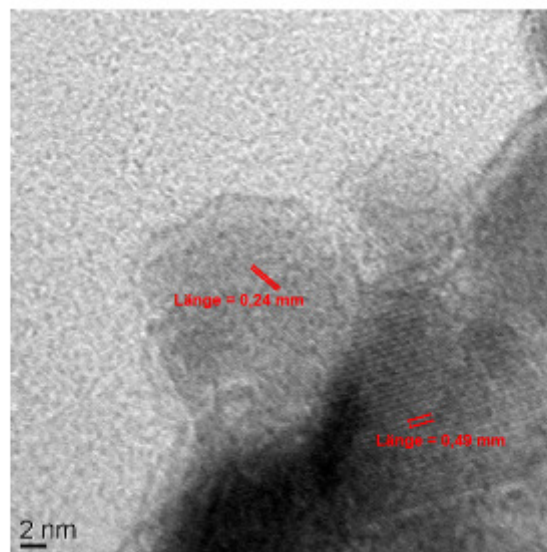


Abbildung 4.6: TEM-Aufnahme des Kristallgitters von $\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ Partikeln zeigt die (222)- und (111)-Netzebenen. Der Netzebenenabstand von 0,24 nm ist der (222)-Ebene zugeordnet und von 0,49 nm Abstand der (111)-Ebene.

Durch Messung des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel mit Hilfe von DLS (Dynamische Lichtstreuung) kann eine Aussage über die Größenverteilung der Partikel getroffen werden. Dazu müssen die Proben, um eine Mehrfachstreuung zu verhindern, um den Faktor 1:100 mit dem jeweiligen Suspensionsmedium (in diesem Fall mit Wasser) verdünnt werden. Die Messsoftware ist in der Lage durch Nutzung des Contin-Algorithmus

diskrete Verteilungsfunktionen des hydrodynamischen Durchmessers aus den Korrelationskurven zu berechnen. Die anschließende Bestimmung der Größenverteilung der Nanopartikel erfolgt mittels einer Log-Normal-Verteilung, die durch nachstehende Formel (4-3) wiedergegeben ist:

$$G(D) = \frac{1}{\sqrt{2 \cdot \pi} \cdot D \cdot \ln(\sigma)} \cdot \exp\left(-\frac{(\ln(D) - \ln(D_0))^2}{2(\ln(\sigma))^2}\right). \quad (4-3)$$

$G(D)$ stellt die Verteilungsfunktion dar, D den Durchmesser, D_0 Median des Durchmessers und $\ln(\sigma)$ die geometrische Standardabweichung. Die geometrische Standardabweichung steht mit der Polydispersität des Systems in Zusammenhang. Für den rechtsseitigen Grenzwert von σ gegen eins, respektive $\log(\sigma)$ gegen Null, wird aus der Log-Normal-Verteilung eine Deltafunktion und es liegen monodisperse Teilchen vor.

Anhand der Größenverteilung (Polydispersität) der Teilchendurchmesser ist es möglich, eine Aussage über den Agglomerationsgrad zu treffen. Liegt der σ -Wert zwischen 1 und 2, so handelt es sich um ein gut dispergiertes System mit geringem Agglomerationsgrad.

In Abbildung 4.7 sind ausgewählte Ergebnisse der DLS von verschiedenen stabilisierter Ferrofluiden dargestellt. Beide Ferrofluide stammen aus derselben Herstellungs-Charge. Die Messung eines Nitrat-stabilisierten Ferrofluids liefert einen hydrodynamischen Durchmesser von $37,9 \text{ nm} \pm 0,2 \text{ nm}$ und der Wert für die Polydispersität σ liegt bei 1,32. Hingegen ist der Durchmesser eines mit Citrat stabilisierten Ferrofluids größer und liegt bei $42,6 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$ mit einer Polydispersität von 1,37.

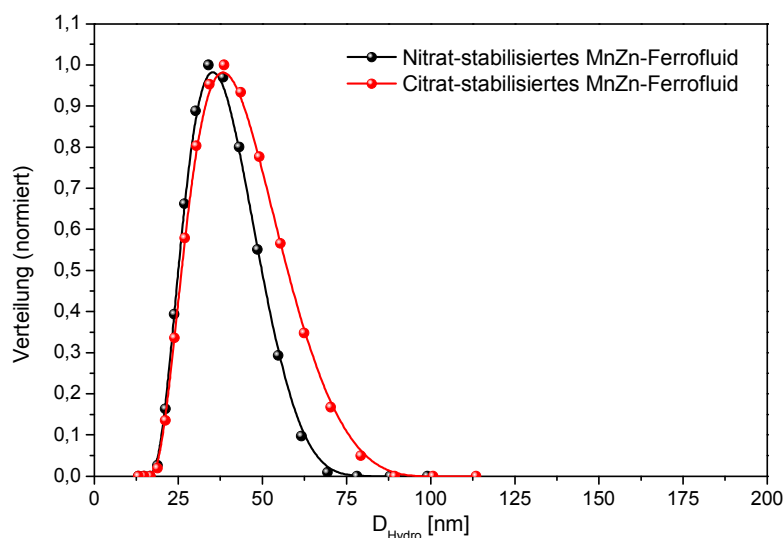


Abbildung 4.7: Vergleich des über DLS ermittelten hydrodynamischen Durchmessers zwischen Nitrat-stabilisiertem und Citrat-stabilisiertem MnZn-Ferrofluid. Der Durchmesser von Citrat-stabilisierten Ferrofluiden ist dabei größer.

Die Ursache für die Abweichung der hydrodynamischen Durchmesser von unterschiedlich stabilisierten Ferrofluiden liegt in der Art des verwendeten Stabilisierungsmediums begründet. Wird die Oberflächenladung des jeweiligen Ferrofluids betrachtet, so weist ein Nitrat-stabilisiertes Ferrofluid ein positives Zetapotential von $+43,0 \text{ mV} \pm 2,1 \text{ mV}$ auf, wohingegen ein Citrat-stabilisiertes Ferrofluid ein negatives Potential von $-49,5 \text{ mV} \pm 0,6 \text{ mV}$ hat. Des Weiteren hat die Wechselwirkung zwischen Ionen und Suspensionsmedium einen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel. Die Wechselwirkung der Citrat-stabilisierten Ferrofluide ist im Vergleich zu den Nitrat-stabilisierten Ferrofluide größer und somit auch der daraus resultierende hydrodynamische Durchmesser. Die Breite der Verteilung ist ein Maß für die Polydispersität der Partikel, d. h. je breiter diese ist, desto polydisperser ist die Partikelgröße und umso stärker neigen sie zur Agglomeratenbildung. Beide Ferrofluide weisen eine schmale Kurvenbreite auf. Es handelt sich somit um gut stabilisierte Systeme mit geringem Agglomerationsgrad.

Zur Elementaranalyse der hergestellten MnZn-Ferrofluide wird die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX: Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) herangezogen. Ein erhaltenes Spektrum besteht aus den elementspezifischen Signalen, deren Signalintensität gegen die Röntgenquantenenergie aufgetragen ist.

Die EDX-Analyse eines synthetisierten MnZn-Ferrofluids ist in Abbildung 4.8 wiedergegeben. Es sind die signifikanten Signale von Eisen, Mangan und Zink zu erkennen.

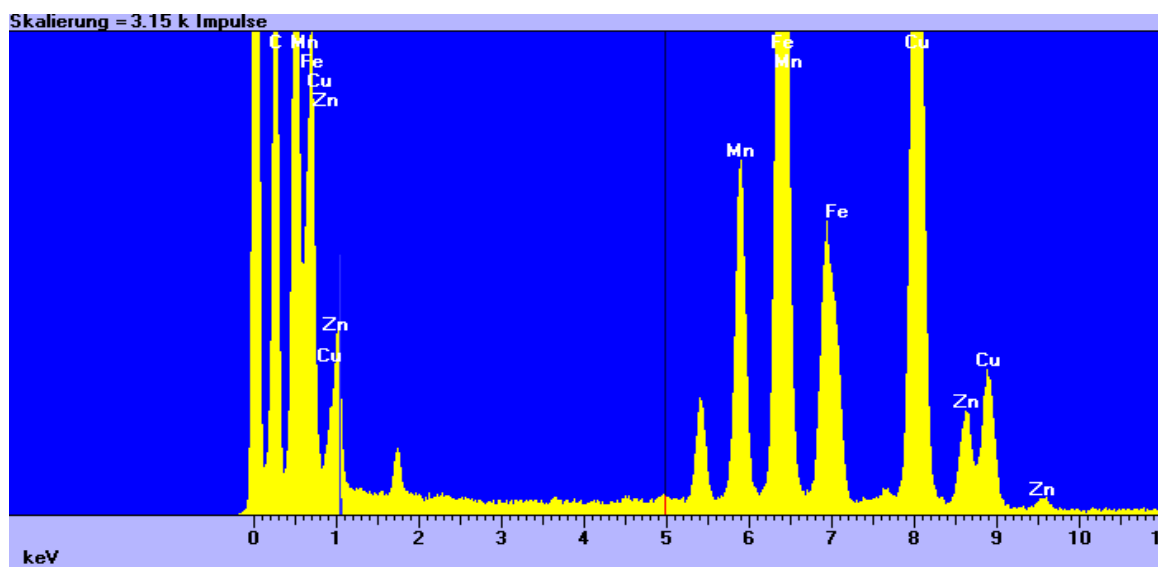


Abbildung 4.8: EDX-Analyse eines Citrat-stabilisierten Ferrofluids, mit den charakteristischen Signalen der Elemente Eisen, Mangan und Zink.

Zur Bestimmung der Sättigungsmagnetisierung der Ferrofluide werden Magnetisierungskurven als Funktion des angelegten Feldes mittels eines Vibrating-Sample-Magnetometers gemessen. Dazu werden ca. 150 μL des Ferrofluids

(10 Gew.-%) in ein Probengefäß pipettiert und in der Mitte eines Elektromagnetens fixiert. Die Bestimmung des Magnetisierungsverhaltens erfolgt bei Raumtemperatur und einer magnetischen Flussdichte von -1 T bis 1 T. Die Sättigungsmagnetisierung ist im Wesentlichen von der Größe, der Dotierung des Ferrofluids und von dessen Gewichtsgehalt abhängig, jedoch nicht von der Art des verwendeten Stabilisierungsmaterials. Die anschließend erhaltenen Magnetisierungskurven lassen sich mit Hilfe der Langevin-Funktion anpassen. Aus den angepassten Daten wird die Magnetisierung eines Eindomänenteilchens erhalten. Die Magnetisierungskurven zweier ausgewählter Ferrofluide sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Die spezifische Magnetisierung M_S eines Citrat-stabilisierten MnZn-Ferrofluids liegt bei $5,52 \text{ kAm}^{-1}$ und die eines Nitrat-stabilisierten bei $5,36 \text{ kAm}^{-1}$. Im Mittel liegt die Magnetisierung der MnZn-Ferrofluide bei $5,44 \text{ kAm}^{-1}$

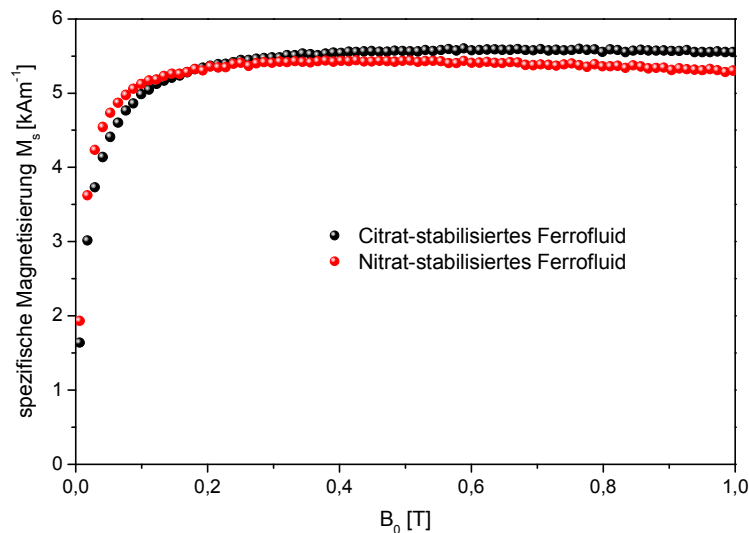


Abbildung 4.9: Typische Magnetisierungskurven von Nitrat- und Citrat-stabilisierten $\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ bei Raumtemperatur. Die Sättigungsmagnetisierung liegt bei $5,52 \text{ kAm}^{-1}$ für ein Citrat-stabilisiertes Ferrofluid und für ein Nitrat-stabilisiertes bei $5,36 \text{ kAm}^{-1}$.

Zur Überprüfung der Oberflächenstabilisierung werden FT-IR-Spektren der Citrat-stabilisierten Ferrofluide herangezogen. Ein repräsentatives FT-IR-Spektrum ist in Abbildung 4.10 dargestellt und weist die typischen Schwingungen von Citrat auf.

Der breite Peak bei einer Wellenzahl von 3500 cm^{-1} bis 3250 cm^{-1} ist zum Einem der Valenzschwingung der OH-Gruppe des Alkohols zuzuordnen, zum Anderen den zwei Valenzschwingungen des Wassermoleküls. Das signifikante Signal bei 1625 cm^{-1} ist hauptsächlich C=O Valenzschwingung der deprotonierten Carboxyl-Gruppen zuzuordnen. In diesen Wellenzahlenbereich fällt auch die Deformationsschwingung von Wasser, welches an der Partikeloberfläche adsorbiert ist. Im Falle des ungebundenen Citrats würde bei einer Wellenzahl von 1800 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} ein starkes Signal auftreten, welches der asymmetrischen Valenzschwingung der C=O Bindungen zuzuweisen wäre. Auf Grundlage

der erhaltenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass Citrat auf die Oberfläche der Partikel adsorbiert wird.

Die symmetrische Valenzschwingung der deprotonierten und protonierten Carboxyl-Gruppe liegt bei 1425 cm^{-1} . Diese Schwingung überlagert sich mit der C-OH Deformationsschwingung der Alkohol-Gruppe sowie mit der Scherschwingung der CH_2 -Gruppe. Bei 1065 cm^{-1} liegen die symmetrische COO^- Valenzschwingung sowie die symmetrische Valenzschwingung der C-O Bindung.

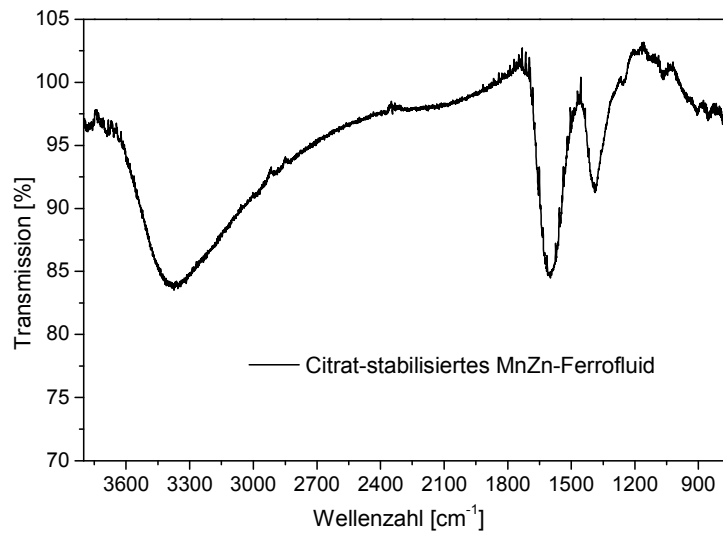


Abbildung 4.10: FT-IR-Spektrum eines Citrat-stabilisierten MnZn-Ferrofluids mit den charakteristischen Absorptionsbanden des Citrats. Die Adsorption von Citrat auf der Partikeloberfläche kann auf diese Weise nachgewiesen werden.

Abbildung 4.11 zeigt das Verhalten eines synthetisierten Ferrofluids in Gegenwart eines äußeren permanenten Magnetfeldes. Bei dem verwendeten Dispersionsmedium handelt es sich um Wasser. Die Konzentration der Nanopartikel beläuft sich auf $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

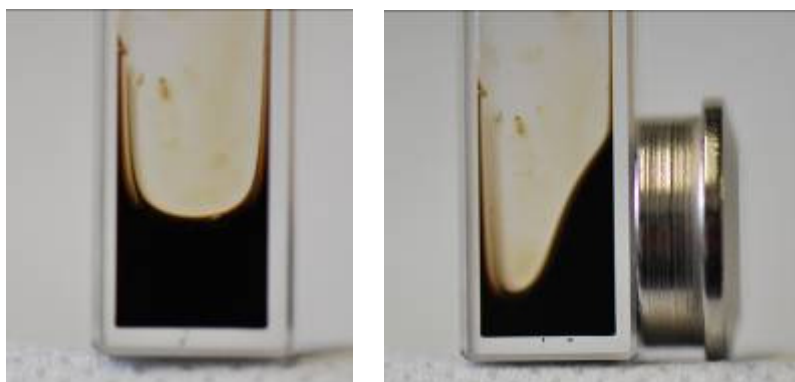


Abbildung 4.11: Darstellungen eines Citrat-stabilisierten MnZn-Ferrofluids ohne äußeres Magnetfeld (links) und mit permanentem Magnetfeld (rechts).

4.1.3 KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die vorgestellten Ergebnisse zur Synthese und Charakterisierung von MnZn-Ferrofluiden zeigen, dass zur Herstellung von Ferrofluiden und im speziellen Fall von MnZn-Ferrofluiden die Kopräzipitationsmethode sehr gut geeignet ist und es sich um einen reproduzierbaren Syntheseprozess handelt. Zur Stabilisierung der Ferrofluide erfolgt zuerst eine Protonierung der Oberfläche mittels Nitrat-Ionen und anschließend eine Oberflächenstabilisierung der MnZn-Ferrofluide mit Citrat-Ionen. So kann gewährleistet werden, dass synthetisierte Ferrofluide im Suspensionsmedium Wasser stabil sind und einen pH-Wert von ~ 7 aufweisen. Zur Charakterisierung der Ferrofluide dienen diverse Analysemethoden wie unter anderem XRD, TEM + EDX, DLS, Bestimmung der Sättigungsmagnetisierung, FT-IR-Spektroskopie sowie Zetapotential-Messungen.

Die Partikelmorphologie wird unter Verwendung von XRD- und DLS-Messungen sowie der TEM-Aufnahmen analysiert. Hieraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass alle synthetisierten Nanopartikel eine gute Monodispersität aufweisen und nanokristallin vorliegen. Des Weiteren werden Fremdphasen mittels XRD und EDX ausgeschlossen. Die Kristallitgröße sowohl für Nitrat-stabilisierte als auch Citrat-stabilisierte MnZn-Ferrofluide liegt in der Größenordnung von 17 nm.

Allerdings ist der hydrodynamische Durchmesser eines Citrat-stabilisierten Ferrofluids mit 43 nm größer und als der Durchmesser eines Nitrat-stabilisierten, der bei 38 nm liegt. Die Ursache hierfür liegt in der Wechselwirkung der jeweiligen Ionen mit dem Suspensionsmedium Wasser. Die vorhandenen Carboxyl-Gruppen des Citrats wechselwirken stärker mit Wasser als Nitrat-Ionen, wodurch die Solvathülle eines Citrat-stabilisierten Ferrofluids größer wird und damit auch der hydrodynamische Durchmesser. Die Polydispersität liegt bei beiden Ferrofluiden in einem Bereich, der repräsentativ für eine enge Größenverteilung und ein gut dispergiertes System ist. Der geringe Agglomerationsgrad sowie die gute Monodispersität werden auch anhand der angefertigten TEM-Aufnahmen bestätigt.

Die Sättigungsmagnetisierung eines Citrat-stabilisierten MnZn-Ferrofluids liegt mit $5,52 \text{ kAm}^{-1}$ zwar unterhalb der von Magnetit ($M_s = 11,23 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$), allerdings weist Ersteres bessere Relaxationseigenschaften auf. Diese Eigenschaften spielen vor allem bei Aufheizprozessen zur kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung eine entscheidende Rolle.

Die Citrat-Adsorption auf der Nanopartikeloberfläche werden mittels FT-IR-Spektroskopie nachgewiesen. Alle synthetisierten Citrat-stabilisierten Ferrofluide zeigen die signifikanten Absorptionsbanden der deprotonierten Carboxyl-Gruppen des Citrats. Das Fehlen der C=O Valenzschwingung der nicht deprotonierten Carboxyl-Gruppe im Wellenzahlbereich von 1800 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} ist ein weiteres Indiz für die Adsorption des Citrats auf der Partikeloberfläche.

4.2 DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN MODIFIZIERUNGSWEGE VON DEXTRAN

4.2.1 CHARAKTERISIERUNG VON DEXTRAN

Die Biokompatibilität der Partikel wird durch deren Beschichtung mit dem Polysaccharid Dextran realisiert. Bevor die Nanopartikel mit Dextran modifiziert werden können, muss dieses preliminär aktiviert werden. Ansonsten ist eine kovalente Anbindung des Wirkstoffs an Dextran nicht möglich. Die Struktur des Dextrans ist in Abbildung 2.2 und die des Wirkstoffs Doxorubicin in Abbildung 2.8 dargestellt. In Abhängigkeit der funktionellen Gruppen des Doxorubicins, die zur Bindungsbildung in Betracht gezogen werden, erfolgt die abgestimmte Funktionalisierung des Dextrans danach. Die Doxorubicin funktionellen Gruppen, die hierfür in Frage kommen, sind die primäre Amino-Gruppe und die freie Keto-Gruppe. Die Charakterisierung der synthetisierten Dextran-Derivate erfolgt mittels FT-IR- und Raman-Spektroskopie. In Abbildung 4.12 ist ein FT-IR-Spektrum von Dextran einem Raman-Spektrum gegenübergestellt. Im Allgemeinen gilt, dass die Raman-Bande im Vergleich zu der IR-Bande immer um 10 cm^{-1} bis 20 cm^{-1} zu tieferer Wellenzahl hin verschoben sind.

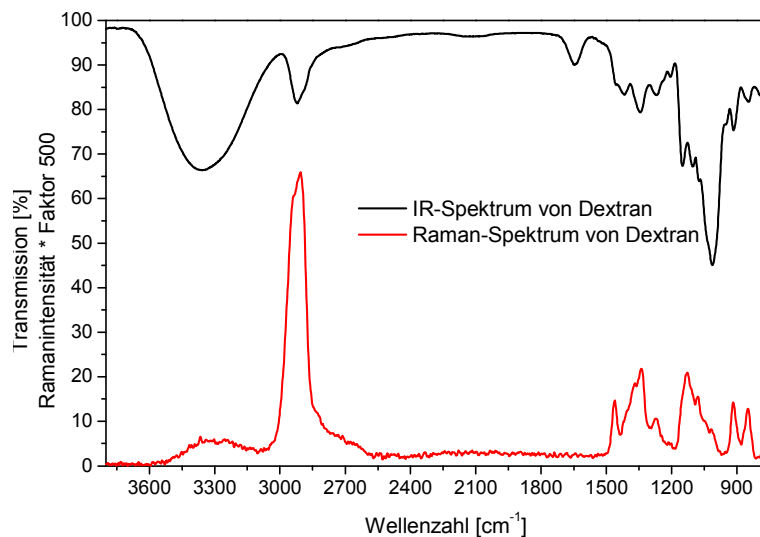


Abbildung 4.12: Gegenüberstellung eines FT-IR- und eines Raman-Spektrums von Dextran für den direkten Vergleich der Schwingungen. So ist zu erkennen, dass die C-H Valenzschwingung bei 2800 cm^{-1} eine höhere Ramanintensität aufweist im Vergleich zur IR-Analyse.

Für eine eindeutige Charakterisierung von Stoffen ist eine Kombination aus FT-IR- und Raman-Spektroskopie unabdingbar. Bei der Vermessung makromolekularen Stoffen wie bei Polymeren muss beachtet werden, dass die Intensität der Banden von der Konzentration des

Polymers abhängt. Das bedeutet, je mehr von einer funktionellen Gruppe im Polymer vorhanden ist, desto stärker ist die dazugehörige Absorptionsbande ausgeprägt. Nachfolgend werden die zu beobachtenden Schwingungen des Dextrans eingehend charakterisiert, da diese Schwingungen in den Spektren der Derivate immer wieder auftauchen werden. Zusammenfassend findet sich Tabelle 4.3 eine ausführliche Indizierung aller auftretenden Schwingungen des Dextrans.

Bei der Wellenzahl 3300 cm^{-1} liegt die O-H Valenzschwingung der Alkohol-Gruppe. Diese Schwingung basiert auf der intermolekularen Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Wie aus Abbildung 4.12 hervorgeht, ist diese Valenzschwingung im FT-IR-Spektrum signalintensiver als im Raman-Spektrum. Im Allgemeinen wird die Signalintensität in der Reihenfolge primäre < sekundäre < tertiäre Alkohole verstärkt. Die Intensität der Bande nimmt mit der absoluten Anzahl an Alkohol-Gruppen zu, wodurch die beobachtete Bandenverbreiterung zu erklären ist.^[145] Die asymmetrische C-H Valenzschwingung der CH- bzw. der CH₂-Gruppen ist bei der Wellenzahl 2920 cm^{-1} im FT-IR-Spektrum und bei 2910 cm^{-1} im Raman-Spektrum zu beobachten. Die Signalbande bei 1650 cm^{-1} , die nur im FT-IR-Spektrum zu erkennen ist, basiert auf den Valenzschwingungen des Wassers, welches als Dispersionsmedium fungiert. Ab 1500 cm^{-1} beginnt der Fingerprint-Bereich. Dies ist jener Bereich, in dem alle Deformations- sowie einzelne Valenzschwingungen der verschiedenen funktionellen Gruppen des Dextrans auftreten und teilweise überlagern.

Der Fingerprint-Bereich ist für jede Verbindung charakteristisch. Die Überlagerung der Signale im Wellenzahlbereich von 1460 cm^{-1} bis 1260 cm^{-1} resultiert unter Anderem aus der Deformationsschwingung der sekundären Alkohol-Gruppen, die in einem Wellenzahlenbereich von 1410 cm^{-1} bis 1310 cm^{-1} auftritt. In diesem Bereich (1480 cm^{-1} bis 1440 cm^{-1}) liegt zusätzlich die Scherschwingung der CH₂-Gruppe. Weiterhin wird die asymmetrische Deformationsschwingung der CH₂-Gruppe in diesem Bereich ebenfalls beobachtet. Die Deformationsschwingung der CH-Gruppe weist Signalbanden zwischen 1360 cm^{-1} und 1320 cm^{-1} auf. Diese Schwingung ist sowohl im FT-IR- als auch im Raman-Spektrum von schwachem Charakter und ist daher nicht eindeutig erkennbar. Im Bereich von 1150 cm^{-1} bis 1010 cm^{-1} ist zum Einem die Valenzschwingung der C-O-C Bindung anzutreffen, zum Anderen die C-O sowie die C-C Valenzschwingung. Des Weiteren liegen in diesem Bereich die Deformationsschwingungen der CCH-, der COH- und der HCO-Gruppen. Das intensive Signal bei 1020 cm^{-1} ist der C-O-C Bindung der α -(1→6)-Glukoseeinheit zuzuordnen, das auf Grund der starken Flexibilität auftritt. Bei 917 cm^{-1} liegt die out-of-plane Deformationsschwingung der sekundären Alkohol-Gruppen.

Des Weiteren liegen in dem Wellenzahlbereich von 940 cm^{-1} - 760 cm^{-1} die Schwingungen des Glucopyranose-Ringsystems. Dieses Ringsystem weist 3 Absorptionsbanden auf, eine

bei 917 cm^{-1} , eine weitere bei 848 cm^{-1} und eine bei 763 cm^{-1} .^[167] In Tabelle 4.3 sind die Schwingungen des Dextrans zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Vergleich der verschiedenen Schwingungsmodifikationen von Dextran zwischen FT-IR - und Raman-Spektroskopie (s = strong, m = medium, w = weak).

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Gruppe	Schwingungsart	Intensität FT-IR/ Raman	Quelle ^[145] [cm ⁻¹]
3300	O-H	Valenzschwingung	m-s / w	3550-3230
2920	C-H	Valenzschwingung	m-s / m-s	2975-2840
1460-1260	O-H	in-plane Deformationsschwingung der sekundären Alkohol-Gruppe	m-s / m-w	1430-1370
1460-1260	C-H	Deformationsschwingungen / Scherschwingung der CH ₂ -Gruppe	m / m-w m / m	1465-1440 1480-1440
1460-1260	C-H	Deformationsschwingung	w / w	1360-1290
1150-1000	C-O	Valenzschwingung	s / m-s	1150-1075
1150-1010	C-O-C	asymmetrische Valenzschwingung	s / m	1110-1090
1150-1010	C-C	Valenzschwingung	w / m-s	1090-1005

4.2.2 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON POLYALDEHYD-DEXTRAN

Als erste Möglichkeit zur Anbindung des Doxorubicins über dessen freie Amino-Gruppe an das Dextran soll die Oxidation der sekundären OH-Gruppen des Dextrans zum Aldehyd vorgestellt werden. Dadurch entsteht unter Ringspaltung Polyaldehyd-Dextran (PAD, s. Abbildung 4.13). Zur Synthese des PADs wird Dextran mit dem Oxidationsmittel Natriumperodat versetzt und anschließend auf Grund der Wasser- und Lichtempfindlichkeit von Dextran mittels Gefriertrocknung aufgearbeitet. Statistisch gesehen ist es unwahrscheinlich, alle OH-Gruppen des Dextrans durch diese Methode zu oxidieren. Durch Wiederholung der vorgeschriebenen Synthese kann jedoch die Anzahl der Aldehyd-Gruppen erhöht werden und damit eingehend die Anbindungsmöglichkeit des Wirkstoffs an das Derivat bzw. an die MnZn-MNP.

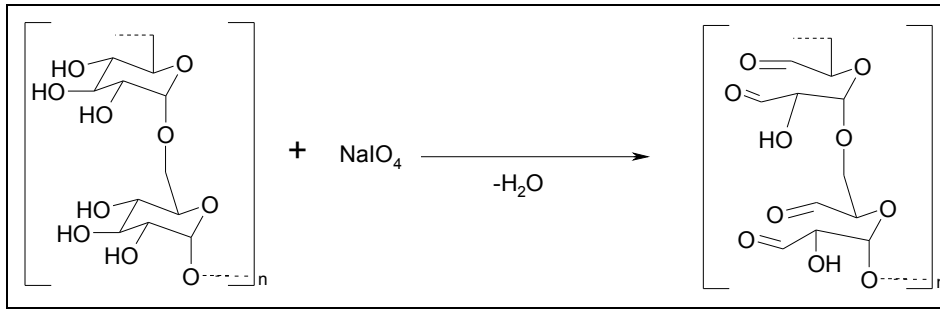


Abbildung 4.13: Glykolspaltung des Dextrans mittels Natriumperiodat zum PAD.

In Abbildung 4.14 sind die FT-IR-Spektren der verschiedenen Umsetzungsgrade (UG) des Polyaldehyds dargestellt. Deutlich sind die Signale des PADs zu erkennen. Das Charakteristische für PAD, ist die Aldehyd-Gruppe. Die C-H Valenzschwingung der Aldehyd-Gruppe liegt bei 2880 cm^{-1} und weist eine schwache Intensität auf. Da sie von der C-H Valenzschwingung der CH- / CH_2 -Gruppe überlagert wird, ist diese Schwingung im FT-IR-Spektrum nur schwer zu kennen. Hingegen ist die repräsentative C=O Valenzschwingung im FT-IR-Spektrum eindeutig zu erkennen. Diese liegt bei 1735 cm^{-1} und stimmt mit dem Wellenzahlbereich (1740 cm^{-1} bis 1720 cm^{-1}) überein, der in der Literatur angegeben ist.^[145] Weiterhin geht aus dem Spektrum hervor, dass die Intensität des Signals der C=O Valenzschwingung linear mit dem Umsetzungsgrad zu nimmt. Die C-H Deformationsschwingung der Aldehyd-Gruppe liegt zwischen 975 cm^{-1} und 780 cm^{-1} . Auf Grund der schwachen Intensität kann diese Schwingung nur schwer beobachtet werden. Beim 2. Umsetzungsgrad von PAD ist im FT-IR-Spektrum eindeutig ein Peak bei 930 cm^{-1} zu erkennen, der im Spektrum des Dextrans nicht zu finden ist.

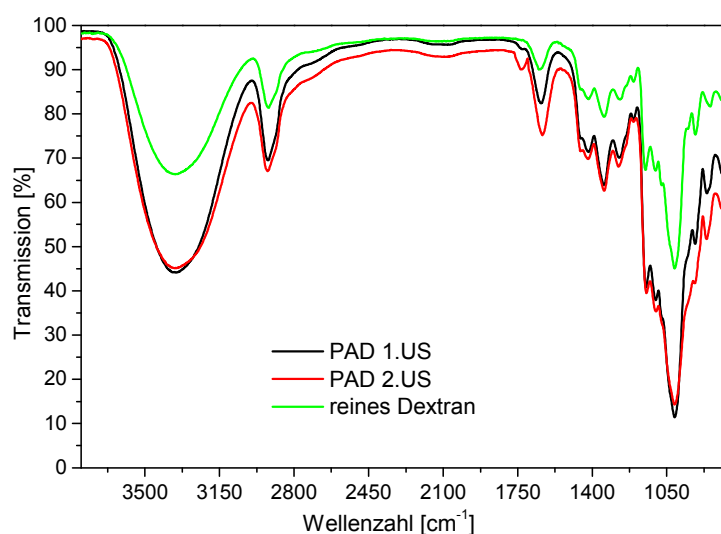


Abbildung 4.14: FT-IR-Spektren der verschiedenen Umsetzungsgrade des Polyaldehyd-Dextrans im Vergleich mit dem Spektrum von nativem Dextran. PAD kann eindeutig anhand der charakteristischen C=O Deformationsschwingung im Spektrum nachgewiesen werden.

Die Abbildung 4.15 zeigt die Raman-Spektren der Polyaldehyd-Dextran-Verbindungen zusammen mit dem Spektrum des Dextrans. Auch hier sind die zwei charakteristischen C-H Valenzschwingungen der Aldehyd-Gruppe vorhanden, die bei 2900 cm^{-1} und bei 2720 cm^{-1} zu beobachten sind. Jedoch ist Letztere eher als Schulter der intensiveren Bande bei 2900 cm^{-1} wahrzunehmen.

Auf Grund der schwachen Intensität der C=O Valenzschwingung ist es nicht möglich, diese Schwingung im Raman eindeutig zu charakterisieren. Der leichte Signalanstieg könnte auch vom Signalrauschen herrühren. Allerdings sind die C-H Deformationsschwingungen bei 800 cm^{-1} sowie die C-C=O in-plane Deformationsschwingung bei 760 cm^{-1} deutlich zu erkennen.

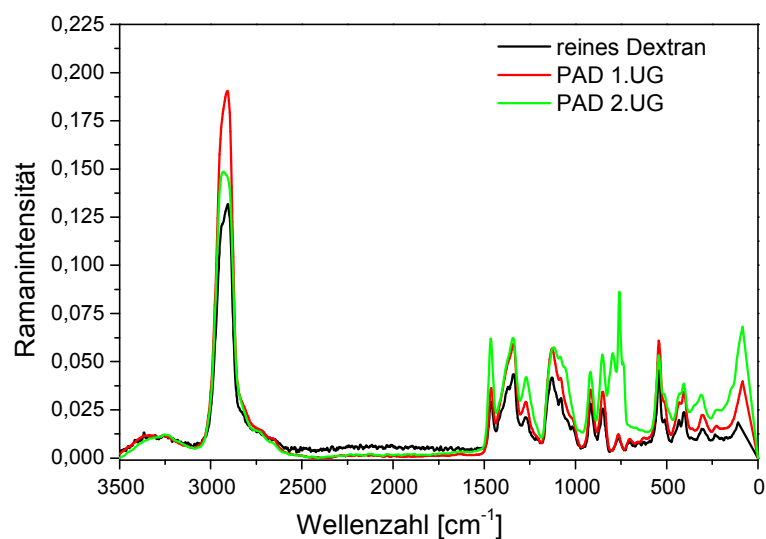


Abbildung 4.15: Raman-Spektren von Polyaldehyd-Dextran im direkten Vergleich mit nativem Dextran. Das Produkt PAD kann ebenfalls nachgewiesen werden.

Da Polyaldehyd-Dextran im ultravioletten Bereich eine Absorptionsbande aufweist, kann die UV / Vis-Spektroskopie zur Charakterisierung des PADs herangezogen werden. Alle anderen Dextran-Derivate sowie Dextran selbst absorbieren im UV- oder im sichtbaren Bereich des Lichts nicht.

Ein typische UV / Vis-Spektrum von PAD ist in Abbildung 4.16 visualisiert. Die Absorption der Aldehyd-Gruppe liegt bei einer Wellenlänge von 275 nm . Bei dieser Wellenlänge findet ein Elektronenübergang von einem nichtbindenden n-Orbital in ein leeres antibindendes π^* -Orbital statt.

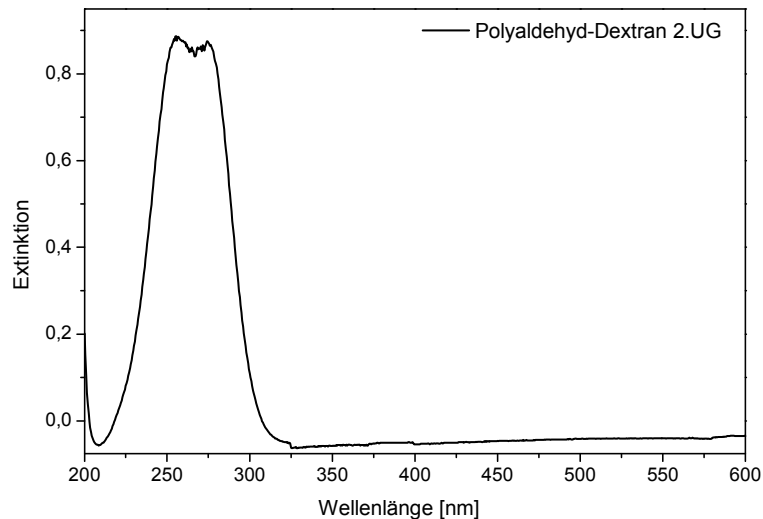


Abbildung 4.16: UV / Vis-Spektrum von PAD mit einem Extinktionsmaximum bei 275 nm.

Eine weitere qualitative Nachweismöglichkeit für Aldehyd-Gruppen ist die Zugabe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin zur Aldehyd enthaltenden Lösung. Die daraus resultierende Hydrazon-Bindung fällt durch anschließendes Ansäuern mit Essigsäure als gelber Niederschlag wieder aus.^[168] Auch dieser Nachweis ist positiv verlaufen.

4.2.3 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON CARBOXYMETHYL-DEXTRAN

Als zweite Vorgehensweise zur Anbindung des Doxorubicin an Dextran soll anhand der Einführung einer Carbonsäure mittels Monochloressigsäure beschrieben werden. Bei dieser Reaktion bleibt das Ringsystem des Dextrans erhalten. Die resultierende Verbindung ist das Carboxymethyl-Dextran (CMD). Zur Veresterung der Hydroxyl-Gruppen wird Dextran mit Monochloressigsäure in *iso*-Propanol und Natronlauge umgesetzt (s. Abbildung 4.17). Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine nukleophile Substitution (S_{N1} -Reaktion).^[169] Die Wiederholung der Synthese führt ebenfalls zur Erhöhung des Substitutionsgrads der OH-Gruppen durch Carboxymethyl-Gruppen. Die Bestimmung des Substitutionsgrades erfolgt mittels Rücktitration. Dazu wird eine definierte Menge an CMD in 1 M Natronlauge gelöst und gegen eine 1 M Salzsäure zurücktitriert. Als Indikator wird Phenolphthalein verwendet. Bei einmaliger Reaktion wird ein Substitutionsgrad (DS: Degree of Substitution) von beträgt 0,8; bei einer erneuten Reaktion ein DS von 1,2 erreicht. Dabei definiert der Substitutionsgrad das Verhältnis der Carboxymethyl-Gruppen pro Glukoseeinheit.

$$DS = \frac{\text{Anzahl der Carboxymethyl-Gruppen}}{\text{Anzahl der Glukoseeinheiten}}$$

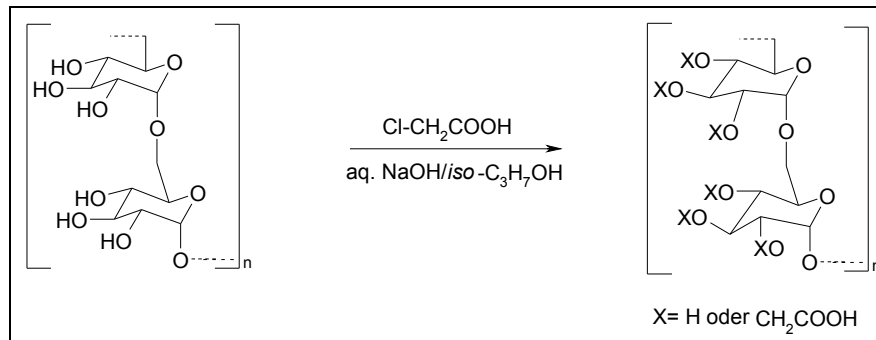


Abbildung 4.17: Schematische Darstellung der Veresterung von Dextran mit Monochloressigsäure in Gegenwart von Natronlauge und *iso*-Propanol zum CMD.

Das repräsentative FT-IR-Spektrum von CMD ist in Abbildung 4.18 visualisiert. Die für CMD charakteristische Valenzschwingung der Carboxyl-Gruppe hat bei der Wellenzahl 1750 cm^{-1} eine sehr intensive Bande. Die Valenzschwingung der OH-Gruppe zwischen 3300 cm^{-1} und 2500 cm^{-1} überlappt mit den Valenzschwingungen der sekundären Alkohole des Dextrans. Sind Wasserstoffbrückenbindungen $\text{OH}\cdots\text{O}$ ausgebildet, so sind mehrere Absorptionsbanden im Bereich von 2750 cm^{-1} bis 2500 cm^{-1} zu sehen. Diese Schwingungen (2750 cm^{-1} , 2651 cm^{-1} und 2545 cm^{-1}) sind in der Abbildung 4.18 zu erkennen. Die asymmetrische Valenzschwingung der deprotonierten Carboxyl-Gruppe liegt bei 1640 cm^{-1} , die symmetrische Valenzschwingung dieser Gruppe hingegen bei 1340 cm^{-1} . Die Absorptionsbande der C-O Bindung liegt bei 1250 cm^{-1} . Die Bande bei 1422 cm^{-1} ist eine Kombination aus der C-O Valenzschwingung und der O-H Deformationsschwingung. Die anderen Schwingungen entsprechen denen von Dextran.

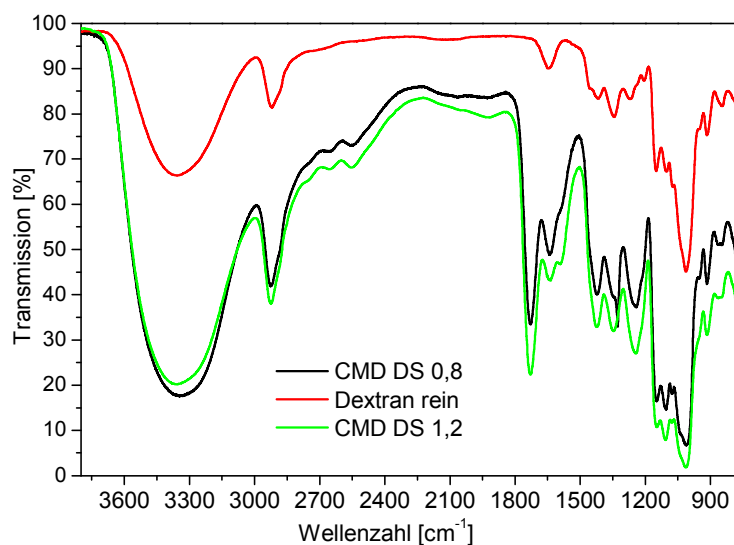


Abbildung 4.18: FT-IR-Spektren von CMD mit DS 0,8 und 1,2 sowie von nativem Dextran. Anhand der Spektren kann CMD eindeutig nachgewiesen werden.

Das entsprechende Raman-Spektrum von CMD ist in Abbildung 4.19 aufgezeigt. Die Valenzschwingung der OH-Gruppe weist im Raman-Spektrum eine schwache Intensität auf. Gleiches gilt für die charakteristische C=O Valenzschwingung, die bei der Wellenzahl 1740 cm^{-1} liegt. Mit steigendem Substitutionsgrad kann allerdings eine Zunahme der Intensität dieser Bande beobachtet werden. Die anderen Absorptionsbande sind äquivalent zu denen des FT-IR-Spektrums.

Als großen Vorteil bietet die Raman-Spektroskopie die Möglichkeit den Wellenzahlbereich unter 600 cm^{-1} zu analysieren. Bei 540 cm^{-1} liegt beispielsweise die out-of-plane Valenzschwingung der C-O Bindung. Die OH...O Deformationsschwingung liegt bei der Wellenzahl 80 cm^{-1} .

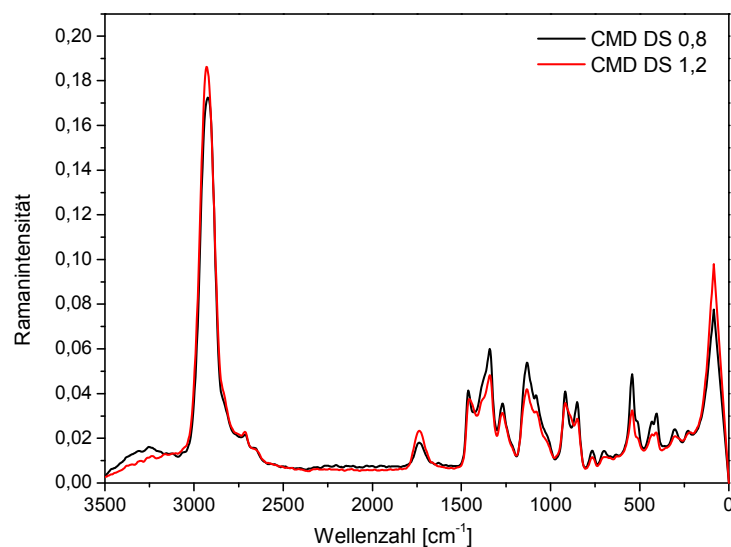


Abbildung 4.19: Raman-Spektren der anteilig verschieden substituierten CMD, mit dem charakteristischen Signal der C=O Valenzschwingung bei 1740 cm^{-1} .

4.2.4 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON ETHYLENDIAMIN-CARBOXYMETHYL-DEXTRAN

Nachfolgend wird eine alternative Anbindungsmöglichkeit des Wirkstoffs an Dextran-Derivate präsentiert. Bei PAD und CMD erfolgt die Anbindung des Doxorubicin über dessen primäre Amino-Gruppe. Durch die Einführung einer primären Amino-Gruppe an Dextran, erfolgt die Anbindung des Doxorubicins über dessen Keto-Gruppe. So entstehen einerseits diverse Bindungsmöglichkeiten des Wirkstoffs an Dextran-Derivate, wodurch auch andere Wirkstoff oder Biomolekülen die Möglichkeit geboten wird an Dextran-Derivate zu binden. Andererseits können auch diverse pH-sensitive oder thermisch labile Linker zwischen Dextran-Derivat und

Wirkstoff gebaut werden. Ausgehend von Carboxymethyl-Dextran wird dieses im ersten Fall mit Ethylendiamin (Ed) umgesetzt. Die daraus resultierende Bindung ist die Säure-Amid-Bindung, die entsteht, wenn die Carboxyl-Gruppe von CMD mit der primären Amino-Gruppe des Ethylendiamins reagiert. Die Reaktion ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Die Umsetzung macht eine vorherige Aktivierung der reaktiven Gruppen wie beispielsweise Carboxyl- oder Amino-Gruppen notwendig. Dies geschieht durch den Crosslinker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS).^[170] Der im Verlauf der Reaktion mit der Carbonsäure intermediär gebildet NHS-Ester ist sehr reaktiv und setzt sich dadurch mit der Amino-Gruppe des zugegebenen Ethylendiamins zum Ethylendiamin-Carboxymethyl-Dextran (Ed-CMD).

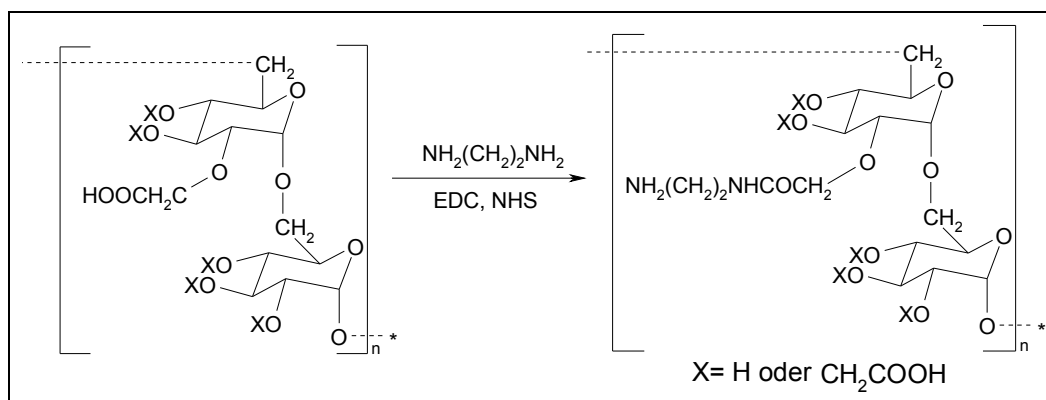


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung des Reaktionswegs zur Synthese von Ed-CMD ausgehend vom Carboxymethyl-Dextran mit DS 1,2.

Die durch die Umsetzung gebildete Säure-Amid-Bindung ist das Charakteristikum des Produkts dessen Wiederfindung mittels FT-IR- bzw. Raman-Spektren als qualitativer Nachweis einer positiv verlaufenen Reaktion verwendet wird. Das dazugehörige FT-IR-Spektrum findet sich in Abbildung 4.21, das Raman-Spektrum in Abbildung 4.22.

Die N-H Valenzschwingung der Säure-Amid-Bindung sowie der freien primären Amino-Gruppe überlagern sich auf Grund der schwachen Intensität mit der Valenzschwingung der OH-Gruppe und sind deshalb schwer im FT-IR-Spektrum zu erkennen. Allerdings deutet die leichte Spaltung der Bande zwischen 3500 cm⁻¹ und 3150 cm⁻¹ auf die Valenzschwingung hin. Die Doublet-Aufspaltung dieser Absorptionsbande ist auf *cis*-/*trans*-Isomerie der NH-Gruppe der Säure-Amid-Bindung zurückzuführen. Die Absorptionsbande der *cis*-Form ist im Spektrum bei 3390 cm⁻¹ und die der *trans*-Form bei 3180 cm⁻¹ zu sehen. Dadurch, dass Stickstoff eine geringere Elektronegativität als Sauerstoff aufweist, ist die C=O Valenzschwingung zu tieferen Wellenzahlen verschoben und liegt in diesem Fall bei 1650 cm⁻¹ anstelle von 1700 cm⁻¹. Die N-H Deformationsschwingung der *trans*-Form der Säure-Amid-Bindung ist im Spektrum bei einer Wellenzahl von 1570 cm⁻¹ zu

identifizieren. Hingegen liegt die in-plane N-H Deformationsschwingung bei 1450 cm^{-1} . Der Peak bei 1413 cm^{-1} ist der Absorptionsbande der C-N Valenzschwingung der freien, primären Amino-Gruppen des Ethylendiamins zuzuordnen. Die Valenzschwingung der C-N Bindung liegt für die *cis*-Form bei 1319 cm^{-1} und für die *trans*-Form bei 1260 cm^{-1} . Das gänzliche Ausbleiben der Valenzschwingung der deprotonierten Carboxyl-Gruppe in Verbindung mit dem schwachen Signal bei 1750 cm^{-1} deutete auf einen geringen Anteil an nicht umgesetzten Carboxyl-Gruppen hin.

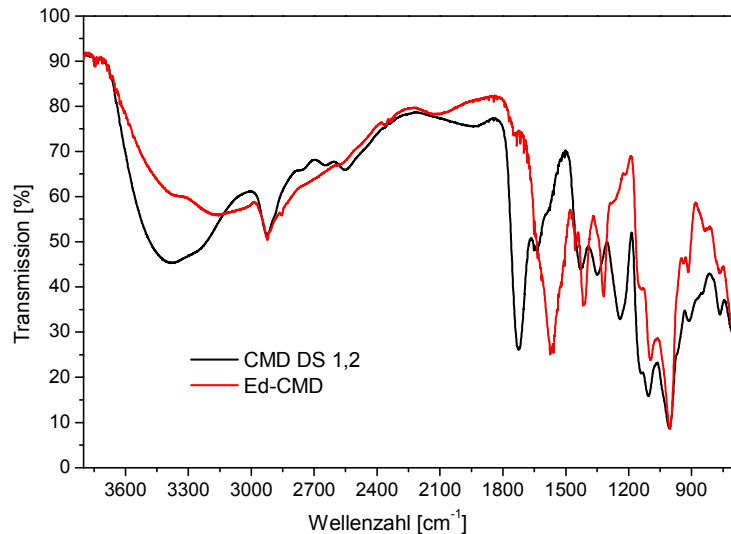


Abbildung 4.21: Darstellung eines FT-IR-Spektrums von Ed-CMD. Die N-H Deformationsschwingung der gebildeten Säure-Amid-Bindung liegt 1570 cm^{-1} .

Abbildung 4.22 zeigt das Raman-Spektrum des synthetisierten Dextran-Derivates. Vergleich mit dem Spektrum von CMD zeigt signifikante Unterschiede auf. Die Banden der charakteristischen Schwingungen, die vorher im FT-IR-Spektrum eindeutig waren, sind zwar im Raman-Spektrum nur schwach zu erkennen. Die charakteristischen Peaks, die zur Unterscheidung zwischen CMD und Ed-CMD herangezogen werden können, liegen bei 3180 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1415 cm^{-1} und 1340 cm^{-1} .

So kann dem Wellenzahlbereich zwischen 3300 cm^{-1} und 3180 cm^{-1} die asymmetrische sowie die symmetrische N-H Valenzschwingung der NH- und NH_2 -Gruppe zugeordnet werden. Bei 1630 cm^{-1} überlagert sich die C=O Valenzschwingung mit der N-H Deformationsschwingung. Diese Schwingungen sind im FT-IR-Spektrum signalintensiver. Die restlichen Signale stimmen mit denen bereits beschriebenen im FT-IR-Spektrum überein.

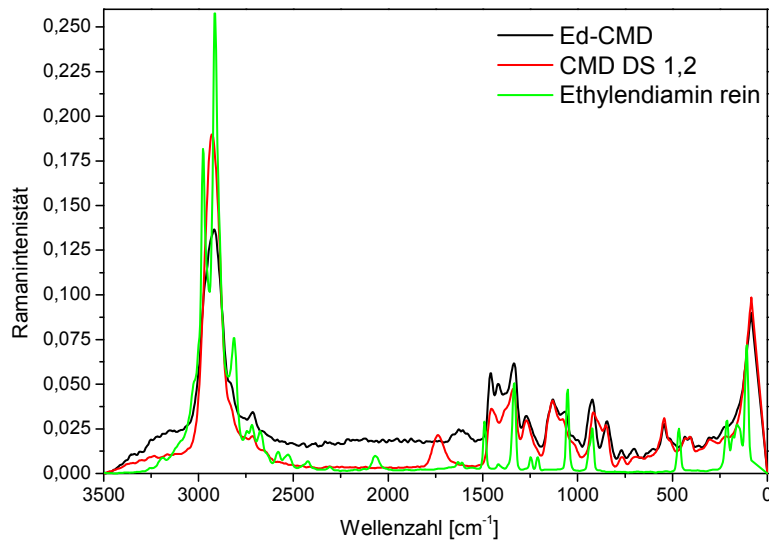


Abbildung 4.22: Raman-Spektrum von synthetisierten Ed-CMD im Vergleich zu den Edukten Ethylendiamin und CMD. Die Verbindungen können eindeutig anhand der vorhandenen Absorptionsbanden nachgewiesen werden.

4.2.5 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON HYDRAZIN-CARBOXYMETHYL-DEXTRAN

Die zweite Möglichkeit zur Anbindung des Wirkstoffs über dessen Keto-Gruppe an das derivatisierte Polysaccharid ist die Umsetzung von CMD mit Hydrazin. Analog zur zuvor beschriebenen Synthese von Ed-CMD reagiert das Hydrazin in Gegenwart von EDC und NHS mit CMD unter Bildung einer Säure-Amid-Bindung. In Abbildung 4.23 ist diese Reaktion zur Synthese von Hydrazin-Carboxymethyl-Dextran (Hy-CMD) schematisch dargestellt.

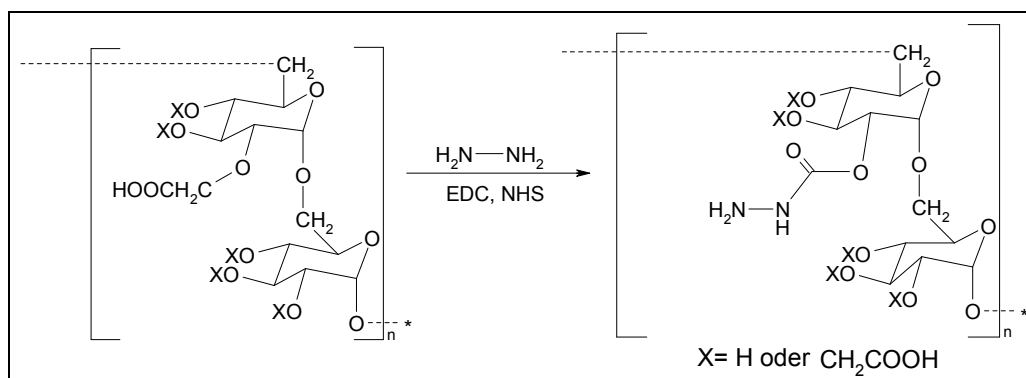


Abbildung 4.23: Schematische Darstellung des Reaktionswegs zur Synthese von Hy-CMD ausgehend vom Carboxymethyl-Dextran mit DS 1,2.

Das FT-IR-Spektrum (Abbildung 4.24) zeigt die charakteristischen Absorptionsbanden von synthetisierten Hy-CMD-Verbindungen. Die Ähnlichkeit zum FT-IR-Spektrum von Ed-CMD-Verbindungen ist auf nahezu identische Schwingungsarten der Bindungen zurückzuführen. Der Unterschied liegt in der zusätzlichen $(\text{CH}_2)_2$ -Gruppe von Ed-CMD, die im FT-IR-Spektrum weniger Intensität aufweist. Des Weiteren sind Schwingungen mit Inversionszentrum IR-inaktiv, wie es der Fall bei Hydrazin ist.

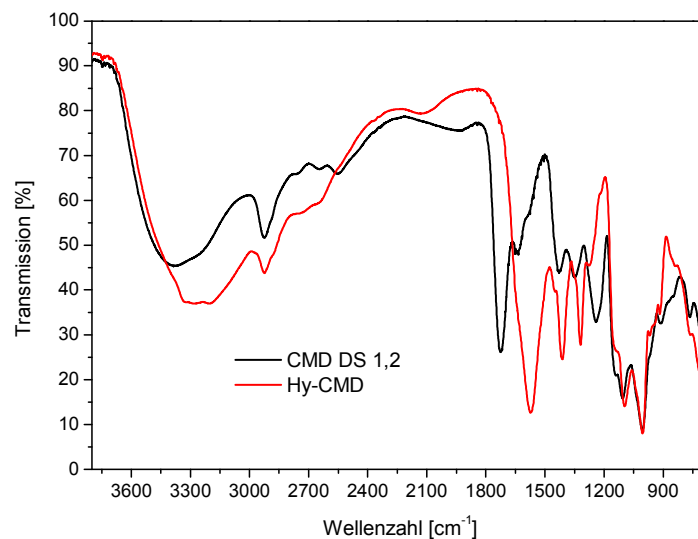


Abbildung 4.24: FT-IR-Spektrum von Hy-CMD mit Banden bei 1620 cm^{-1} , die eine Kombination aus C=O Valenzschwingung und N-H Deformationsschwingung der NH_2 -Gruppe ist.

Hingegen bietet das Raman-Spektrum in Abbildung 4.25 einen besseren Hinweis auf die Verbindung. Die breite Absorptionsbande zwischen 3350 cm^{-1} und 3180 cm^{-1} ist bedingt durch die N-H und N- H_2 Valenzschwingung. Diese repräsentative Bande ist im Spektrum des nativen CMDs nicht vorhanden. Die charakteristische C=O Valenzschwingung ist im Vergleich zu der C=O Schwingung der Carboxyl-Gruppe zu einer tieferen Wellenzahl verschoben. Die Absorptionsbande liegt bei 1620 cm^{-1} und überlagert sich somit mit der Deformationsschwingung der NH_2 -Gruppe.

Das sehr schwache Signal bei 1545 cm^{-1} ist der N-H Deformationsschwingung zuzuordnen. Des Weiteren liegt ein Großteil der Schwingungen des Hydrazins im Wellenzahlbereich der Schwingungen von CMD. Auf Grund dieser Tatsache und der geringeren Konzentration an Hydrazin werden die Absorptionsbanden des Hydrazins von denen des CMDs überlagert. Allerdings sind die signifikanten Banden der Hy-CMD-Verbindung eindeutig im Spektrum wieder zu finden.

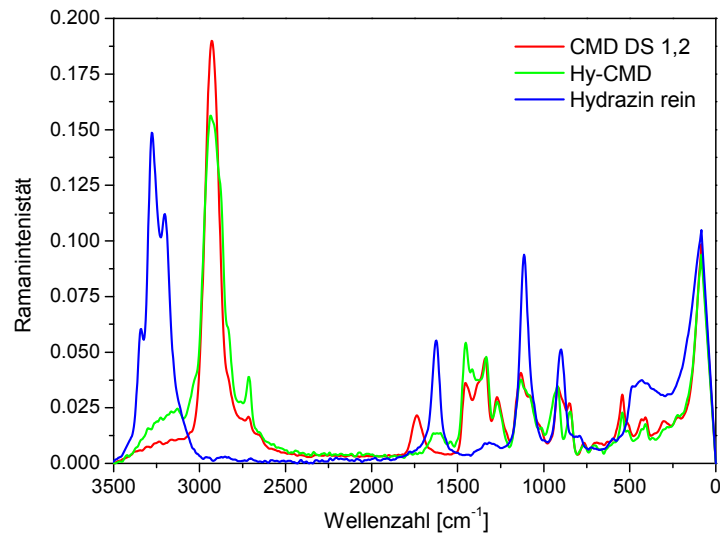


Abbildung 4.25: Raman-Spektrum von Hy-CMD im Vergleich zum reinen Hydrazin und CMD. Die Verschiebung der C=O Valenzschwingung zeigt die erfolgreiche Anbindung von Hydrazin an CMD.

4.2.6 ZUSAMMENFASSUNG

Alle Dextran-Derivate werden sowohl in FT-IR- als auch in Raman-Spektren zweifellos nachgewiesen. Bei den dargestellten Synthesen handelt es sich ausnahmslos um sehr gut reproduzierbare Prozesse. In Abbildung 4.26 sind FT-IR-Spektren aller synthetisierten Dextran-Derivate einander gegenübergestellt. So kann ein direkter Vergleich zwischen den charakteristischen Schwingungen der Einzelverbindungen vorgenommen werden.

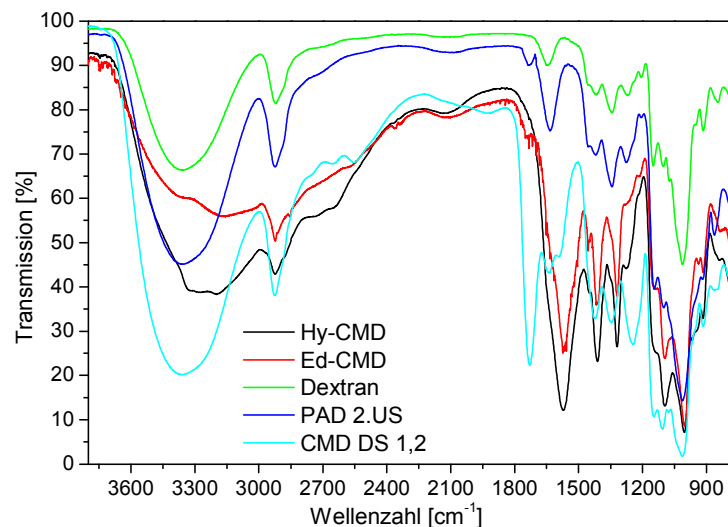


Abbildung 4.26: FT-IR-Spektren aller synthetisierten Dextran-Derivate zum direkten Vergleich.

Die Analyse der FT-IR-Spektren, basierend auf Untersuchung zwischen Ed-CMD und Hy-CMD, ist auf Grund des nahezu identischen Verlaufs schwierig, aber dennoch eindeutig. Dieser signifikante Unterschied wird in Raman-Spektren, die in der Abbildung 4.27 gezeigt sind, noch besser verdeutlicht. Weitere Schwingungsarten sowie die dazugehörigen Gruppen und die entsprechenden Wellenzahlen können im Anhang in Kapitel 9.4 nachgelesen werden

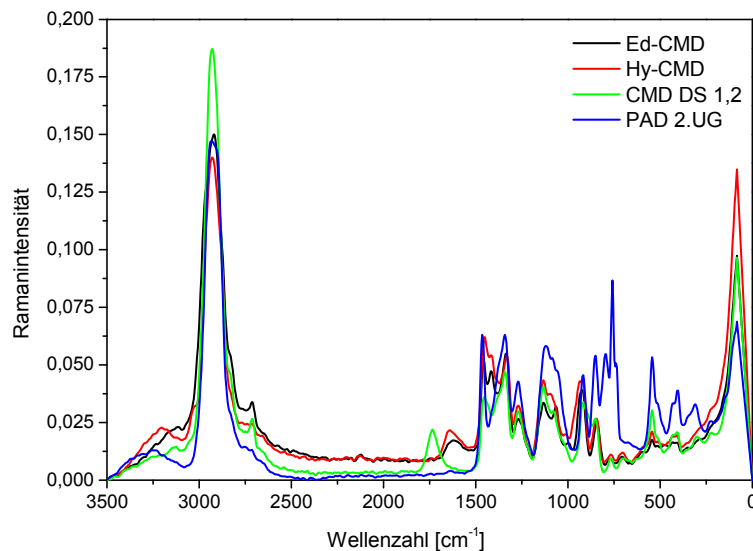


Abbildung 4.27: Raman-Spektren aller synthetisierten Dextran-Verbindungen. Die Verschiebung der C=O Valenzschwingung ist im Ed-CMD und Hy-CMD im Vergleich zu CMD-Spektrum eindeutig zu erkennen.

4.3 DARSTELLUNG DER FUNKTIONALISIERUNG VON MAGNETISCHEN NANOPARTIKELN

4.3.1 BESCHICHTUNG UND FUNKTIONALISIERUNG DER NANOPARTIKEL

Im folgenden Kapitel soll die Beschichtung der MnZn-MNP mit den synthetisierten Dextran-Derivaten und die anschließende Doxorubicin-Funktionalisierung dieser beschichteten MnZn-MNP vertieft werden. Die Charakterisierung erfolgt mittels DLS, TEM, FT-IR- und UV / Vis-Spektroskopie. Die dazugehörigen Graphen der beschichteten MnZn-MNP werden zusammen mit der Charakteristik der Doxorubicin funktionalisierten MnZn-MNP wiedergegeben.

Je nach funktioneller Gruppe erfolgt die Bindung der Dextran-Derivate auf die Partikeloberfläche durch Wasserstoffbrückenbindungen oder Adsorption. So binden beispielsweise die OH-Gruppen des Dextrans durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen auf der MnZn-MNP-Oberfläche. Die π -Elektronen von Sauerstoff der Carboxyl-Gruppen können hingegen wechselwirken mit den d-Orbitalen von Eisen, wodurch $\pi \rightarrow d$ -Bindungen entstehen (vgl. Abbildung 4.28).

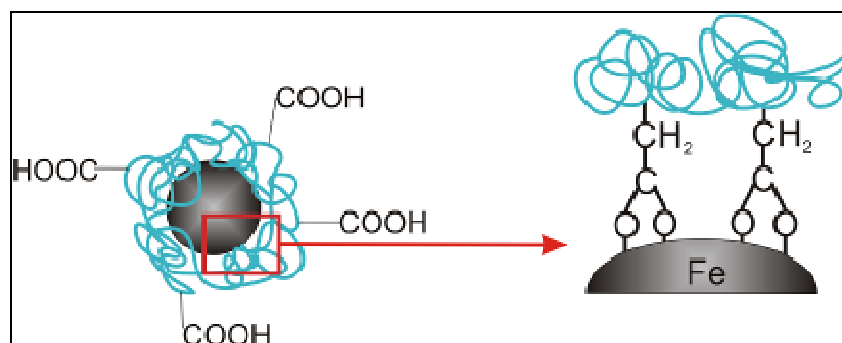


Abbildung 4.28: Anbindung von Carboxyl-Gruppen auf der Nanopartikeloberfläche durch Adsorption.

Die kovalente Bindung des Wirkstoffs an PAD oder CMD erfolgt über die freie Amino-Gruppe von Doxorubicin. Bei Umsetzung beispielsweise mit PAD reagiert dieser mit der Aldehyd-Gruppe von PAD. Es handelt sich bei dieser Reaktion um eine indirekte reduktive Aminierung. Der Stickstoff des primärenamins von Doxorubicin greift nukleophil an das Kohlenstoff-Atom der Aldehyd-Gruppe des PADs an. Das intermediär gebildete Halbamin reagiert unter Wasserabspaltung zum Imin weiter. Das Imin-Intermediat wird durch die katalytische Menge an Essigsäure protoniert, dabei bildet sich ein instabiles Zwischenprodukt, welches durch Natriumcyanoborhydrid zum entsprechenden sekundären Amin reduziert wird. Die eigentliche Reaktion zum Imin wird als reduktive Aminierung

bezeichnet. Indirekt deshalb, da das gebildete Imin als Intermediat fungiert und weiter reduziert wird. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 4.29 dargestellt.

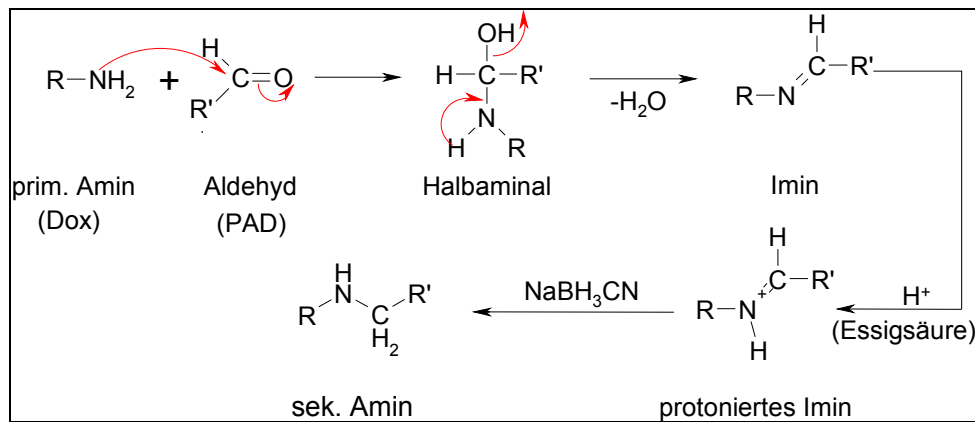


Abbildung 4.29: Reaktionsmechanismus der Anbindung von Doxorubicin an PAD über indirekte reduktive Aminierung.

In Abbildung 4.30 ist die Anbindung des Doxorubicins unter Bildung eines sekundärenamins an die PAD-beschichteten Nanopartikel visualisiert. Hauptsächlich erfolgt die Bindung des PADs an die Partikel über Wasserstoffbrücken. Im Allgemeinen handelt es sich bei Wasserstoffbrücken um relativ schwache Bindungen. Bezogen auf das gesamte Polymer kann allerdings die totale Bindungsenergie der Wasserstoffbrücken als hoch angesehen werden. Dies liegt an der hohen Anzahl an Hydroxyl-Gruppen pro Moleküle, die mit der Partikeloberfläche in Wechselwirkung treten können.^[171]

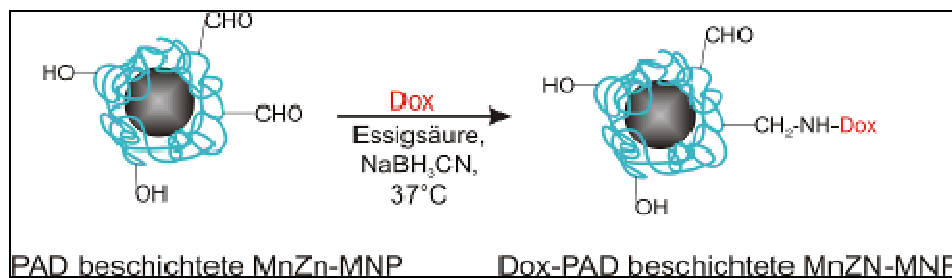


Abbildung 4.30: Schematische Darstellung der Funktionalisierung von PAD-beschichteten Nanopartikeln unter Bildung eines sekundärenamins.

Durch Einführung von Carboxyl-Gruppen bei CMD wird diese Anbindung an der MnZn-MNP-Oberfläche, auf Grund der stärkeren Wechselwirkungen, erheblich gesteigert. Die Anbindung des Wirkstoffs auf die CMD-beschichteten MnZn-MNP erfolgt über die Carboxymethyl-Gruppen des CMDs und der primären Amino-Gruppe des Doxorubicins unter Ausbildung einer Säure-Amid-Bindung (siehe Abbildung 4.31). EDC und NHS fungieren wieder als Aktivierungsreagenz der funktionellen Gruppen.^[170]

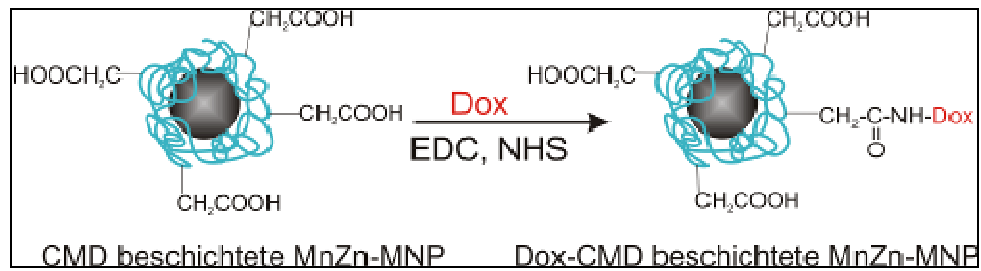


Abbildung 4.31: Schematische Visualisierung der Anbindung von Doxorubicin an CMD-beschichtete MnZn-MNP unter Ausbildung einer Säure-Amid-Bindung.

Da es statistisch gesehen nicht möglich ist, alle OH-Gruppen des Dextrans mittels Monochloressigsäure zu verestern, gestaltet sich die Anbindung von CMD auf die Partikeloberfläche zum Einen über Wasserstoffbrücken und zum Anderen durch Adsorption der Carboxyl-Gruppen. In Abbildung 4.32 ist dieses Zusammenspiel aus Wasserstoffbrücken und Adsorption an die Partikeloberfläche anhand von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP dargestellt.

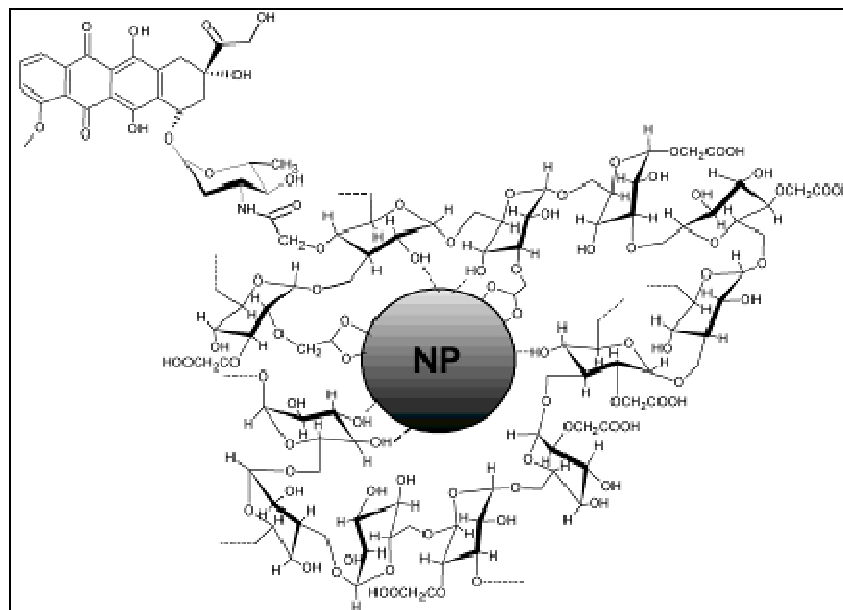


Abbildung 4.32: Schematische Darstellung der verschiedenen Bindungsmöglichkeiten (Adsorption oder Wasserstoffbrücken) von CMD an die Nanopartikeloberfläche.

Neben der freien Amino-Gruppe kann Doxorubicin ebenfalls über die vorhandene Keto-Gruppe an Dextran bzw. an seine Derivate kovalent gebunden werden. In Gegenwart katalytischer Mengen Essigsäure sowie des Reduktionsmittels Natriumcyanoborhydrid reagiert die Amino-Gruppe des Dextran-Derivates Ed-CMD mit der Keto-Gruppe von Doxorubicin. Dieser Reaktionsmechanismus ist analog zum bereits in Abbildung 4.29 beschriebenen. In Abbildung 4.33 ist die Anbindung von Doxorubicin am Beispiel von Ed-CMD-beschichteten MnZn-MNP dargestellt.

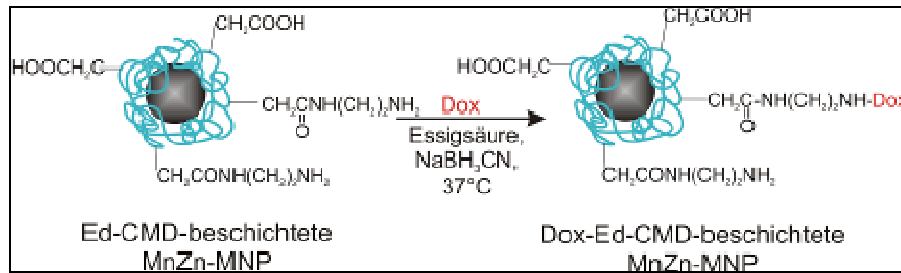


Abbildung 4.33: Schematische Darstellung der Reaktion von Doxorubicin mit Ed-CMD-beschichteten MnZn-MNP unter Bildung einer sekundären Amin-Bindung.

Im Gegensatz dazu bleibt die Reaktion Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP mit Doxorubicin auf der Stufe vom gebildeten Imin stehen. Durch Anbindung von Doxorubicin an das Hydrazin-Derivat entsteht eine säureempfindliche Hydrazone-Bindung. In Abbildung 4.34 ist diese Anbindung von Doxorubicin an beschichtete MnZn-MNP schematisch dargestellt.

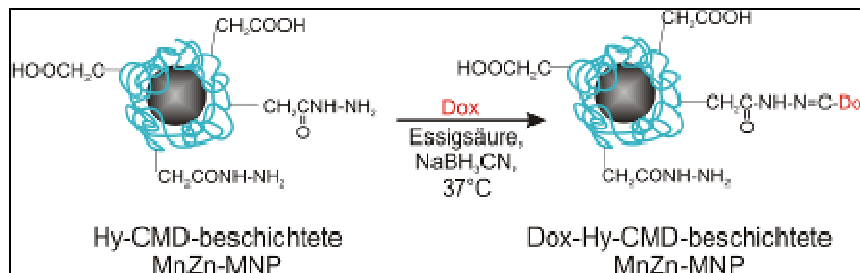


Abbildung 4.34: Schematische Darstellung der Anbindung von Doxorubicin an Hy-CMD-beschichtete MnZn-MNP unter Bildung einer Imin-Bindung.

Vor allem bei malignen Zellen oder Tumorgewebe ist diese chemische Eigenschaft von Bedeutung. Bei gesunden Zellen liegt der pH in deren Extrazellularraum zwischen 7,2 und 7,4; im Endosom selbst herrscht ein pH-Wert von 6,5 bis 5 und erst im primären oder sekundären Lyosom sinkt der pH auf 4 ab (vgl. Kapitel 2.1.3). Im Gegensatz dazu weisen Krebszellen immer einen pH-Wert auf, der um 0,5 bis 1 Einheiten niedriger liegt.^[172] Diese Differenz kann genutzt werden, um die gezielte Abspaltung des Doxorubicins in der Krebszelle zu ermöglichen. Gesunde Zellen werden dadurch nicht angegriffen und die Dosis des Wirkstoffs kann drastisch reduziert werden, da die Verweilzeit des Wirkstoffs im Tumorgewebe erhöht werden kann. Hingegen fungiert Ethylendiamin als Verknüpfungsreagenz zwischen beschichteten MnZn-MNP und Wirkstoff. Die gebildete Säure-Amid-Bindung gleicht in ihrer Funktion einer Peptid-Bindung. Im Allgemeinen sind diese Bindungen im sauren Milieu thermisch instabil. Es kommt zu einer sauren Hydrolyse, wodurch die Spaltung der Bindung in die entsprechende Carbonsäure und Amine erfolgt.

In Tabelle 4.4 sind die pH-Werte der verschiedenen beschichteten MnZn-MNP-Dispersionen sowie die mit Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP zusammengefasst. Es ist ersichtlich,

dass der pH-Wert je nachdem um welches Dextran-Derivat es sich handelt um bis zu 2 Einheiten erniedrigt wird. Vor allem bei denen mit Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP sinkt der pH-Wert unter 5. Dies kann mit den Protonen-abgebenden Carbonsäuren und Hydrazin-Gruppen erklärt werden. Jedoch liegen die pH-Werte für die zusätzlich mit Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP-Dispersionen in einem Bereich zwischen 6,0 und 7,0. Dieser pH-Bereich ist für eine spätere medizinische Anwendung optimal. Des Weiteren sollte die Konzentration der Partikel mindestens $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ betragen, da die eingesetzte Partikelmenge für die Stärke der Magnetisierung verantwortlich ist.

Tabelle 4.4: Tabellarische Zusammenfassung der pH-Werte sowie der Konzentration von verschiedenen funktionalisierten MnZn-MNP.

funktionalisierte Nanopartikel	pH-Wert der Dispersion	Konzentration der Dispersion [$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$]
Citrat-stabilisierte MnZn-MNP	7,23-7,68	30
CMD-NP	5,68	36
Dox-CMD-NP	6,32	30
PAD-NP	6,81	39
Dox-PAD-NP	6,50	33
Ed-CMD-NP	6,40	38
Dox-Ed-CMD-NP	6,23	32
Hy-CMD-NP	4,86	35
Dox-Hy-CMD-NP	5,97	29

Zur Charakterisierung der beschichteten sowie funktionalisierten Partikel wird die dynamische Lichtstreuung (DLS) herangezogen. Mittels dieser Methode wird der hydrodynamische Durchmesser von verschiedenen beschichteten MnZn-MNP bestimmt. Im Vergleich zu den unbeschichteten Partikeln muss dieser in Abhängigkeit vom Beschichtungsmaterial und der Funktionalisierung stetig wachsen. In Abbildung 4.35 sind die Verteilungskurven der DLS-Messung von PAD- und CMD-beschichteten MnZn-MNP sowie deren Funktionalisierung mit Doxorubicin dargestellt. Wie aus den Verteilungskurven zu erkennen ist, nimmt der hydrodynamische Durchmesser in der Reihenfolge Citrat-stabilisiertes MnZn-Ferrofluid < Dextran-Derivat-beschichtete MnZn-MNP < Doxorubicin-funktionalisierte Dextran-Derivat-beschichtete MnZn-MNP zu. Am stärksten ist diese Zunahme bei den Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP zu beobachten. Der Durchmesser nimmt vom Citrat-stabilisierten zum CMD-beschichteten MnZn-Ferrofluid von 59 nm auf 128 nm zu. Der gleiche Anstieg ist zwischen CMD-beschichteten und zusätzlich

mit Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP zu verzeichnen. Hier steigt der Durchmesser auf 204 nm an. Diese Zunahme liegt zum Einen in der Größe und Struktur des Dextran-Derivates und zum Anderen in der Bindung des Wirkstoffs an das Derivat begründet. Weiterhin ist bei den CMD-beschichteten Partikeln eine Verbesserung in der Polydispersität zu beobachten. Dieser Wert sinkt ausgehend von 1,56 für Citrat-stabilisierte MnZn-Ferrofluid auf 1,50 für die CMD-beschichteten MnZn-MNP und schließlich auf 1,32 für die zusätzlich mit Doxorubicin funktionalisierten MnZn-MNP. Die Ursache ist wahrscheinlich in der Carboxyl-Gruppe begründet, die zusätzlich die Ladungsdichte erhöht und somit die Partikel besser stabilisiert. Hingegen nimmt der Durchmesser bei PAD-beschichteten MnZn-MNP leicht zu. Dieser steigt in der Reihenfolge Citrat-stabilisiertem MnZn-Ferrofluid < PAD-beschichtete MnZn-MNP < Dox-PAD-funktionalisierte MnZn-MNP von 59 nm, auf 72 nm und schließlich auf 92 nm an. Einen Polydispersitäts-ändernden Einfluss kann in diesem Zusammenhang nicht festgestellt werden (vgl. Tabelle 4.5). Es ist somit keine Zunahme der Agglomeration zu beobachten. Dies wird ebenfalls anhand von TEM-Aufnahmen in Abbildung 4.50 belegt.

Die Ursache für diese unterschiedliche Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers der PAD- und CMD-beschichteten Partikel können in der unterschiedlichen Struktur des jeweiligen Dextran-Derivates begründet liegen. Bei der Synthese von PAD kommt es zu einer Glykol-Spaltung, wohingegen zur Herstellung von CMD die Hydroxyl-Gruppen verestert werden. Des Weiteren adsorbieren bei den CMD-beschichteten MnZn-MNP zusätzlich zu den OH-Gruppen auch die Carboxyl-Gruppen auf die Partikeloberfläche, wodurch mehr OH-Gruppen mit dem Lösemittel in Wechselwirkung treten können. Auch spielt der pH-Wert der Lösung vor allem bei geladenen Polymeren eine wichtige Rolle. Demnach vergrößert sich bzw. quillt das negativ geladene CMD, wenn es sich in einem sauren pH-Bereich befindet. Unter gleichen Bedingungen verändert sich das positiv geladene PAD allerdings nicht. Alle erläuterten Faktoren üben einen Einfluss auf die Größe des hydrodynamischen Durchmessers sowie auf die Polydispersität der Partikel aus. Der Unterschied im Durchmesser zwischen Dox-PAD- und Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP liegt möglicherweise darin, dass bei Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP weniger Doxorubicin gebunden ist als bei Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP. Je mehr Doxorubicin an beschichtete MnZn-MNP gebunden vorliegt, umso höher ist die auftretende Wechselwirkung zwischen Doxorubicin und dem Suspensionsmedium Wasser. Diese Wechselwirkung führt zu einer Vergrößerung der Solvathülle und damit des hydrodynamischen Durchmessers.

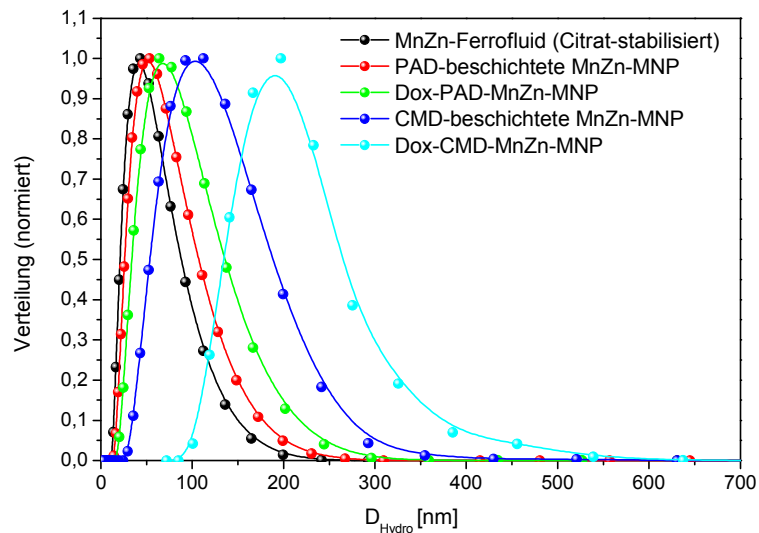


Abbildung 4.35: Darstellung einer Größenverteilung auf Basis der DLS von PAD- und CMD-beschichteten MnZn-MNP sowie von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP im Vergleich zu dem unbeschichteten MnZn-Ferrofluid. Nach der Funktionalisierung mit Dox ist in allen Fällen eine Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers zu verzeichnen.

In Abbildung 4.36 sind die Verteilungskurven der Ed-CMD und Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP sowie der Dox-Ed-CMD- und Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP aufgetragen. Der Übersichtlichkeit halber sind die hydrodynamischen Durchmesser mit den zugehörigen Polydispersitätswerten σ für die verschiedenen beschichteten und Doxorubicin funktionalisierten MnZn-MNP in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

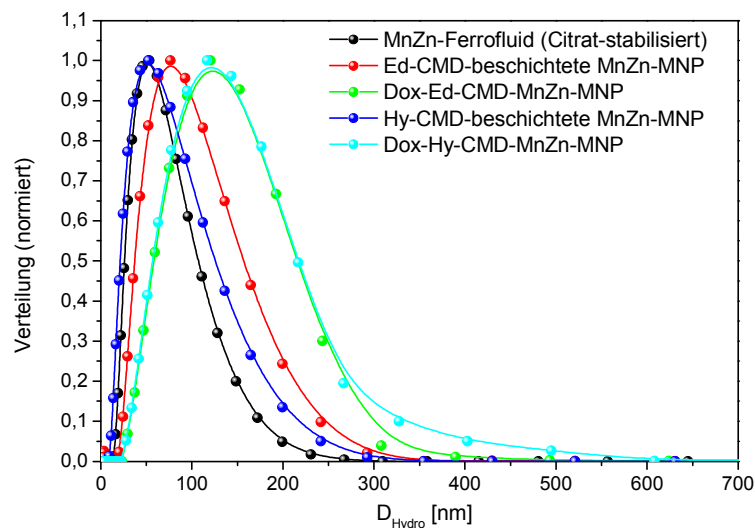


Abbildung 4.36: Darstellung der DLS-Messergebnisse von Ed-CMD- und Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP sowie der mit Doxorubicin funktionalisierten MnZn-MNP. Als Vergleich dienen DLS-Messergebnisse Citrat-stabilisierter MnZn-Ferrofluide. Nach der Funktionalisierung mit Doxorubicin ist in allen Fällen eine Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers zu verzeichnen.

Bei den Dextran-Derivat-beschichteten MnZn-MNP ist der hydrodynamische Durchmesser der Ed-CMD-beschichteten MnZn-MNP mit 105 nm etwas größer als der der Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP, der 85 nm beträgt. Dieser Unterschied ist auf strukturelle Unterschiede zwischen Hy zum Ed zurückzuführen sowie auf den unterschiedlichen pH-Wert der Dispersionen. Nach Modifizierung der beschichteten MnZn-MNP mit Doxorubicin steigt der hydrodynamische Durchmesser bei beiden auf nahezu den gleichen Wert an.

Tabelle 4.5: Tabellarische Zusammenfassung der hydrodynamischen Durchmesser D_{hydro} sowie der Polydispersitätsfaktoren σ von Dextran-Derivat-beschichteten MnZn-MNP sowie von Dox-funktionalisierten MnZn-MNP.

funktionalisierte Nanopartikel	D_{hydro} [nm] \pm Standardfehler	$\sigma \pm$ Standardfehler
Citrat-stabilisiertes Ferrofluid	59,41 \pm 0,63	1,56 \pm 0,01
CMD-MnZn-MNP	128,50 \pm 0,96	1,50 \pm 0,01
Dox-CMD-MnZn-MNP	204,73 \pm 1,16	1,32 \pm 0,01
PAD-MnZn-MNP	72,63 \pm 0,64	1,76 \pm 0,01
Dox-PAD-MnZn-MNP	92,05 \pm 1,10	1,75 \pm 0,02
Ed-CMD-MnZn-MNP	105,50 \pm 1,00	1,77 \pm 0,01
Dox-Ed-CMD-MnZn-MNP	147,80 \pm 2,42	1,70 \pm 0,02
Hy-CMD-MnZn-MNP	84,82 \pm 1,06	1,57 \pm 0,02
Dox-Hy-CMD-MnZn-MNP	150,85 \pm 2,00	1,54 \pm 0,02

Die Bindung des Wirkstoffs an Dextran-Derivate wird mit Hilfe von FT-IR- und Raman-Spektroskopie verfolgt. In Abbildung 4.37 sind FT-IR-Spektren von Dox-PAD- sowie von PAD-beschichteten MnZn-MNP dargestellt. In diesen und den nachfolgenden Spektren werden nur auf die charakteristischen Schwingungen eingegangen, die aus der Anbindung von Doxorubicin an die einzelnen Dextran-Derivate resultieren. Alle verbleibenden Schwingungen sind in Kapitel 9.4 des Anhangs aufgelistet.

Die charakteristischen Schwingungen von Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP sind die N-H Schwingungen der sekundären Amin-Bindung zwischen Doxorubicin und PAD. Die N-H Valenzschwingung liegt im Bereich von 3500 cm^{-1} bis 3300 cm^{-1} , allerdings wird diese schwache Absorptionsbande von der starken Absorptionsbande der OH Schwingung der Hydroxyl-Gruppen sowie des Wassers überlagert. Die N-H Deformationsschwingung liegt bei 1580 cm^{-1} . Die C-N Deformationsschwingung weist eine Bande zwischen 1190 cm^{-1} und 1170 cm^{-1} und von 1145 cm^{-1} bis 1130 cm^{-1} auf. Bedingt durch die schwache Intensität dieser

Banden, kommt es in diesen Bereichen zu einer Überlagerung mit den Schwingungen von PAD.

Der breite Absorptionspeak bei 2100 cm^{-1} weist auf protonierte Imine hin, welche während der Reaktion nicht vollständig reduziert wurden. In dieser Region tritt die Schwingung der $\text{C}=\text{N}^+\text{-H}$ Bindung auf. Allerdings ist die Intensität sehr schwach, welches auf eine geringe Konzentration schließen lässt. Weiterhin ist zu bemerken, dass die Absorptionsbande der $\text{C}=\text{O}$ Valenzschwingung bei 1720 cm^{-1} im Spektrum der Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP verschwunden ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Anbindung von Doxorubicin an PAD erfolgreich verlaufen ist.

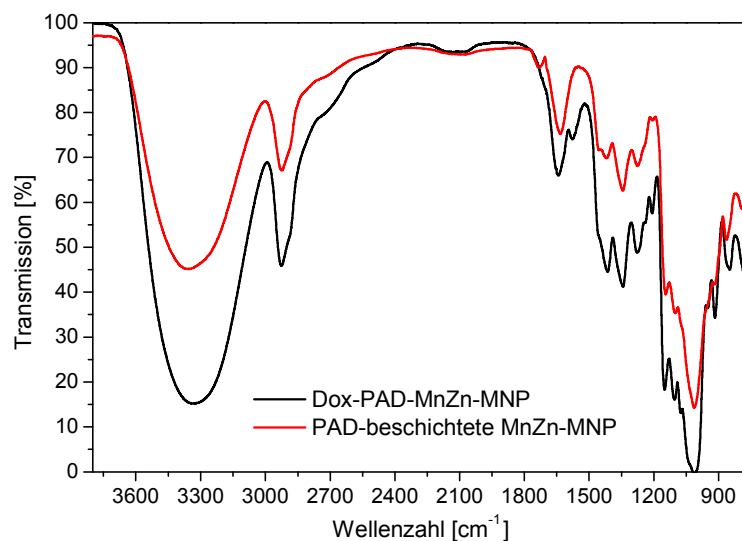


Abbildung 4.37: Vergleich von PAD-beschichteten MnZn-MNP und von Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP FT-IR-Spektren. Die

Abbildung 4.38 zeigt ein Raman-Spektrum der Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP. Die charakteristischen Schwingungen der sekundären Amin-Bindung sind ebenfalls erkennbar. Jedoch ist die schwache Absorptionsbande der N-H Deformationsschwingung bei 1565 cm^{-1} nur als Schulter der Bande bei 1630 cm^{-1} wahrzunehmen. Auf Grund der Wasserstoffbrückenbindung kann der N-H Absorptionspeak ebenfalls bei 1630 cm^{-1} lokalisiert werden. Ergänzend dazu ist die Bande der Aldehyd-Gruppe bei 730 cm^{-1} im Spektrum der Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP nicht wiederzufinden. Somit ist ebenfalls anhand der Raman-Spektren die erfolgreiche Bindung des Wirkstoffs an das Dextran-Derivat zu verzeichnen.

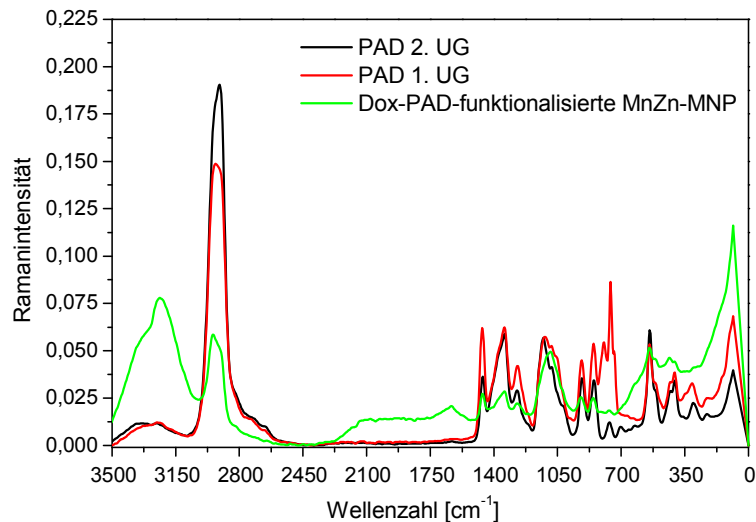


Abbildung 4.38: Typische Raman-Spektren von Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP im Vergleich zu ungebundenem PAD, der verschiedenen Umsetzungsgrade (UG).

Das FT-IR-Spektrum von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP ist in Abbildung 4.39 dargestellt. Die signifikante Bindung von Doxorubicin an beschichtete MnZn-MNP ist die resultierende Säure-Amid-Bindung. Die leichte Aufspaltung der breiten Absorptionsbande entsteht durch die vorhandene *cis*- bzw. *trans*-Isomerie der NH-Gruppe der Säure-Amid-Bindung. Die Bande der *cis*-Form liegt bei 3390 cm⁻¹ und die der *trans*-Form bei 3180 cm⁻¹. Des Weiteren kommen die Signalanhäufungen bei den Wellenzahlen 2752 cm⁻¹, 2656 cm⁻¹, 2546 cm⁻¹ und 1963 cm⁻¹ durch die Schwingungen des aromatischen Systems des Doxorubicins zustande. Es ist ersichtlich, dass die C=O Valenzschwingung bei 1710 cm⁻¹ stark an Intensität abgenommen hat. Die intensive Bande bei 1590 cm⁻¹ kann der N-H Deformationsschwingung dieser Bindung sowie der C=C Valenzschwingung des Aromaten zugeordnet werden. Die Absorptionsbande bei 1413 cm⁻¹ resultiert aus der C-N Valenzschwingung. Hingegen ist das Signal für die Valenzschwingung der deprotonierten Carboxyl-Gruppe bei 1230 cm⁻¹ gänzlich aus dem Spektrum der Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP verschwunden.

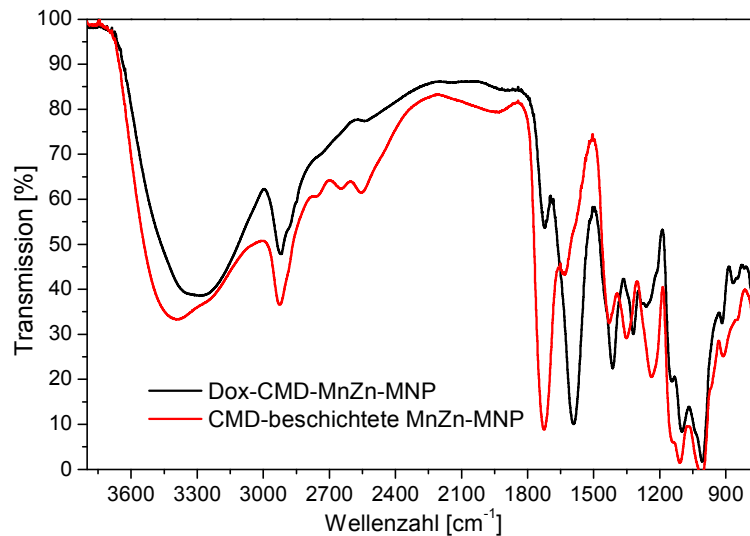


Abbildung 4.39: FT-IR-Spektren von CMD-beschichteten sowie von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP mit der intensiven N-H Deformationsschwingung bei 1590 cm^{-1} .

Die entsprechenden Raman-Spektren sind in Abbildung 4.40 veranschaulicht. In dieser Abbildung ist das Spektrum von reinen Doxorubicin dem Spektrum von CMD und dem von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, dass die meisten Schwingungen des Doxorubicins mit den Schwingungen von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP korrelieren.

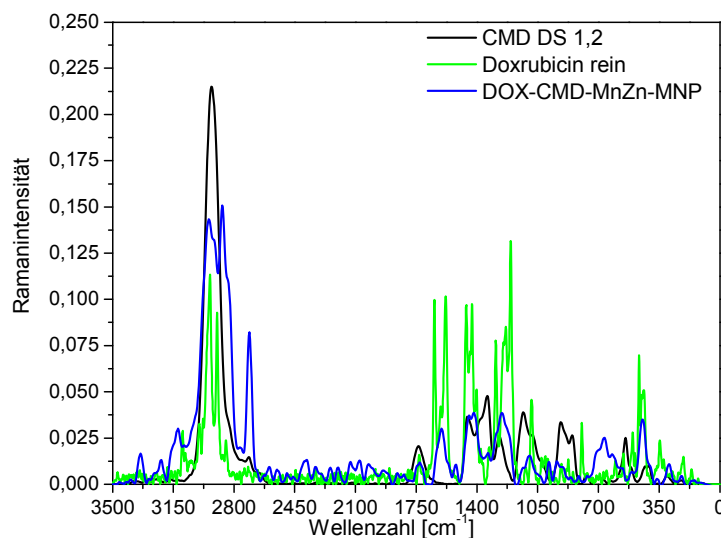


Abbildung 4.40: Raman-Spektren von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP im Vergleich zu Doxorubicin und CMD. Die C=O Valenzschwingung bei 1604 cm^{-1} und die N-H Deformationsschwingung bei 1520 cm^{-1} sind eindeutig nachweisbar.

Die C=O Valenzschwingung ist im Vergleich zur C=O Schwingung der Carboxyl-Gruppe zu tieferen Wellenzahlen verschoben und liegt bei 1604 cm^{-1} . In diesem Wellenzahlbereich liegt ebenfalls die C=C Schwingung des aromatischen Systems von Doxorubicin vor. Das Signal

bei 1520 cm^{-1} resultiert aus Deformationsschwingungen der N-H Bindung der Säure-Amid-Gruppe. Dies erklärt die Intensitätszunahme dieser Absorptionsbande. Die Valenzschwingung der C-N Bindung der Säure-Amid-Gruppe in der *cis*-Form hat eine Absorptionsbande bei 1345 cm^{-1} , die der *trans*-Form liegt bei 1260 cm^{-1} . In diesem Wellenzahlbereich erscheint ebenfalls die C-O Valenzschwingung. Die Absorptionsbande der Deformationsschwingung der Carboxyl-Gruppe bei 902 cm^{-1} , die auf Grund von Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommt, ist im Spektrum der Doxorubicin-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP zurückgegangen. Die neue Absorptionsbande, die sich bei 660 cm^{-1} ergibt, kann der out-of-plane Deformationsschwingung der Säure-Amid-Bindung zugeordnet werden. Die out-of-plane Biegeschwingung dieser Gruppe befindet sich bei einer Wellenlänge von 620 cm^{-1} . Unter Einbeziehen der dargestellten FT-IR- und Raman-Spektren kann die erfolgreiche Anbindung des Wirkstoffs an beschichteten MnZn-MNP postuliert werden.

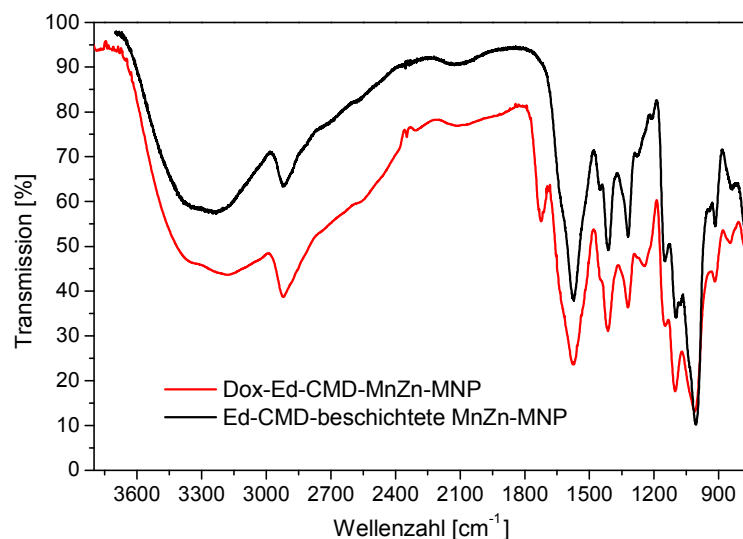


Abbildung 4.41: Vergleich der FT-IR-Spektren von Ed-CMD-beschichteten MnZn-MNP und Dox-Ed-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP.

Bei den in Abbildung 4.41 abgebildeten Spektren handelt es sich um MnZn-MNP, die mit Ed-CMD-beschichtet und anschließend mit Doxorubicin funktionalisiert sind. Auf die sich dabei ausbildende charakteristische sekundäre Amin-Bindung zwischen Wirkstoff und Dextran-Derivat wird besonderes Augenmerk gelegt. Auf Grund dessen, dass diese Schwingung schon im Spektrum des Ed-CMDs auftaucht, ist es schwierig eine Aussage über die Bindung von Doxorubicin an MnZn-MNP zu treffen. Der einzige Hinweis auf die Bindung von Doxorubicin an MnZn-MNP ist die verbreiterte Absorptionsbande zwischen den Wellenzahlen 2710 cm^{-1} und 2310 cm^{-1} . In diesem Bereich liegen die Absorptionsbanden der

protonierten Amin-Gruppen. Da die Konzentration des Wirkstoffs geringer ist, werden diese Schwingungen von den Schwingungen des Ed-CMDs überlagert.

Das charakteristische Merkmal bei der Anbindung von Doxorubicin an die Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP ist die resultierende C=N-N Bindung.

In Abbildung 4.42 ist ein entsprechendes FT-IR-Spektrum zu finden. Die symmetrische Valenzschwingung von der C=N-Gruppe hat eine Absorptionsbande bei 2340 cm^{-1} sowie bei 2190 cm^{-1} . Im Gegensatz dazu befindet sich die asymmetrische Valenzschwingung dieser funktionellen Gruppe bei der Wellenzahl 1700 cm^{-1} .

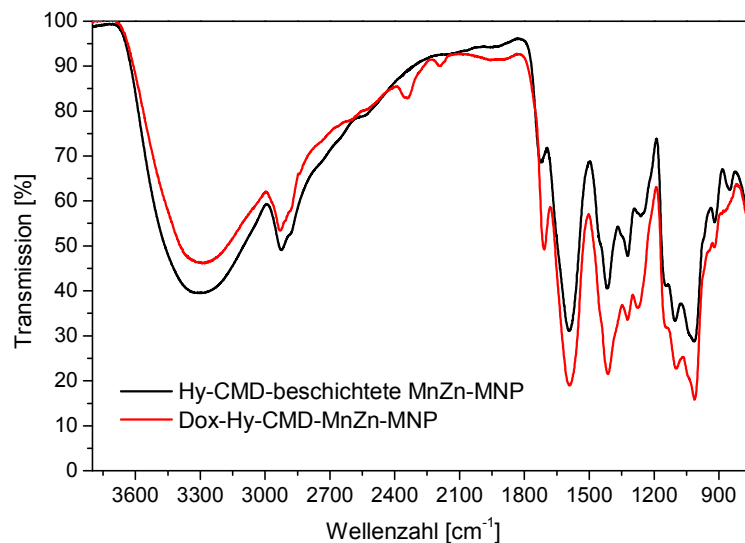


Abbildung 4.42: Darstellung von FT-IR-Spektren von Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP sowie von Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP mit den charakteristischen Absorptionsbanden.

Eine Analyse der Proben mittels Raman-Spektroskopie ist auf Grund der starken Schwarzkörper-Strahlung der MnZn-MNP nicht möglich. Durch die magnetischen MnZn-MNP kommt es zu einer zusätzlichen Absorption des Lasers und dies führt wiederum zu einer starken Erhitzung der Probe. Es war nicht möglich aussagekräftige Spektren zu erhalten. Entweder heizt sich die Probe direkt auf oder es tritt eine Überlagerung der Signale durch Absorptionsbanden des Wassers, bedingt durch die geringen Konzentrationen, auf.

Auf Grund der Fluoreszenzaktivität des Wirkstoffs besteht die Möglichkeit, die funktionalisierten Partikel mittels UV / Vis-Spektroskopie zu charakterisieren. Diese Spektren sind in Abbildung 4.44 bis 4.45 visualisiert. Abbildung 4.43 zeigt hingegen die Absorption der allein mit PAD-beschichteten MnZn-MNP. Bedingt durch die Aldehyd-Gruppe zeigen diese Nanopartikel eine Absorption im UV / Vis-Bereich mit Extinktionsmaximum bei 265 nm. Des Weiteren kann mit Hilfe dieser Analyseverfahren die Stabilität der Partikelsuspension untersucht werden. Dies geschieht unter Verwendung von automatisch wiederholten

Messungen. Die Anzahl der Zyklen beträgt jeweils 3 und der zeitliche Abstand zwischen jedem Zyklus beläuft sich auf 1 Stunde.

Sollten die Partikel nicht ausreichend dispergiert vorliegen, unterscheiden sich die hintereinander liegenden Messungen signifikant voneinander. Im Laufe der Zeit würden die Partikel sedimentieren und dies hätte eine Verschiebung der Grundlinie, die auf Grund der zusätzlichen Absorption und Streuung der Partikel zustande kommt, zur Folge. Im Allgemeinen macht sich diese zusätzliche Streuung und Absorption der Partikel in einem Anstieg der Intensität der Grundlinie zu niedrigeren Wellenlängen hin bemerkbar. Je mehr Partikel in der Lösung sind, desto stärker ist diese Verschiebung zu sehen.

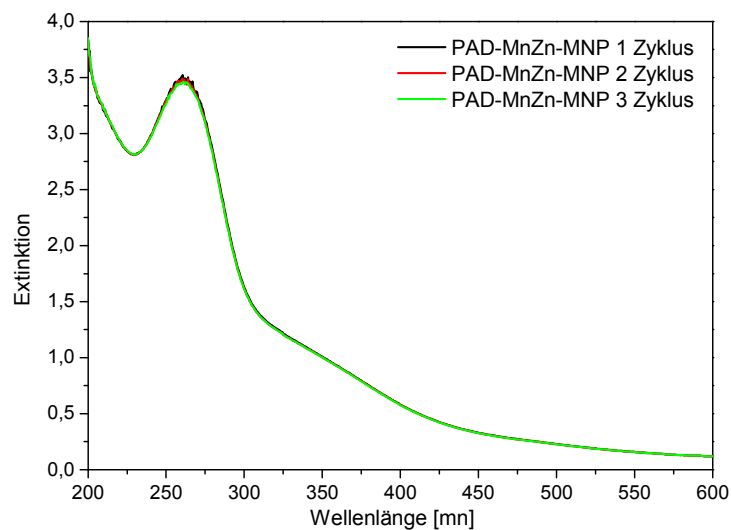


Abbildung 4.43: UV / Vis-Spektrum von PAD-beschichteten MnZn-MNP mit Extinktionsmaximum bei 265 nm.

In Abbildung 4.44 sowie in Abbildung 4.45 sind entsprechende UV / Vis-Spektren der mit Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP aufgeführt. In jedem Spektrum ist die charakteristische Wellenlänge des Doxorubicins zu erkennen. Sie liegt bei $\lambda = 475$ nm und setzt sich additiv aus den einzelnen chromophoren Gruppen des Doxorubicins zusammen. Es handelt sich dabei um einen $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang. Weitere Extinktionspeaks liegen bei 230 nm, 254 nm und 300 nm. Bei diesen Extinktionsmaxima handelt es sich um $n \rightarrow \pi^*$ -Elektronenübergänge.

4. BIOMEDIZINISCH FUNKTIONALISIERTE NANOPARTIKEL

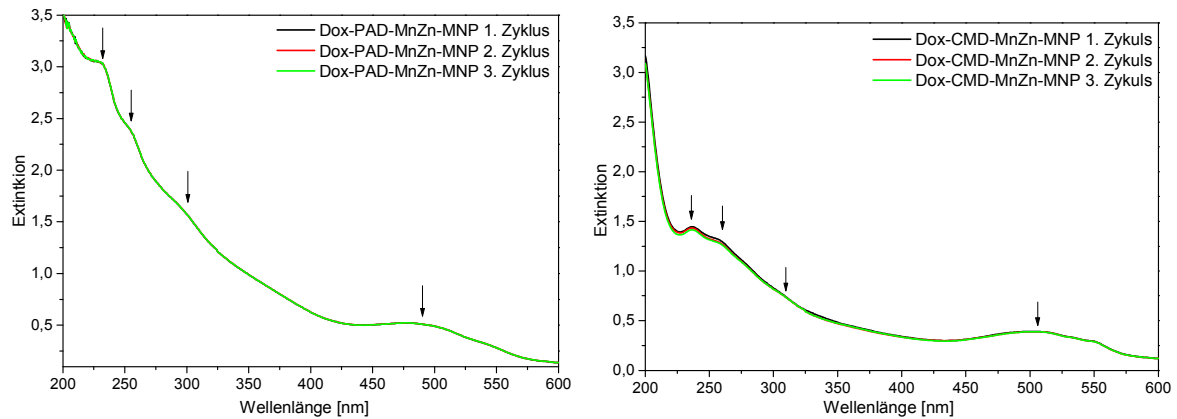


Abbildung 4.44: links: UV / Vis-Spektrum von Doxorubicin-funktionalisierten-PAD-beschichteten MnZn-MNP, rechts: UV / Vis-Spektrum von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP.

Die charakteristischen Extinktionsmaxima des Doxorubicins sind eindeutig nachweisbar (markiert durch Pfeile).

Allerdings ist in UV / Vis-Spektren von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP eine Verschiebung des Extinktionspeaks zu höheren Wellenzahlen hin zu beobachten. Die Ursache dafür liegt in der gebildeten Säure-Amid-Bindung, die ebenfalls chromophore Gruppe darstellt. Der Absorptionspeak liegt somit bei 500 nm.

Alle Zyklen-Messungen der funktionalisierten Partikel zeigen, dass es sich um stabile dispergierte Suspensionen handelt. Die nacheinander aufgenommenen Spektren weichen kaum voneinander ab, wie es für instabile Partikellösungen der Fall wäre.

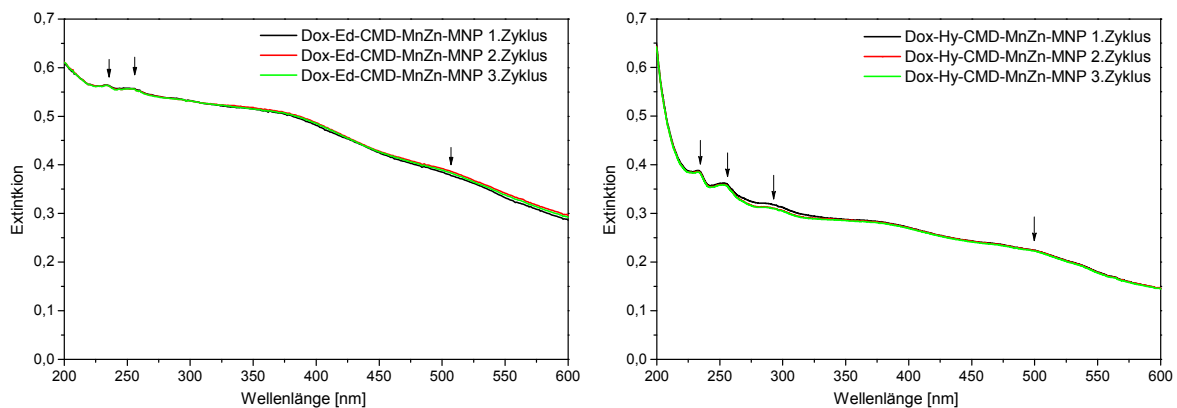


Abbildung 4.45: links: Graphische Darstellung der UV / Vis-Charakterisierung von Dox-Ed-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP, rechts: UV / Vis-Spektrum der mit Doxorubicin-funktionalisierten Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP. Alle Spektren weisen die charakteristischen Maxima von Doxorubicin auf (markiert durch Pfeile).

Die Konzentration an Doxorubicin in der Partikelsuspension kann, auf Grund der Verschiebung der Grundlinie, nicht genau bestimmt werden. Deshalb erfolgt die Bestimmung der Konzentration von Doxorubicin anhand des Dialysewassers. Die Dialyse erfolgt solange,

bis im UV / Vis-Spektrum keine Absorptionsbande des Doxorubicins mehr zu verzeichnen ist. Auf Basis dessen kann davon ausgegangen werden, dass sich kein freies Doxorubicin mehr in der Lösung befindet. Somit kann die Konzentration des Dialysewassers von der eingesetzten Konzentration des Doxorubicins abgezogen werden, um so einen Rückschluss auf die Konzentration an Doxorubicin auf den Partikeln zu erhalten.

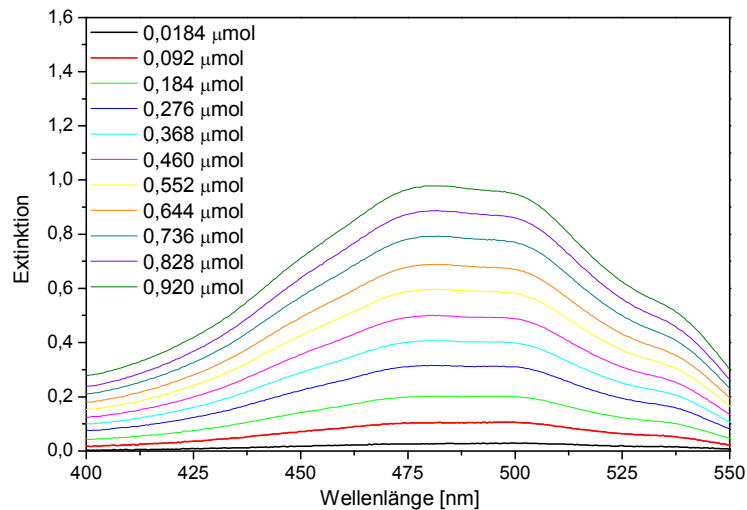


Abbildung 4.46: Aufnahme der UV / Vis-Spektren von verschiedenen Doxorubicin Konzentrationen.

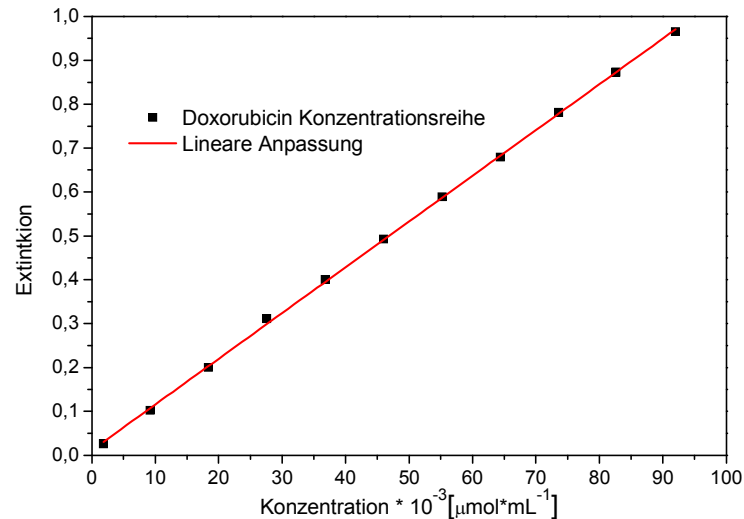


Abbildung 4.47: Graphische Darstellung der Konzentrationsreihe des Doxorubicins.

Ausgehend von einer Stammlösung der Konzentration $1,84 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ werden entsprechende Verdünnungen angesetzt, die mittels UV / Vis-Spektroskopie charakterisiert werden (siehe Abbildung 4.46). Dabei wird jede Lösung dreifach bestimmt. Anschließend wird der Mittelwert der Extinktion bei 475 nm gebildet und gegen die Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes kann aus der linearen Anpassung die Konzentration von Doxorubicin im Dialysewasser bestimmt werden. In Tabelle 4.6 sind

die Konzentrationen der verschiedenen Dialysewässer sowie die daraus berechnete Endkonzentration an Doxorubicin aufgeführt.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Konzentrationen an Doxorubicin in den verschiedenen Lösungen.

funktionalisierte Nanopartikel	Eingesetzte Konzentration an Dox [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Konzentration im Dialysewasser [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Konzentration an gebundenem Dox [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]
Dox-PAD-MnZn-MNP	1,84	1,227	0,613
Dox-CMD-MnZn-MNP	1,84	0	1,84
Dox-Ed-CMD-MnZn-MNP	1,84	0,494	1,349
Dox-Hy-CMD-MnZn-MNP	1,84	0,247	1,593

In Abbildung 4.48 sind dazugehörige Extinktions- und Emissionsspektren der funktionalisierten MnZn-MNP wiedergegeben. Das Extinktions- sowie das Emissionsmaximum von ungebundenem Doxorubicin liegt bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 470 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$. Alle mit Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP weisen sowohl das Extinktions- sowie das Emissionsmaximum von Doxorubicin auf.

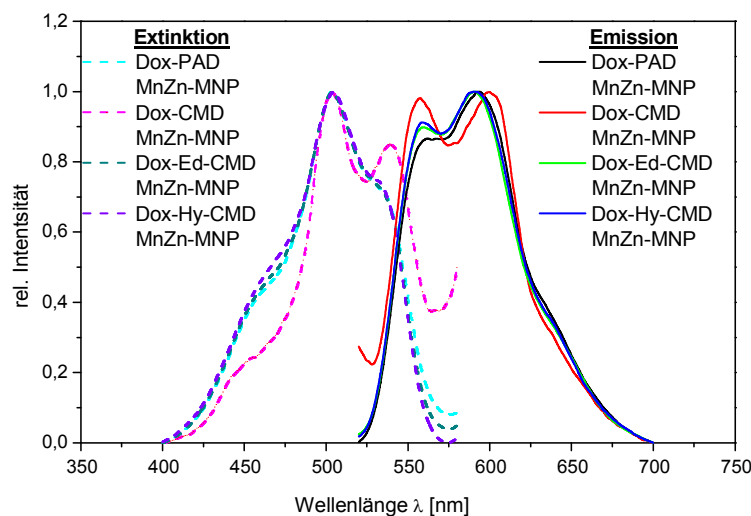


Abbildung 4.48: Vergleich der charakteristischen Extinktions- und Emissionsspektren der verschiedenen mit Doxorubicin-beladenen MnZn-MNP.

Allerdings kommt es, bedingt durch die Anbindung des Doxorubicins an die beschichteten MnZn-MNP, zu einer Verschiebung des Spektrums zu höheren Wellenlängen. Diese Verschiebung ist vor allem bei der Bindung des Doxorubicins an die CMD-beschichteten MnZn-MNP zu sehen. Hier liegt die maximale Extinktion bei einer Wellenlänge von 500 nm und die maximale Emission bei 600 nm. Grund hierfür ist die gebildete Säure-Amid-Bindung, die durch die Funktionalisierung der CMD-beschichteten MnZn-MNP mit Doxorubicin

entsteht. Durch die einzelnen Reinigungsschritte kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den aufgenommenen Spektren um auf die Partikel gebundenes Doxorubicin handelt. Durch Messung des Zetapotentials lässt sich ebenfalls eine Aussage über die Beschichtung der MnZn-MNP treffen. Hierzu erfolgt eine 5-fache Bestimmung mit anschließender arithmetischer Mittlung. In Tabelle 4.7 sind die ermittelten Zetapotentiale sowie die dazugehörigen isoelektrischen Punkte der funktionalisierten MnZn-MNP zusammengefasst. Citrat-stabilisierte MnZn-MNP weisen im Allgemeinen ein negatives Potential auf, welches bei -49,0 mV liegt. Durch Beschichtung mit den verschiedenen Dextran-Derivaten kommt es zu einer Änderung dieses ursprünglichen Potentials. So zeigen die PAD-beschichteten MnZn-MNP, auf Grund des positiv geladenen Charakters von PAD, nur noch ein Potential von -7,3 mV. Hingegen fällt das Potential bei CMD-beschichteten MnZn-MNP auf -53,0 mV ab. Das Zetapotential von Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP steigt wiederum auf -41,1 mV an. Bei den Partikeln, die mit Ed-CMD-beschichtet sind, ist keine signifikante Veränderung des Potentials zu beobachten. Dieses liegt bei -49,1 mV. Ursache hierfür könnte Ladungskompensation sein, wodurch es nach außen hin zu keiner Änderung des Potentials kommt. Auf Grund des positiv geladenen Charakters von Doxorubicin hat dessen Anbindung an die Partikel ebenfalls eine Potential-verändernde Wirkung. Dieser Effekt ist vor allem bei den Dox-Ed-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP am stärksten ausgeprägt. Hier erreicht das Potential einen Wert von -12,7 mV. Bei den Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP hingegen ist ein Wechsel von einem negativen zu einem positiven Potential zu sehen. Der Wert liegt bei +2,3 mV. Das Potential der Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP steigt auf -34,6 mV an und das der Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP auf -38,0 mV.

Tabelle 4.7: Tabellarische Zusammenfassung der ermittelten Zetapotentiale sowie der dazugehörigen isoelektrischen Punkte der Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP.

funktionalisierte Nanopartikel	Zetapotential [mV]	isoelektrischer Punkt [pH-Wert]
PAD-MnZn-MNP	-7,3 ± 6,3	
Dox-PAD-MnZn-MNP	+2,3 ± 6,4	4,82
CMD-MnZn-MNP	-53,0 ± 0,2	
Dox-CMD-MnZn-MNP	-38,0 ± 3,3	2,42
Ed-CMD-MnZn-MNP	-49,1 ± 9,9	
Dox-Ed-CMD-MnZn-MNP	-12,7 ± 3,0	5,24
Hy-CMD-MnZn-MNP	-41,1 ± 0,7	
Dox-Hy-CMD-MnZn-MNP	-34,6 ± 1,0	3,06

Um die Stabilität beim physiologischen pH-Wert (pH-Wert des Blutes $\sim 7,4$) zu gewährleisten, müssen die funktionalisierten Partikel bei einem pH-Wert von 7 ein negatives Potential aufweisen. Dadurch kann die Agglomeration der Nanopartikel vermieden und die Emboliegefahr unterbunden werden.

Alle vier Messungen (vgl. Abbildung 4.49) zeigen, dass die mit Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP beim physiologischen pH-Wert ein negativ geladenes Zetapotential besitzen. Der isoelektrische Punkt von Doxorubicin-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP liegt bei einem pH-Wert von 2,42 und der der Doxorubicin-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP bei $\text{pH} = 4,82$. Die mit Dox-Ed-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP weisen einen isoelektrischen Punkt bei $\text{pH} = 5,24$ auf und die Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP einen bei $\text{pH} = 3,06$. Der isoelektrische Punkt liegt demnach bei allen funktionalisierten Partikeln in dem für medizinische Anwendungen optimalen Bereich.

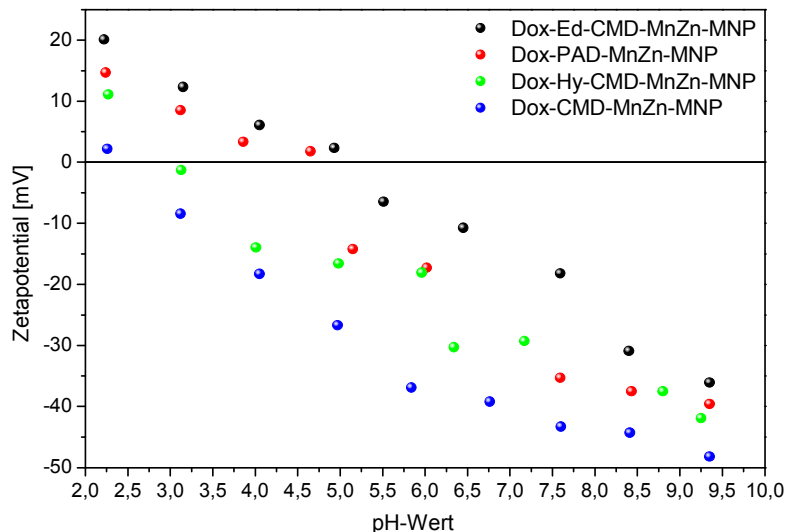


Abbildung 4.49: Bestimmung des isoelektrischen Punkts von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP. Alle funktionalisierten MnZn-MNP weisen einen Punkt unter dem physiologischen pH-Wert des Blutes auf.

Die Morphologie der Partikel wird unter Verwendung der Transmissionselektronen-Mikroskopie analysiert. Die nachfolgenden Abbildungen (vgl. Abbildung 4.50 bis Abbildung 4.54) zeigen die unterschiedlich beschichteten und funktionalisierten MnZn-MNP. TEM-Aufnahmen von MnZn-MNP, die mit den verschiedenen Dextran-Derivaten beschichtet sind, befinden sich im Anhang in Kapitel 9.5.1. Zusätzlich zu den TEM-Aufnahmen werden XRD-Messungen der mit Dextran-Derivat-beschichteten MnZn-MNP angefertigt. Diese zeigen ebenfalls, dass sich die Kristallinität der MnZn-MNP durch die Beschichtungsschritte nicht ändert. Abbildung 4.50 zeigt TEM-Aufnahmen von Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP. Anhand dieser Aufnahmen ist ersichtlich, dass es sich um Partikel mit einer geringen Größenverteilung handelt. Des Weiteren zeigen diese

Partikel keine Anzeichen von Agglomeration. Die leichte Trübung ist auf das Dextran-Derivat zurückzuführen.

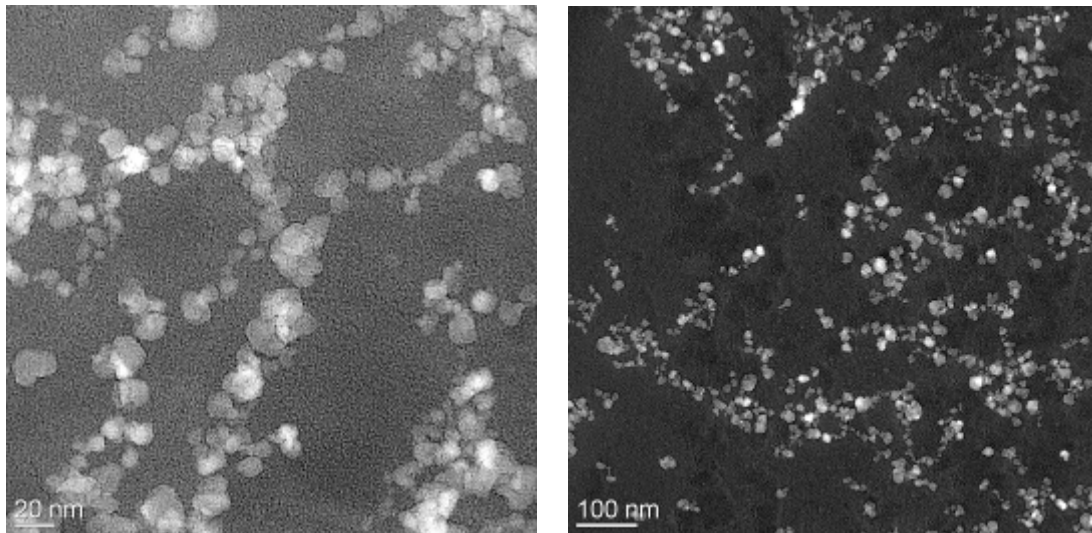


Abbildung 4.50: TEM-Aufnahmen von Doxorubicin-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP weisen eine enge Größenverteilung mit einem geringen Aggregationsgrad auf.

In Abbildung 4.51 sind verschiedene TEM-Aufnahmen der Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP dargestellt. Auch hier liegt die Größenverteilung in einem angemessenen Rahmen. Es ist eine geringe Agglomeratbildung zu erkennen, die jedoch nicht ins Gewicht fällt.

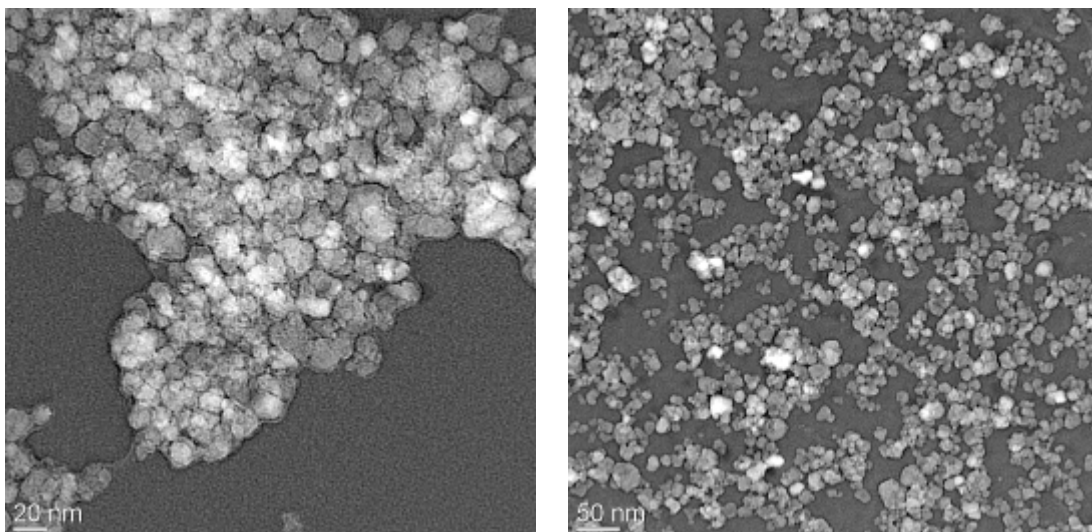


Abbildung 4.51: Verschiedene TEM-Aufnahmen von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP. Die Nanopartikel zeigen eine relativ enge Größenverteilung.

Die in Abbildung 4.52 visualisierten TEM-Aufnahmen zeigen die MnZn-MNP, welche mit Dox-Hy-CMD-funktionalisiert sind. Diese Nanopartikel weisen eine einheitliche Größenverteilung auf, neigen jedoch zur leichten Agglomeratenbildung.

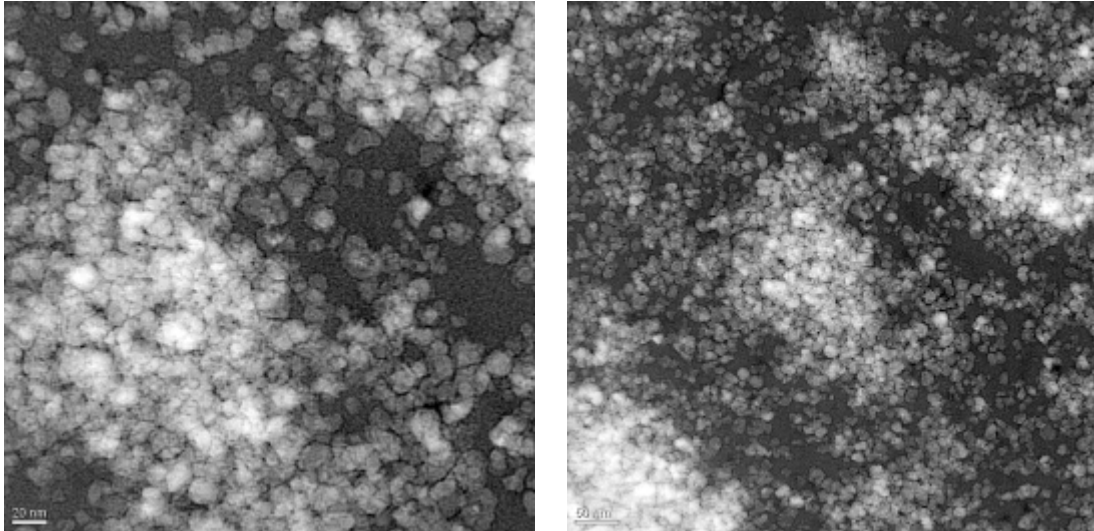


Abbildung 4.52: TEM-Aufnahmen von Doxorubicin-funktionalisierten Hy-CMD-beschichteten MnZn-MNP zeigen einen leicht erhöhten Aggregationsgrad.

Hingegen liegen die Dox-Ed-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP in Abbildung 4.53 zwar polydispers vor, aber die Agglomeratbildung ist sehr gering.

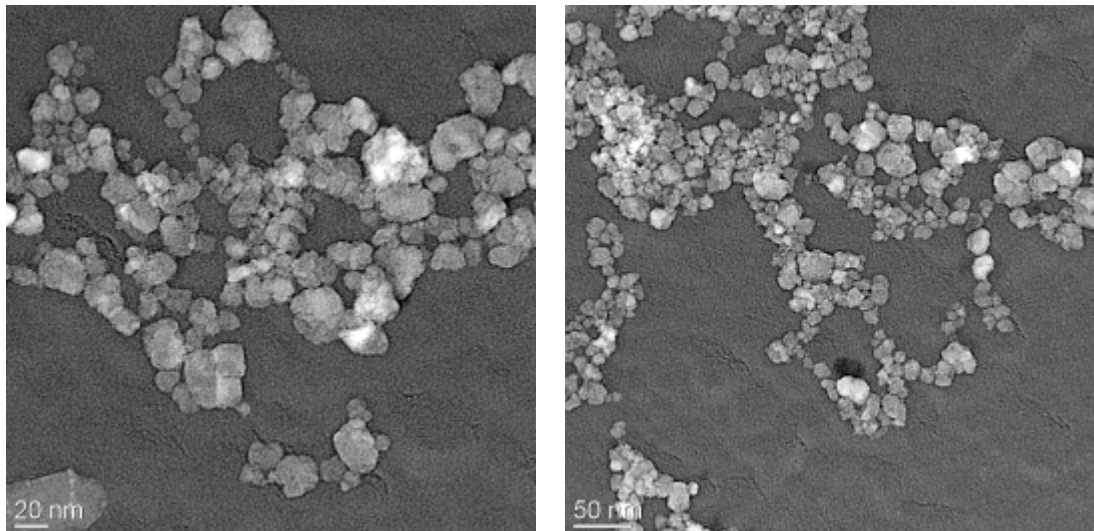


Abbildung 4.53: Verschiedene TEM-Aufnahmen von Dox-Ed-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP mit einer relativ guten Größenverteilung und einem geringen Aggregationsgrad.

Da im Allgemeinen TEM-Aufnahmen nur einen Bruchteil der Beschaffenheit von Nanopartikeln erfassen können, soll noch auf eine Besonderheit hingewiesen werden. In Abbildung 4.54 sind TEM-Aufnahmen von CMD-beschichteten MnZn-MNP dargestellt. Auf

diesen ist die Struktur des Polysaccharids eindeutig zu erkennen. Des Weiteren sind die Partikel in das Dextran-Netzwerk eingebaut und liegen in diesem gut dispergiert vor. Dieses Dextran-Gefüge kann die Erklärung für die Stabilität der Partikellösung über einen längeren Zeitraum sein, da es zu keiner starken Agglomeration der Partikel kommen kann.

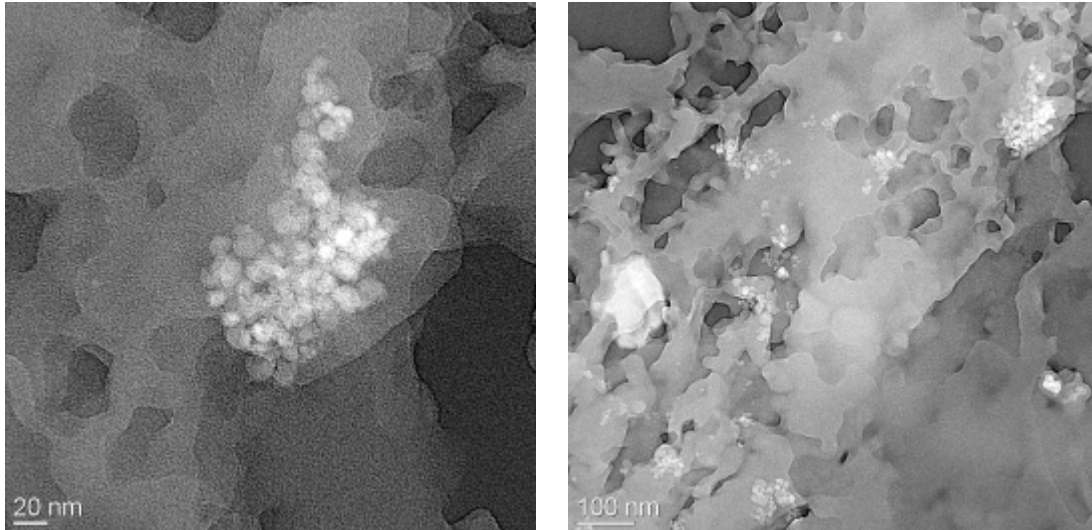


Abbildung 4.54: TEM-Aufnahmen von CMD-beschichteten MnZn-MNP, zeigen die netzartige Struktur des Dextrans auf, indem die beschichteten Partikel gut dispergiert vorliegen.

4.3.2 ANALYSE DER PH-ABHÄNGIGEN SPALTUNG DER HYDRAZON-BINDUNG

Um die Spaltung der Hydrazon-Bindung der Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP zu untersuchen, wird das Verhalten der Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP in Abhängigkeit des pH-Werts untersucht. Die Spaltung der Hydrazon-Bindung hat die Freisetzung des Wirkstoffmoleküls zur Folge und somit einen entscheidenden Einfluss auf die Anwendbarkeit als Drug-Delivery System.

Dazu wird der pH-Wert einerseits mittels Phosphat-Buffer-Saline (PBS) auf 7,4 erhöht und andererseits durch Zugabe von PBS, welcher vorher mit 0,1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt wurde, auf 5 erniedrigt. Anschließend wird der Überstand der leicht sauren Suspension nach 1, 2, 4, 6 und 10 Stunden mittels UV / Vis-Spektroskopie untersucht. Ein Ergebnis der spektroskopischen Untersuchungen ist in Abbildung 4.55 dargestellt. Die Bestimmung an Doxorubicinkonzentration erfolgt unter Zuhilfenahme des Lambert-Beer'schen-Gesetzes und anschließender linearen Anpassung.

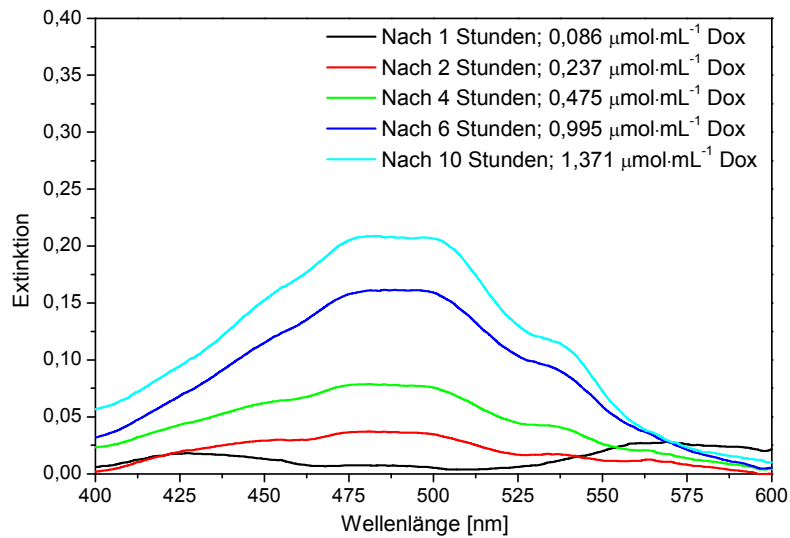


Abbildung 4.55: UV / Vis-Spektren des Überstands nach pH-Wert-Einstellung im zeitlichen Verlauf von 10 Stunden. Anhand der Extinktionsmaxima ist eine Zunahme der Doxorubicinkonzentration im zeitlichen Verlauf von 10 Stunden zu sehen.

Nach 1 Stunde ist die Abgabe an Doxorubicin noch sehr gering, jedoch erhöht sich die Konzentration im Laufe der Zeit stetig, bis nach 10 Stunden kein weiterer Anstieg in der Konzentration zu verzeichnen ist. Die Auftragung der Konzentration gegen die Zeit ist in Abbildung 4.56 wiedergegeben. Hingegen zeigen die Dox-Hy-CMD-Partikelsuspensionen bei pH 7,4 eine sehr gute Stabilität. Erst nach 24 Stunden lassen sich die Partikel magnetisch trennen (siehe Abbildung 4.57). In dem Überstand ist keine messbare Konzentration an Doxorubicin vorhanden gewesen.

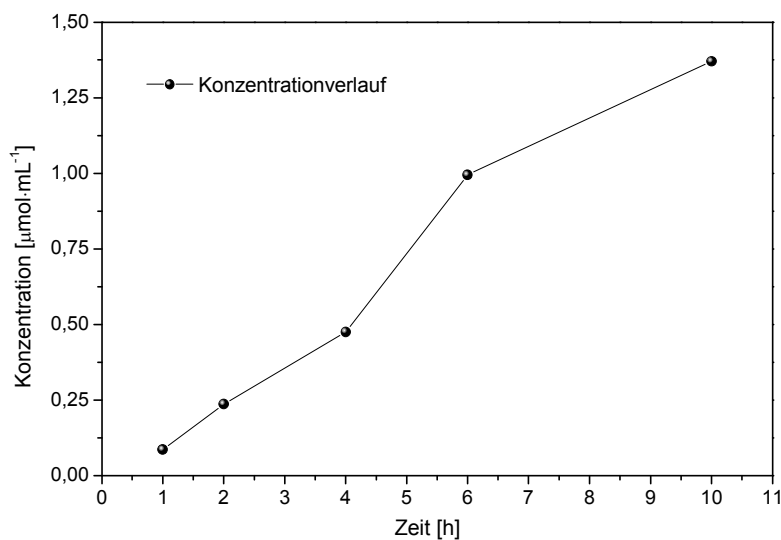


Abbildung 4.56: Darstellung der Zunahme der Doxorubicinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit.

In Abbildung 4.57 sind die Dox-Hy-CMD-funktionalisierte MnZn-MNP bei einem pH-Wert von 5 und 7,4 bildlich dargestellt. Das Bild ganz links zeigt beiden Suspensionen zu Beginn der Untersuchung und ohne Anwesenheit eines äußeren Magnetfeldes. Es handelt sich bei beiden um stabile Partikeldispersion. Das Bild in der Mitte zeigt beiden Dispersionen unter Einfluss eines Magnetfeldes nach 10 Stunden. Die Rotverfärbung des Suspensionsüberstands ist auf die Anwesenheit von ungebundenem Doxorubicin zurückzuführen. Die Partikeldispersion bei pH 7,4 zeigt die gleiche Stabilität wie zu Messbeginn. Allerdings setzt Sedimentation ein, welche durch leichten Nanopartikel-Bodensatz zu erkennen ist. Das rechte Bild zeigt die beiden Partikelsuspensionen nach 24 Stunden. Nach dieser Zeit lässt sich ebenfalls die Suspension mit pH = 7,4 magnetisch trennen. Das Ausbleiben der Rotverfärbung des Überstands dieser Suspension macht eine Abspaltung von Doxorubicin von der Partikeloberfläche unwahrscheinlich. Durch UV / Vis-Spektroskopie wird dieses Ergebnis bestätigt. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die Partikelsuspension bei einem pH-Wert von 7,4 über einen langen Zeitraum sehr stabil ist und es zu keiner Abspaltung von Doxorubicin über einen Zeitraum von 24 Stunden kommt. Hingegen erfolgt eine signifikante Abspaltung von Doxorubicin bei der Dispersion mit dem erniedrigten pH-Wert innerhalb von 10 Stunden.

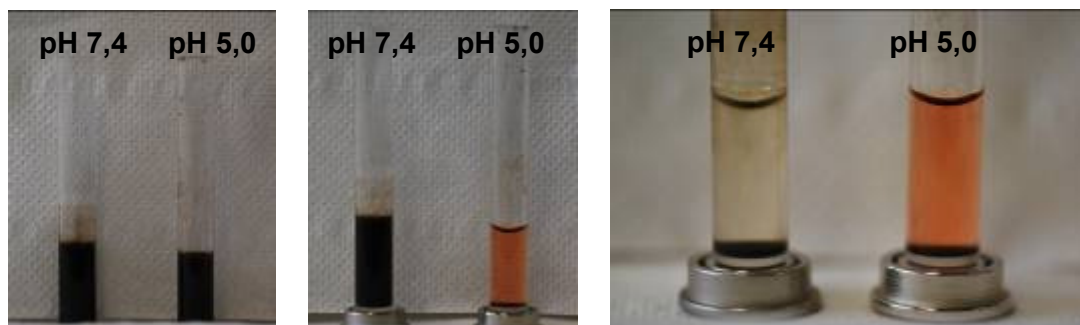


Abbildung 4.57: Bildliche Darstellung der Untersuchung zur Spaltung der Hydrazon-Bindung von Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP. links: Partikelsuspensionen zu Untersuchungsbeginn, Mitte: Partikelsuspensionen nach 10 Stunden, eine Rotverfärbung der rechten Suspension ist zu erkennen, Rechts: Partikelsuspensionen nach 24 Stunden. Die rote Färbung der rechten Lösung ist zu erkennen, wohingegen die linke Suspension keine Färbung aufweist.

4.3.3 CHARAKTERISIERUNG DOXORUBICIN-FUNKTIONALISierter NANOPARTIKEL MITTELS FLUORESZENZ-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (FCS)

Mit Hilfe der FCS können Fluktuationen der Fluoreszenzintensität untersucht werden, die entstehen, sobald fluoreszierende Partikel in oder aus einem Beobachtungsvolumen, typischerweise in der Größenordnung eines Femtoliters, diffundieren. Anhand dieser Fluktuationen können die Diffusionskoeffizienten dieser Partikel ermittelt werden. Wie lange die Partikel im Beobachtungsvolumen verweilen, wird sowohl von deren Größe als auch vom Diffusionskoeffizienten der fluoreszierenden Partikel beeinflusst (siehe Gleichung (3-14)). Der Diffusionskoeffizient hängt seinerseits von der Partikelgröße ab, wie der nachfolgende Zusammenhang zeigt:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_{Hydro}} \quad (4-4)$$

Bindet ein Fluoreszenzfarbstoff, der eine für ihn typische Diffusionszeit aufweist, beispielsweise an beschichtete Partikel, kommt es zu einer Größenänderung und somit zu einer Verlangsamung der Diffusionsgeschwindigkeit des Farbstoffs. So ist es möglich anhand dieser Änderung der Diffusionszeit zwischen freien und gebundenen Farbstoffen zu unterscheiden.

Im Falle der mit Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP ist somit mit einer deutlich verlangsamten Diffusionsgeschwindigkeit des Doxorubicins zu rechnen (siehe Abbildung 3.5). Die genaue Theorie kann in Kapitel 3.2 nachgelesen werden.

Die erhaltenen Messwerte werden mittels folgender Korrelationsfunktion angepasst:

$$G(\tau) = A + \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \quad (4-5)$$

Wobei N die mittlere Anzahl fluoreszierender Teilchen im effektiven Detektionsvolumen darstellt und A eine Konstante ≈ 1 , da sich bei langer Verschiebungszeit τ , die Fluktuationen der Anregungsleistung gegenseitig herausmitteln.

Abbildung 4.58 zeigt die Korrelationsfunktion am Beispiel von Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP. Die Zeitskala folgt einer logarithmischen Darstellung. Alle durchgeführten FCS-Messungen sind in analoger Weise angepasst.

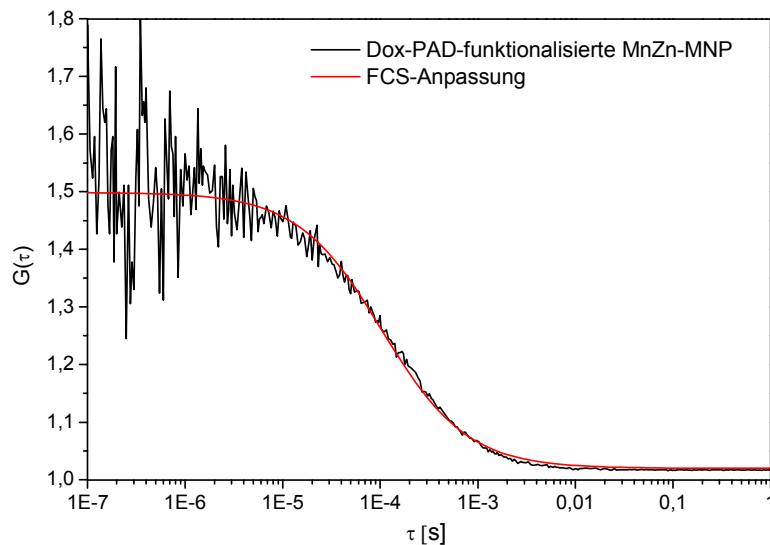


Abbildung 4.58: Darstellung der Korrelationsfunktions-Anpassung der Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP mit einer berechneten τ_D von 104 μs .

Die FCS-Messungen von freiem Doxorubicin ergeben eine Diffusionszeit von 54 μs . Die Ergebnisse der FCS-Analysen von Dox-PAD-, Dox-CMD-, Dox-Ed-CMD- und Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP finden sich in Abbildung 4.59 und zusammengefasst in Tabelle 4.8 wieder.

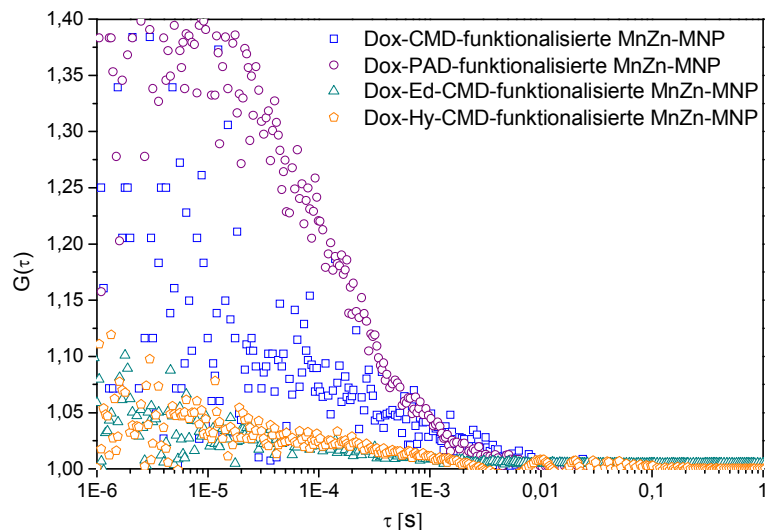


Abbildung 4.59: Darstellung der FCS-Messergebnisse von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP.

Anhand der ermittelten Diffusionszeiten lassen sich nur bedingt Aussagen über die Bindung der Doxorubicin-Dextran-Derivat-funktionalisierten MnZn-MNP treffen.

Die Diffusionszeiten von Dox-CMD- und Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP liegen in einem Bereich, der ca. das 10-fache der Diffusionszeit von freiem Doxorubicin darstellt.

Allerdings liegen die ermittelten Durchmesser (siehe Tabelle 4.8) für die Doxorubicin-Dextran-Derivat-funktionalisierten MnZn-MNP weit unter denen, die mit XRD oder TEM ($\sim 160 \text{ \AA}$) ermittelt wurden. Bei Doxorubicin kommt noch der Effekt des Photobleichens hinzu, der durch den Laserstrahl hervorgerufen wird und zur Zerstörung des Wirkstoffs führt. Dies könnte die Erklärung für die schnelle Diffusionszeit von $54 \mu\text{s}$ sein, im Vergleich dazu liegt die Diffusionszeit von FITC bei $225 \mu\text{s}$. Da die Messungen weder mit einer thermostatisierten Apparatur noch am selbigen Tag durchgeführt werden konnten, kann es zu Schwankungen der Diffusionszeiten kommen. Die Diffusionszeit hängt stark von der Temperatur ab, d. h. je höher die Temperatur ist, desto schneller ist die Diffusion. Zwischen Dox-PAD-, Dox-Ed-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP und Doxorubicin weichen die Diffusionszeiten kaum voneinander ab.

Tabelle 4.8: Zusammenfassung der ermittelten Diffusionszeiten von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP und von ungebundenem Doxorubicin.

funktionalisierte Nanopartikel	Diffusionszeit τ_D [μs]	abgeschätzte Größe [\AA]
Dox-CMD-MnZn-MNP	504	35,09
Dox-PAD-MnZn-MNP	104	7,24
Dox-Ed-CMD-MnZn-MNP	180	12,53
Dox-Hy-CMD-MnZn-MNP	478	33,28
Doxorubicin rein	54	3,76

Anhand der bestimmten Diffusionszeiten und der ermittelten Größen der funktionalisierten MnZn-MNP ist erkennbar, dass es sich nicht um an die Partikel gebundenes Doxorubicin handelt, sondern an Dextran-Derivat gebundenes Doxorubicin. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Proben vor den Messungen im Verhältnis 1:100 mit Wasser verdünnt werden. Dadurch stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein, das eine verstärkte Wechselwirkung zwischen Doxorubicin-funktionalisierten Dextran-Derivat und dem Suspensionsmedium Wasser bewirkt. Es kommt zu einer Vergrößerung des Abstands zwischen Doxorubicin und den magnetischen Partikeln, der auf einer möglichen Quellung des Dextran-Derivates beruht. Dies hat zur Folge, dass der Abstand zwischen Doxorubicin und MnZn-MNP variiert.

Des Weiteren konnte durch TEM-Aufnahmen (siehe Abbildung 4.54) gezeigt werden, dass die MnZn-MNP in der Dextran-Matrix gebunden vorliegen. Somit kann es sich bei ermittelten Diffusionszeiten um Doxorubicin handeln, welches an Dextran gebunden ist, aber sich auf Grund der verzweigten Struktur des Dextrans nicht an die Partikel gebundene vorliegt. Die gemachten Beobachtungen können nichtsdestotrotz nicht als absolutes Ausschlusskriterium

der Doxorubicin-Anbindung an die Partikel interpretiert werden. Die Fluoreszenz von an die Partikel gebundenem Doxorubicin wird aller Wahrscheinlichkeit nach von der dominanten Doxorubicin Fluoreszenz, welches gebunden an die Dextran-Derivate vorliegt, überdeckt.

Eine mögliche Erklärung hierfür kann ein resonanter Energietransfer (FRET: Förster-ResonanzEnergieTransfer) sein. Dieser Transfer beschreibt die strahlungslose Energieabgabe eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffes (Donor) auf ein zweites, zunächst im elektronischen Grundzustand befindliches, System (Akzeptor). Dabei spielt der Abstand zwischen Donor und Akzeptor eine entscheidende Rolle. Je kleiner der Abstand zwischen Akzeptor und Donor ist, desto intensiver ist der Energietransfer. Der Abstandsbereich, in dem FRET auftritt, liegt zwischen 1 nm und 10 nm. Die Effizienz des Energietransfers k_{FRET} kann durch nachfolgende Gleichung beschrieben werden:^[150]

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0^6}{r^6} \right). \quad (4-6)$$

R_0 ist der Förster-Radius, der den Abstand zwischen zwei FRET-Systemen angibt, bei dem 50 % der Fluoreszenz des Donors gelöscht wird, r beschreibt den Abstand zwischen Donor und Akzeptor.^[173] Der Förster-Radius selbst ist durch Gleichung (4-7) definiert:

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot \ln(10) \cdot \kappa^2 \cdot Q_D}{128 \cdot \pi^5 \cdot N_A \cdot n^4} \cdot J(\lambda). \quad (4-7)$$

κ bezeichnet die relative Orientierung der Dipolmomente von Akzeptor und Donor, N_A die Avogadrozahl, n den Brechungsindex des Suspensionsmediums, in diesem Fall von Wasser und Q_D die Quantenausbeute vom Donor ohne den Akzeptor. $J(\lambda)$ gibt das spektrale Überlappungsintegral vom Extinktionsspektrum des Akzeptors (A) und des Emissionsspektrums vom Donor (D) wieder, welches ebenfalls eine weitere Voraussetzung für FRET darstellt und durch folgende Gleichung definiert ist:^[173]

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda. \quad (4-8)$$

Hierbei beschreibt $F_D(\lambda)$ das auf die Fläche normierte Emissionsspektrum und $\varepsilon_A(\lambda)$ den Extinktionskoeffizienten. Im Unterschied zur Theorie entsteht bei den untersuchten Systemen der resonante Energietransfer nicht zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffe, sondern zwischen magnetischen Nanopartikel (Akzeptor) und Doxorubicin (Donor).

Durch die auftretende Absorption der MnZn-MNP über einen weiten Spektralbereich ist die Überlappung mit dem Emissionsspektrum von Doxorubicin gegeben. Der variierende Faktor ist der Abstand zwischen Doxorubicin und den magnetischen Nanopartikeln, der wiederum

durch das Dextran-Derivat bestimmt wird. Ist der Abstand zwischen Doxorubicin und den MnZn-MNP kleiner als 10 nm tritt dieser Effekt auf und es kommt zur Fluoreszenzlöschung, wodurch eine Messung von Diffusionszeiten unmöglich wird.

Dadurch, dass die zu untersuchenden Proben in keiner thermostatisierten Umgebung durchgeführt werden, kann es auf Grund der Erwärmung der magnetischen Partikel und damit der Probe durch den Laser zu einer erhöhten, den realen Messwerten verfälschenden, Diffusion kommen.

4.3.4 LANGZEITSTUDIE ZUR ÜBERPRÜFUNG DER STABILITÄT VON (UN)-BESCHICHTETEN MANGAN-ZINK-MNP-SUSPENSIONEN

Um die Stabilität von MnZn-MNP-Suspensionen zu untersuchen, werden mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung über einen Zeitraum von 6 Monaten von einer Citrat-stabilisierten MnZn-MNP-Suspensionen Größenverteilungskurven aufgenommen. Anhand dieser Kurven lassen sich Rückschlüsse auf die Stabilität der entsprechenden MnZn-Ferrofluide ziehen.

Es werden zu Beginn ($t = 0$), nach 1 Woche, nach 2 Wochen, nach 3 Wochen sowie nach 3 Monaten und 6 Monaten die entsprechenden Größenverteilungskurven aufgenommen und durch Anpassung mit einer Log-Normal-Verteilung der hydrodynamische Durchmesser bestimmt. Diese Verteilungskurven sind in Abbildung 4.60 zusammengefasst. Der pH-Wert des verwendeten Ferrofluids liegt bei 6,94.

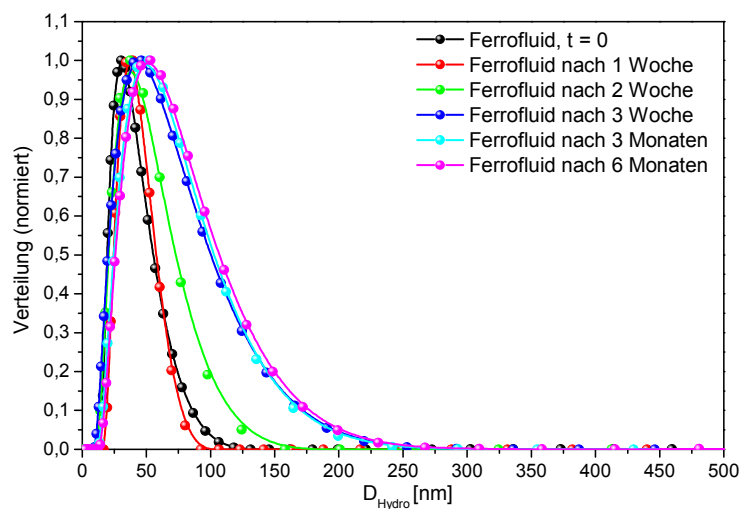


Abbildung 4.60: Graphische Darstellung der Verteilungskurven von Citrat-stabilisierten MnZn-MNP nach verschiedenen Lagerungszeiten, zeigt eine geringe Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel mit der Zeit.

In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse der aus den DLS-Messungen erhaltenen hydrodynamischen Durchmesser zusammengefasst. Anhand dieser Werte ist ersichtlich, dass im Laufe der Zeit die Agglomeration der Partikel zunimmt. Allerdings liegen die Werte in einem moderaten Bereich, wodurch die Partikel über einen längeren Zeitraum hinweg verwendet werden können.

Tabelle 4.9: Zusammenfassung der DLS-Messergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen von MnZn-Ferrofluiden.

Zeit	D_{hydro} [nm] \pm Standardfehler	σ [nm] \pm Standardfehler
Zu Beginn	39,36 \pm 0,34	1,54 \pm 0,01
Nach 1 Woche	42,13 \pm 0,20	1,40 \pm 0,005
Nach 2 Woche	49,74 \pm 0,39	1,66 \pm 0,01
Nach 3 Woche	67,61 \pm 0,74	1,90 \pm 0,013
Nach 3 Monaten	69,43 \pm 0,60	1,77 \pm 0,01
Nach 6 Monaten	72,63 \pm 0,64	1,76 \pm 0,01

Analog werden Messungen von CMD-beschichteten MnZn-MNP durchgeführt. Die Auftragung der daraus erhaltenen Größenverteilungskurven findet sich in Abbildung 4.61 und die dazugehörigen Werte des hydrodynamischen Durchmessers sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

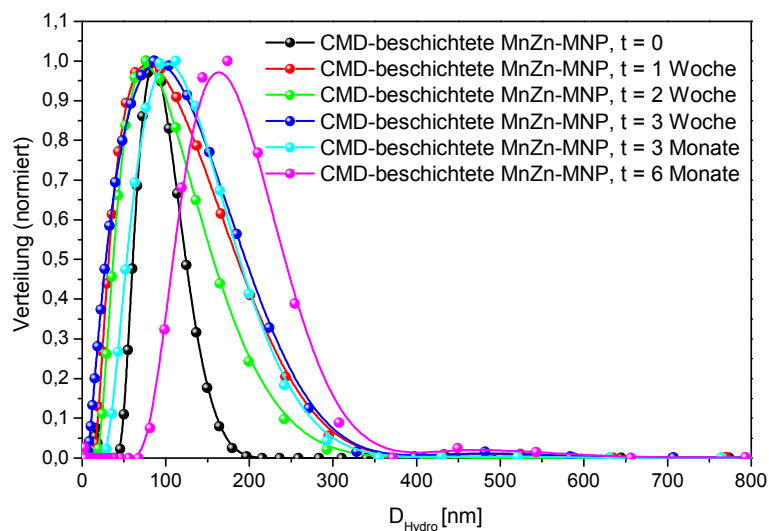


Abbildung 4.61: Darstellung einer Größenverteilungskurve von CMD-beschichteten MnZn-MNP nach verschiedenen Lagerungszeiten. Auch hier ist eine Zunahme des Durchmessers der beschichteten MnZn-MNP mit der Zeit zu verzeichnen.

Aus diesen Werten geht hervor, dass die Agglomeration der CMD-beschichteten MnZn-MNP im Laufe der Zeit zunimmt. Dementsprechend ergibt sich ein Zeitfenster für die Weiterverarbeitung der CMD-beschichteten MnZn-MNP von 2-3 Monaten. Danach sollten die Partikel wieder neu synthetisiert werden. Die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers von CMD-beschichteten MnZn-MNP liegt vermutlich in der Degradation von CMD begründet, welches eine verstärkte Agglomeration von MnZn-MNP zur Folge hat.

Tabelle 4.10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Stabilitätsmessung von CMD-beschichteten MnZn-MNP.

Zeit	D_{hydro} [nm] \pm Standardfehler	σ [nm] \pm Standardfehler
Zu Beginn	94,14 \pm 0,42	1,33 \pm 0,005
Nach 1 Woche	105,50 \pm 1,00	1,77 \pm 0,011
Nach 2 Woche	121,48 \pm 2,27	1,98 \pm 0,02
Nach 3 Woche	128,36 \pm 5,24	1,77 \pm 0,05
Nach 3 Monaten	136,97 \pm 1,65	1,65 \pm 0,009
Nach 6 Monaten	178,54 \pm 0,70	1,37 \pm 0,005

4.3.5 ABSCHLIEßENDE ZUSAMMENFASSUNG

Anhand der dargestellten Ergebnisse kann die erfolgreiche Anbindung von Doxorubicin an die verschiedenen Dextran-Derivat-beschichteten MnZn-MNP gezeigt werden. Zur Charakterisierung der funktionalisierten Nanopartikel werden unter anderem DLS, FT-IR-Spektroskopie, Zetapotentialbestimmung und TEM verwendet. Auf Grund der Autofluoreszenz des Doxorubicins kommen zusätzlich UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie zum Einsatz. Diese eingesetzten Methoden erlauben es bestimmte Schlussfolgerungen bezüglich Größenverteilung, entstandenen Bindungen zwischen Wirkstoff und beschichteten MnZn-MNP sowie über die Morphologie zu treffen. Bei den verwendeten Synthesewegen handelt es sich um Prozesse, die sehr gute reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die Konzentration an Doxorubicin selbst variiert je nach verwendetem Dextran-Derivat, obwohl immer die gleiche Ausgangskonzentration an Doxorubicin verwendet wird. So weisen Dox-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP die geringste Doxorubicinbeladung auf. Dies kann an der unvollständigen Reduktion des Imins zum Amin und am geringeren Substitutionsgrad von PAD liegen. Beide Faktoren haben einen

erheblichen Einfluss auf die Bindungsmöglichkeiten des Doxorubicins an das Derivat. Die höchste Beladung hingegen weisen die Partikel auf, die mit CMD beschichtet sind. Bei diesen Partikeln kann im Dialysewasser kein Doxorubicin nachgewiesen werden. Dox-Hy-CMD- und Dox-Ed-CMD-funktionalisierte MnZn-MNP zeigen ähnlich hohe Beladungen an Doxorubicin auf. Um die Bindungswahrscheinlichkeit des Doxorubicins zu erhöhen, kann in beiden Fällen der Substitutionsgrad der Derivate erhöht werden.

Des Weiteren kann erfolgreich die Wirkstofffreisetzung an Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP gezeigt werden. Die Freisetzung von Doxorubicin wird bei pH = 5 nach 10 Stunden nahezu vollständig erreicht. Zum Vergleich werden identische Suspensionen bei einem pH-Wert von 7,4 untersucht. Bei diesen Proben kann keine Abspaltung des Doxorubicins über einen Zeitraum von 24 Stunden festgestellt werden.

Weiterhin wird durch eine Langzeitstudie die Stabilität von allen vier beschichteten Partikelsuspensionen über 3 Monate hinweg nachgewiesen und diese zu einer *in-vitro* Versuchsreihe qualifiziert. Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass sich das Agglomerationsverhalten der Partikel im Laufe der Zeit ändert, jedoch die Stabilität der Partikel unverändert bleibt. Optisch gesehen bilden die Partikel nach 3 oder 6 Monaten weiterhin eine stabile Suspension.

Die FCS-Messungen zeigen in allen Fällen, dass die ermittelten Diffusionszeiten von Doxorubicin, welches an Dextran-Derivate gebunden vorliegt, herresultieren. Die Fluoreszenz ausgehend von Doxorubicin, welches an die Partikel gebunden ist, kann auf Grund des auftretenden resonanten Energietransfers nicht gemessen werden. Basierend auf den einzelnen Reinigungsschritten kann die Anwesenheit von ungebundenem Doxorubicin ausgeschlossen werden. Es handelt sich somit bei allen Messungen um Doxorubicin, welches in gebundener Form vorliegt.

5. AUFNAHME VON SYNTHETISIERTEN DRUG-DELIVERY SYSTEMEN IN T-ZELLEN

5.1 BIOLOGISCHE VORTESTS ZUR SPEZIFITÄT VON BELADENEN T-ZELLEN

5.1.1 CHARAKTERISIERUNG DES BISPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERS

Die T-Zell-vermittelte Krebstherapie basiert darauf, dass T-Zellen als biokompatible „Drug-Carrier“ verwendet werden und auf der Ausnutzung des natürlichen zytotoxischen T-Zell-Effekts (siehe Kapitel 2.1.4). Hierbei ermöglicht der Einsatz des bispezifischen Antikörpers (bsAb) HEA125xOKT3 die Bindung der T-Zellen an die Krebszelllinie MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7, Krebszelllinie von Brustkrebs). Dadurch löst dieser durch Bindung an den CD3-Komplex der T-Zellen die Ausschüttung der cytotoxischen Granulen in Richtung der Krebszelle aus. Die Aufgabe des Antikörpers liegt darin, die T-Zellen zielspezifisch an Krebszellen zu binden. So besteht die Möglichkeit, dass der Wirkstoff direkt am Tumor freigesetzt wird. Dieser Antikörper besitzt sowohl ein Epitop für ein T-Zellen spezifisches Antigen CD3 als auch für das krebszellenspezifische Antigen ep-CAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule). Durch die MHC-unabhängige Bindung der T-Zelle an den Antikörper wird eine räumliche Nähe zwischen Drug-Carrier und Target erreicht, welche die Ausschüttung der Nanopartikel direkt an der Krebszelle bewirkt. Eine schematische Darstellung des Antikörpers und der Bindung zwischen T-Zelle, Antikörper und Krebszelle ist in Abbildung 5.1. Durch die Verwendung des bispezifischen Antikörpers können polyklonale T-Zellen verwendet werden, d. h. die Anzahl an beladenen T-Zellen wird erhöht, wodurch die Dosis des Wirkstoffs und die Nebenwirkungen vermindert werden. Zusätzlich aktiviert der bispezifische Antikörper die T-Zellen über den TCR-Komplex, wodurch die zytotoxischen Eigenschaften von T-Zellen ebenfalls genutzt werden können.

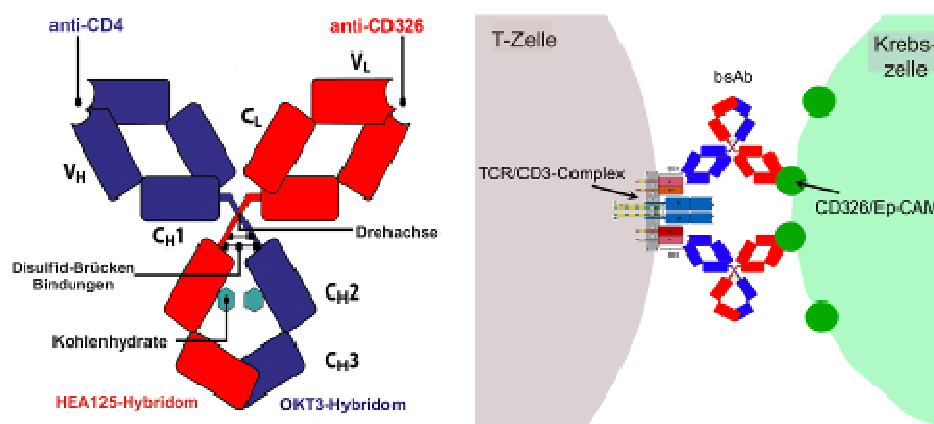


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Antikörper-Aufbaus (links) sowie der Bindungsweise des bispezifischen Antikörpers an die T- sowie an die Krebszelle (Copyright A. Blaudszun, KIST).

In den Vorversuchen zu diesem Projekt sind Zellen der Linie „Jurkat“ verwendet. Um die reale Situation besser simulieren zu können, werden aus „Buffy-Coats“ isolierte T-Zellen eingesetzt. Die Isolation erfolgt mittels Rosette Sep Human T Cell Enrichment Cocktail und Ficoll-Dichtegradienten Zentrifugation. Um den T-Zell-Effekt zu bestimmen, müssen die aktivierten T-Zellen mit dem Antikörper HEA125xOKT3 versetzt werden und in einem variierenden Effektor-zu-Target Verhältnis zu den MCF-7-Krebszellen gegeben werden. Als Kontrolle dient eine nicht aktivierte T-Zellen Population. Unter Verwendung eines Sulpho-Rhodamine B (SRB)-Assays wird anschließend die Überlebensrate der T-Zellen bestimmt. In Abbildung 5.2 ist die Überlebensrate der Krebszellen im Verhältnis zur Anfangszahl (100 %) mit unterschiedlichen Effektor-zu-Target Verhältnissen dargestellt.

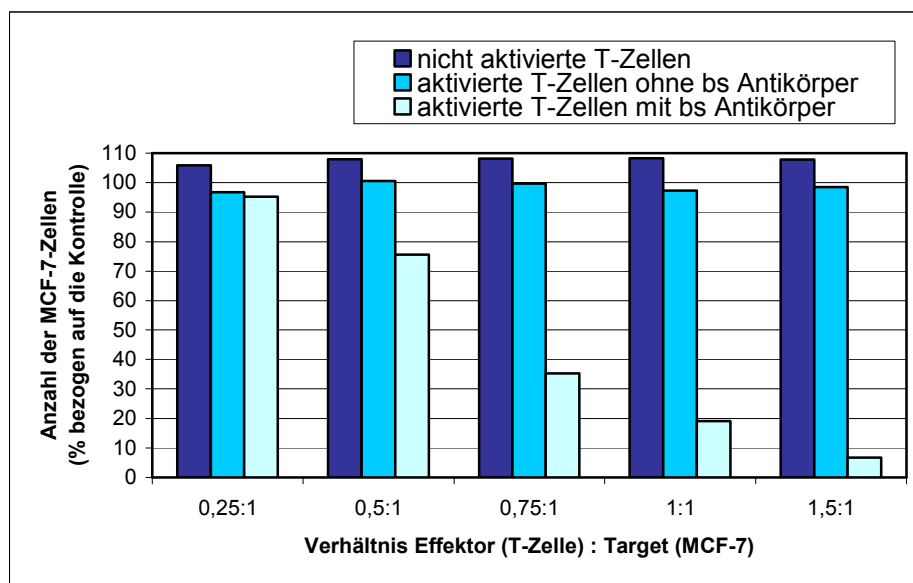


Abbildung 5.2: Ein SRB-Assay der Überlebensrate der MCF-7-Zellen nach 72 Stunden Inkubation, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigt die Abnahme der MCF-7-Zellen nach der Inkubation mit aktivierten T-Zellen und bispezifischem Antikörper.

Es kann weder von nicht aktivierten noch von aktivierten T-Zellen ohne bispezifischen Antikörper ein zytotoxischer Effekt auf die MCF-7-Zellen verzeichnet werden. Erst mit der Verwendung des Antikörpers sinkt die Überlebensrate in Abhängigkeit von dem Verhältnis zwischen Effektor und Target. Bei einem Verhältnis von 0,25 : 1 (Effektor : Target) ist der T-Zell-Effekt gerade groß genug um einen Medikamenten-Effekt nicht zu überlagern. Deshalb wird dieses Verhältnis für nachfolgende Versuche ausgewählt. Bei allen anderen Ergebnissen würde der Medikamenten-Effekt von dem T-Zell-Effekt überlagert werden, wodurch eine genauere Analyse der Auswirkung des Wirkstoffs auf die T-Zellen und somit auf die MCF-7-Zellen nicht mehr möglich wäre.

5.1.2 ANALYSE DER ZYTOTOXISCHEN WIRKUNG VON BESCHICHTETEN PARTIKELN AUF T-ZELLEN

Um ausschließen zu können, dass die Doxorubicin-funktionalisierten-MnZn-MNP-inkubierten T-Zellen, ihre Aktivität bzw. Zielgenauigkeit verlieren, werden aktivierte T-Zellen für 2 Stunden bei 37°C mit Nanopartikeln inkubiert und unter dem Durchlichtmikroskop hinlänglich ihre Aggregation untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5.3 aufgeführt. Hierbei handelt es sich um Durchlichtmikroskop-Aufnahmen mit 400-facher Vergrößerung.



Abbildung 5.3: Links: Aufnahmen von MCF-7-Krebszellen und aktivierten T-Zellen exklusive bispezifischen Antikörper; Mitte: inklusive bispezifischem Antikörper und Rechts: von MCF-7- und beladenen T-Zellen mit bispezifischem Antikörper. Die T-Zellen sind in allen Aufnahmen mit Dextran-beschichteten MnZn-MNP beladen.

Anhand der Aufnahmen in Abbildung 5.3 wird ersichtlich, dass die T-Zelle ohne bispezifischen Antikörper die Krebszelle nicht realisiert (linke Aufnahme). Werden hingegen die T-Zelle und MCF-7-Zelle mit dem bispezifischen Antikörper inkubiert, so befinden sich die T-Zellen in unmittelbarer Nähe zur Krebszelle (mittlere Aufnahme). In diesem Fall bindet die T-Zelle an die MCF-7-Zelle und wird somit über den Antikörper mit aktiviert, wodurch der T-Zell-Effekt ausgelöst wird. Die Aufnahme der mit Dextran-beschichteten Nanopartikeln inkubierten T-Zellen zeigt, dass diese ebenfalls an die Krebszellen binden (rechte Aufnahme). Dies bedeutet also, dass die Beladung der T-Zellen keinen Einfluss auf ihre Ziel-Spezifität ausübt. Eine Kombination des T-Zell-Effekts mit der Beladung der T-Zellen, welche mit Doxorubicin-funktionalisierten Nanopartikeln inkubiert sind, ist nach diesem Ergebnis also möglich.

Basierend auf den zuvor beschriebenen Ergebnissen muss die zytotoxische Wirkung der Partikel untersucht werden. Nur wenn kein Nebeneffekt von den beschichteten MnZn-MNP ausgeht, kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung allein auf der Aktivität des Wirkstoffs beruht. Deshalb werden zuerst Dextran-beschichtete MnZn-MNP auf ihre Biokompatibilität, bezogen auf T-Zellen, getestet.

Die Zytotoxizität der Partikel wird mit Hilfe eines MTT-Assays überprüft. Dazu werden aktivierte T-Zellen mit Dextran-beschichteten MnZn-MNP, die unterschiedliche Partikel-zu-Volumen Verhältnisse aufweisen, für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wird die Überlebensrate der T-Zellen im MTT-Assay nach 24 und 48 Stunden gemessen. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abbildung 5.4 dargestellt. Im Vergleich zu den unbeladenen T-Zellen nimmt die Überlebensrate der beladenen T-Zellen bei den beiden geringen Partikel-zu-Volumen Verhältnissen nicht signifikant ab. Somit kann mit Hilfe des Zytotoxizität-Tests gezeigt werden, dass Dextran-beschichtete MnZn-MNP keinen erheblichen Einfluss auf die Überlebensrate der T-Zellen haben. Demnach können Nebeneffekte durch eine toxische Wirkung der Nanopartikel auf die nativen Carrier weitestgehend ausgeschlossen werden.

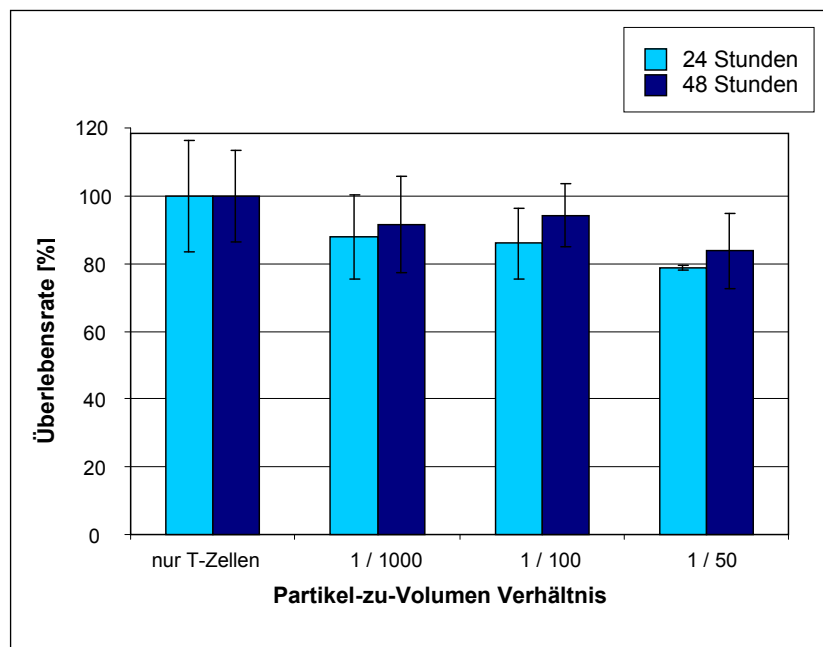


Abbildung 5.4: Ein MTT-Assay der Überlebensrate aktivierter T-Zellen, die mit Dextran-beschichteten Partikeln inkubiert sind. Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden Messungen zeigen, dass beschichtete MnZn-MNP keinen toxischen Einfluss auf T-Zellen haben.

5.2 AUFNAHME VON DOXORUBICIN-FUNKTIONALISIERTEN MnZn-MNP IN T-ZELLEN

5.2.1 CHARAKTERISIERUNG VON BELADENEN T-ZELLEN

Bevor es zur Aufnahme der Doxorubicin-PAD/CMD-funktionalisierten MnZn-MNP in T-Zellen kommt, muss zuerst die Bindungsstabilität untersucht werden. Dies geschieht mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie. Dazu werden die Nanopartikel magnetisch getrennt und im verbleibenden Überstand wird die Konzentration an Doxorubicin in Lösung bestimmt. Die Untersuchungen zeigen, dass ca. 97 % des Wirkstoffs fest auf den Nanopartikeln gebunden ist. Weiterhin kann in einer Langzeitstudie aufgezeigt werden, dass sich nach 3 Wochen nur minimale Mengen an Doxorubicin von den Partikeln lösen. Dementsprechend sind die Partikel über einen längeren Zeitraum stabil und können für *in-vitro* Versuche in Betracht gezogen werden. Jedoch sollten die Partikel, um die Aktivität des Wirkstoffs zu gewährleisten, bei einer Temperatur von 4°C gelagert werden.

Für die *in-vitro* Experimente werden T-Zellen verwendet, die zuvor aus Frischblut isoliert und anschließend aktiviert werden. Aktiviert bedeutet in diesem Fall, dass die T-Zellen mit dem bispezifischen Antikörper 3 Tage lang gereift sind. Um die Aufnahmeeffizienz der beladenen Partikel in T-Zellen zu überprüfen, werden bildgebende Verfahren, wie die Fluoreszenzmikroskopie, bei der die Autofluoreszenz von Doxorubicin ausgenutzt wird, verwendet. Eine weitere Nachweismöglichkeit stellen TEM-Aufnahmen von fixierten Zellen dar. Durch diese Aufnahmen ist eine genauere Analyse der Internalisierungsart der Zellen möglich. Des Weiteren bietet die hohe Auflösung die Möglichkeit der Lokalisierung der funktionalisierten MnZn-MNP.

Einen ersten Hinweis auf die Aufnahme von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP in T-Zellen wird mittels Durchflusszytometrie (FACS) erhalten. Diese Analysemethode weist die fluoreszierenden Eigenschaften der Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP in den aktivierten T-Zellen nach. Für die FACS-Analyse werden aktivierte T-Zellen für 2 Stunden bei 37°C mit Dox-PAD- oder Dox-CMD-funktionalisierten Nanopartikeln inkubiert. Die Anregung erfolgt bei 567 nm und die Intensität wird bei 590 nm im Kanal FL2-H gemessen. In Abbildung 5.5 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse der Dox-PAD- und Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP visualisiert.

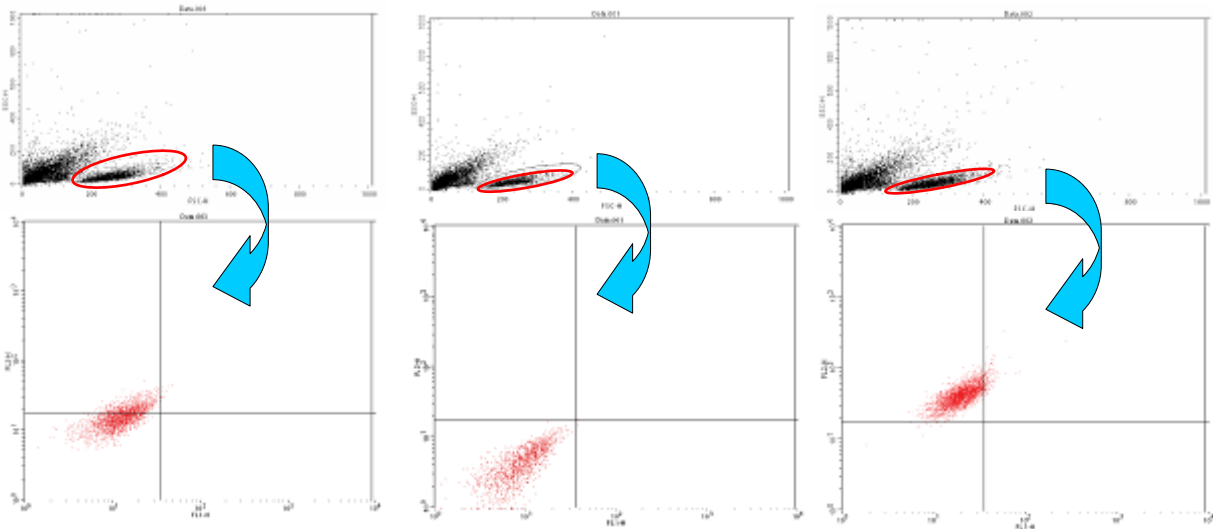


Abbildung 5.5: FACS-Messergebnisse von Dox-PAD- und von Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP. Links: Aktivierte T-Zellen inkubiert mit Dox-PAD-MnZn-MNP, Mitte: Aktivierte T-Zellen ohne Partikel, Rechts: Aktivierte T-Zellen inkubiert mit Dox-CMD-MnZn-MNP. Die mit Doxorubicin-inkubierten Zellen zeigen sowohl für Dox-PAD-funktionalisierten als auch für Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP eine Zunahme der Fluoreszenz.

In Abbildung 5.5 sind die vitalen T-Zellen rot markiert. Diese markierte Population ist in jeweils darunter liegenden Teil der Abbildung für die Kanäle FL1-H und FL2-H dargestellt. Eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität am Kanal FL2-H ist sowohl nach Inkubation mit Dox-PAD-MnZn-MNP als auch nach Inkubation mit Dox-CMD-MnZn-MNP zu messen. Allerdings ist die Zunahme der Intensität bei den T-Zellen, die mit Dox-CMD-MnZn-MNP inkubiert sind, größer als bei den T-Zellen, die mit Dox-PAD-MnZn-MNP inkubiert sind. Die Differenzen in der Intensität können unter anderem durch die unterschiedlichen Konzentrationen an Doxorubicin in der Partikelsuspension herrühren.

Anhand der Ergebnisse der FACS-Analyse kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Nanopartikel in die Zelle aufgenommen werden. Die Änderung im Fluoreszenzverhalten kann auch daher kommen, dass die funktionalisierten Partikel nur an die Oberfläche der Zellen gebunden sind. Aus diesem Grund muss der genaue Aufnahme-Mechanismus noch weiter untersucht werden. Dazu werden Dox-PAD- und Dox-CMD-funktionalisierte-MnZn-MNP-inkubierte T-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern immobilisiert und mittels der Fluoreszenz-Mikroskopie charakterisiert. Abbildung 5.6 zeigt ein und dieselbe inkubierte Zelle einmal links im Hellfeld und einmal rechts durch einen Filter. Die Fluoreszenzaufnahme zeigt eine verstärkte Fluoreszenz in der Zelle, dies weist darauf hin, dass sich die Partikel in bestimmten zellulären Kompartimenten ansammeln. Gleichzeitig kann über eine höhere Fluoreszenzintensität indirekt auf eine

höhere Konzentration an Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP geschlossen werden. Dieselbe erhöhte Fluoreszenzintensität im Zellinneren kann bei den Dox-CMD-MnZn-MNP inkubierten T-Zellen nachgewiesen werden.

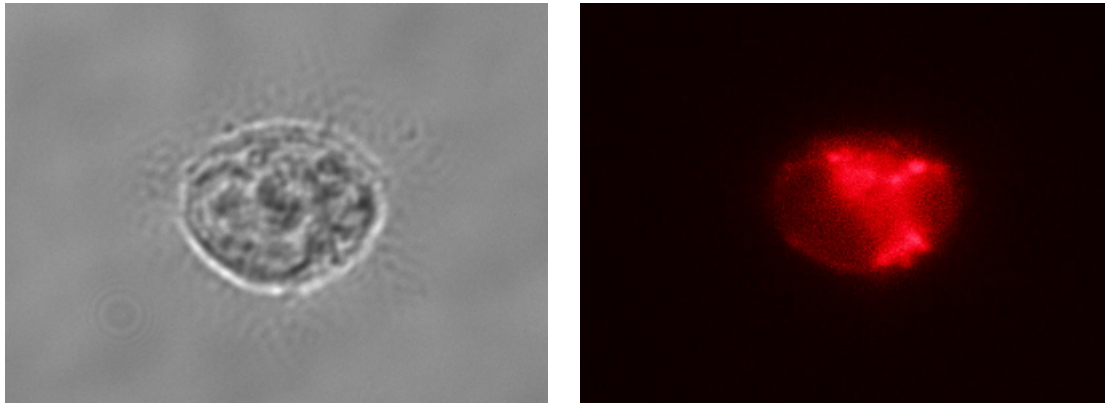


Abbildung 5.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit Dox-PAD-MnZn-MNP-inkubierten T-Zellen mit 100-facher Vergrößerung, Links: T-Zelle im Hellfeld, Rechts: T-Zelle im Fluoreszenzfilter mit der charakteristischen Fluoreszenz des Doxorubicins.

Um eine genauere Lokalisation des Doxorubicins zu erhalten, werden T-Zellen mittels CD45-FITC aktiviert, wodurch es zu einer Kofärbung der Membran kommt. Durch diese Kofärbung ist es möglich, Lymphozyten visuell eindeutig von anderen Zellen abzugrenzen. Begründet liegt dies in der Spezifität des Antikörpers, der nur an die Membran von Lymphozyten koppelt. Die Aufnahmen in Abbildung 5.7 und in Abbildung 5.8 visualisieren verschieden markierte T-Zellen, die mit Dox-PAD-MnZn-MNP inkubiert sind.

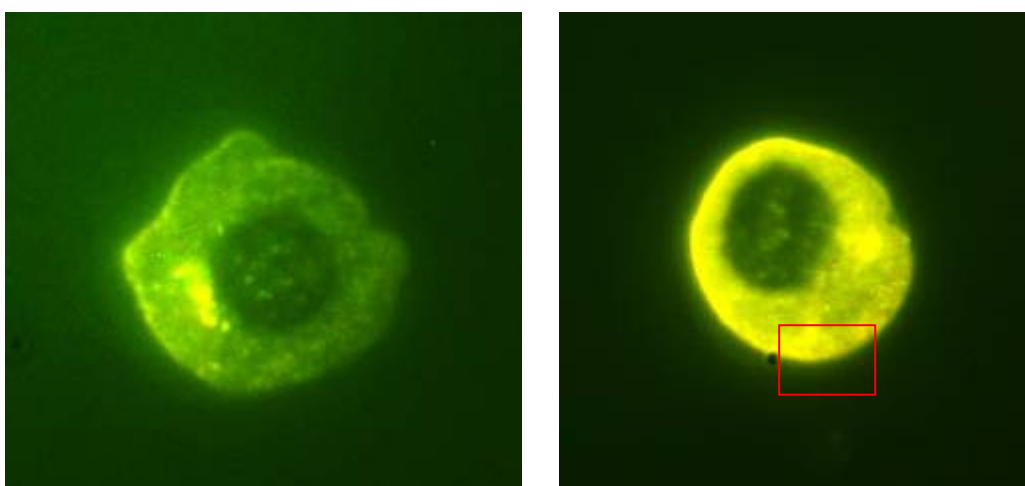


Abbildung 5.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lymphozyten, die mit CD45-FITC markiert und mit Dox-PAD-MnZn-MNP inkubiert sind. Sowohl im rechten als auch im linken Bild ist eine leichte Zunahme der Fluoreszenzintensität zu sehen.

In der linken Aufnahme von Abbildung 5.7 kann eine Verstärkung der Fluoreszenz in der Nähe des Zellkerns registriert werden. Dies deutet auf eine Ansammlung von funktionalisierten Nanopartikeln hin. Allerdings wird die Fluoreszenz, die von Doxorubicin ausgeht, von der Fluoreszenz des an die Membran gebundenen CD45-FITCs überlagert. Weiterhin ist zu erkennen, dass der Wirkstoff nicht in die DNA des Zellkerns interkaliert ist. In diesem Fall hätte die Fluoreszenzintensität des Zellkerns, bedingt durch Doxorubicin, stark zugenommen. In Abbildung 5.7 (rechte Aufnahme) weist der Zellkern keine Änderung auf. Dies kann ebenfalls an der geringen Konzentration des Doxorubicins in der Partikelsuspension liegen. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, dass Doxorubicin an die Partikel gebunden ist und somit noch nicht in die DNA des Zellkerns intakaliert ist. Auch können Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP nur an die Zellmembran gebunden vorliegen; so ist beispielsweise in der rechten Aufnahme von Abbildung 5.7 eine rote Fluoreszenz an der äußeren Seite der Zellmembran zu erkennen.

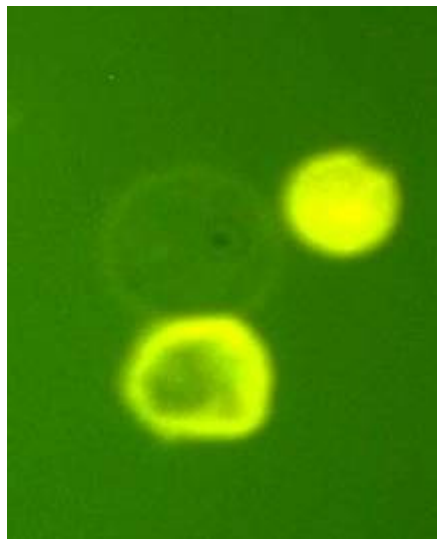


Abbildung 5.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von T-Zellen, die mit CD45-FITC markiert und mit Dox-PAD-MnZn-MNP inkubiert sind, weisen keine rote Fluoreszenz auf.

Abbildung 5.8 zeigt zwei markierte T-Zellen, die keine Fluoreszenzaktivität des Doxorubicins aufweisen. Durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kann zwar bewiesen werden, dass funktionalisierte Nanopartikel aufgenommen werden, allerdings hat es den Anschein, als sei entweder die Konzentration des Wirkstoffs zu gering oder die Interkalation des Wirkstoffs in die Zell-DNA hat noch nicht stattgefunden.

Die Aufnahmen in Abbildung 5.9 bis Abbildung 5.11 zeigen CD45-FITC markierte Lymphozyten, die mit Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP beladen werden. Jede Aufnahme weist rote Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns auf. Abbildung 5.9 zeigt zum Beispiel das Stadium, in dem der Wirkstoff in die DNA des Zellkerns interkaliert hat. Sobald

der Wirkstoff in die DNA interkaliert, wird die Apoptose eingeleitet und die Fluoreszenzintensität wird stark erhöht. Jedoch ist die Fluoreszenz so intensiv, dass sie die Fluoreszenz der freien Partikelsuspension überlagert und somit nicht detektiert werden kann.

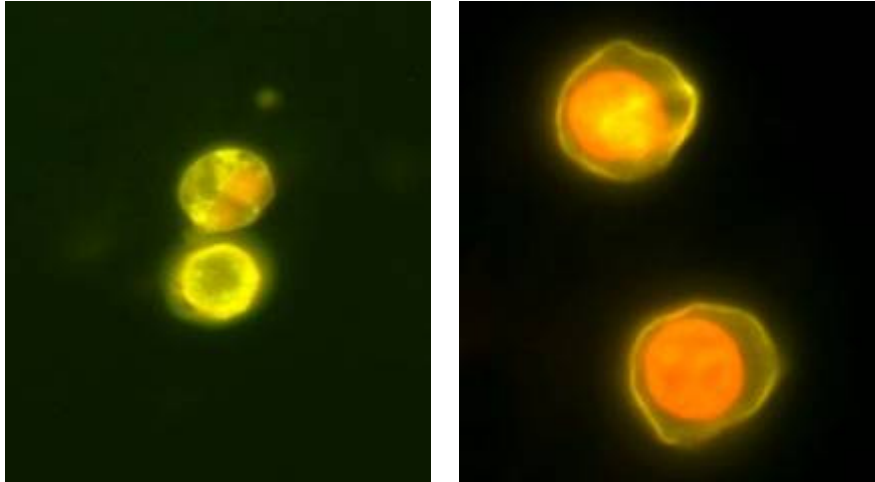


Abbildung 5.9: T-Lymphozyten, markiert mit CD45-FITC und beladen mit Dox-CMD-MnZn-MNP. Eindeutige rote Färbung des Zellkerns ist in beiden Aufnahmen zu erkennen.

So zeigt die linke Fluoreszenz-Aufnahme in Abbildung 5.10 eine T-Zelle, in der Doxorubicin interkaliert ist sowie einen Teil der Suspension von Dox-CMD-MnZn-MNP. Die Ansammlung dieser Partikelsuspension außerhalb der Zellen lässt darauf schließen, dass nicht Doxorubicin, sondern Dox-CMD-funktionalisierte MnZn-MNP aufgenommen werden. Auch die rechte Aufnahme in Abbildung 5.10 deutet darauf hin, dass Doxorubicin-funktionalisierte MnZn-MNP aufgenommen werden. Zu erkennen ist dies an der Fluoreszenz des Zellkerns und an den Fluoreszenzspots die außerhalb des Zellkerns liegen.

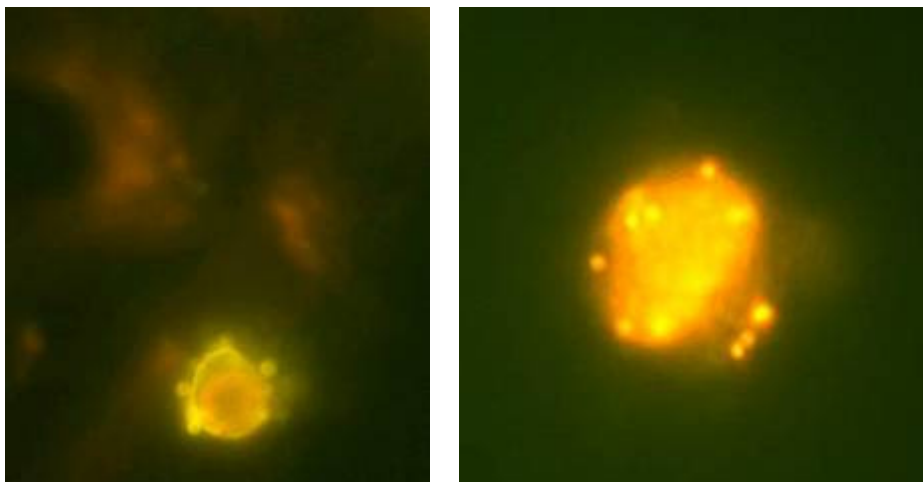


Abbildung 5.10: Aufnahmen von T-Lymphozyten, die mit CD45-FITC markiert und mit Dox-CMD-MnZn-MNP beladen sind sowie freie Partikelsuspension.

Die Aufnahme in Abbildung 5.11 ist rund 20 Stunden nach der Inkubation angefertigt worden. Sie zeigt die Bildung mehrerer Spots innerhalb der Zelle, welches darauf hindeuten könnte, dass es sich um ein Stadium der Apoptose handelt, in dem der Zellkern fragmentiert.

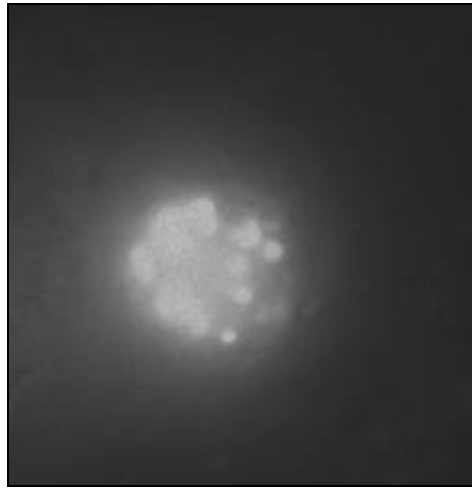


Abbildung 5.11: Aufnahme von Dox-CMD-MnZn-MNP inkubierten T-Zellen, die mit CD45 markiert sind. Zu erkennen sind mehrere Spots, die auf ein Stadium der Apoptose von T-Zellen hinweisen.

Durch Vergleich mit der FACS-Analyse fällt auf, dass auch hier die Fluoreszenzintensität der mit Dox-CMD-MnZn-MNP beladenen T-Zellen höher ist als die der mit Dox-PAD-MnZn-MNP beladenen T-Zellen. Durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kann nicht eindeutig belegt werden, dass die funktionalisierten MnZn-MNP in die Zelle aufgenommen werden. Zu diesem Zweck werden von aktivierten T-Zellen, die für 2 Stunden bei 37°C mit funktionalisierten Partikeln inkubiert sind TEM-Aufnahmen gemacht.

Abbildung 5.12 sowie Abbildung 5.13 zeigen TEM-Aufnahmen von fixierten T-Zellen, die mit Dox-PAD-MnZn-MNP inkubiert sind.

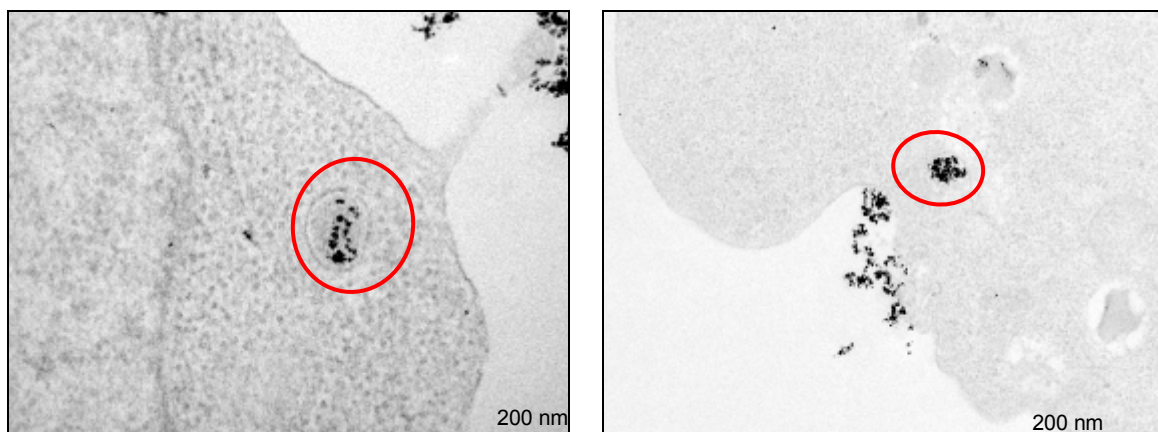


Abbildung 5.12: TEM-Aufnahmen von aktivierten T-Zellen, die mit Dox-PAD-MnZn-MNP inkubiert sind. Die Aufnahme der Partikel erfolgt endozytotisch in Vesikel (rote Markierung). Zu erkennen ist dies an der membranähnlichen Struktur, die die Partikel umgibt.

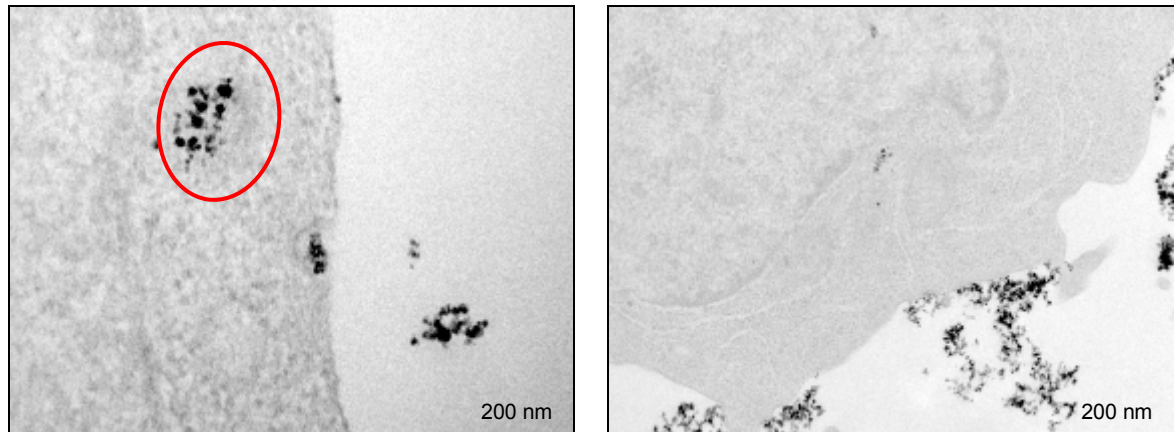


Abbildung 5.13: TEM-Aufnahmen von aktivierten T-Zellen, die mit Dox-PAD-MnZn-MNP inkubiert sind. Zeigen ebenfalls die Aufnahme der Partikel per Endozytose (links), und die Ansammlung der funktionalisierten MnZn-MNP an der äußeren T-Zell-Membran (rechts).

Die Aufnahme von Nanopartikeln durch aktivierte T-Zellen erfolgt vermutlich über Mechanismen wie die Endozytose oder über bestimmte Carrier. Anhand dieser Aufnahmen kann angenommen werden, dass die Aufnahme der Partikel in T-Zellen über endozytotische Vesikel erfolgt. Dies lässt sich durch die vesikulären Strukturen erklären, in denen die Partikel geclustert vorliegen. Die Internalisierung der Dox-PAD-MnZn-MNP ist offensichtlich erfolgreich und als Aufnahmeweg ist die Endozytose anzunehmen. Dies bedeutet, dass der Wirkstoff in gebundener Form von den T-Zellen aufgenommen wird und formuliert durch die T-Zellen an den Wirkungsort geschleust wird. Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.14 visualisieren fixierte T-Zellen, welche aktiviert und mit Dox-CMD-MnZn-MNP inkubiert sind.

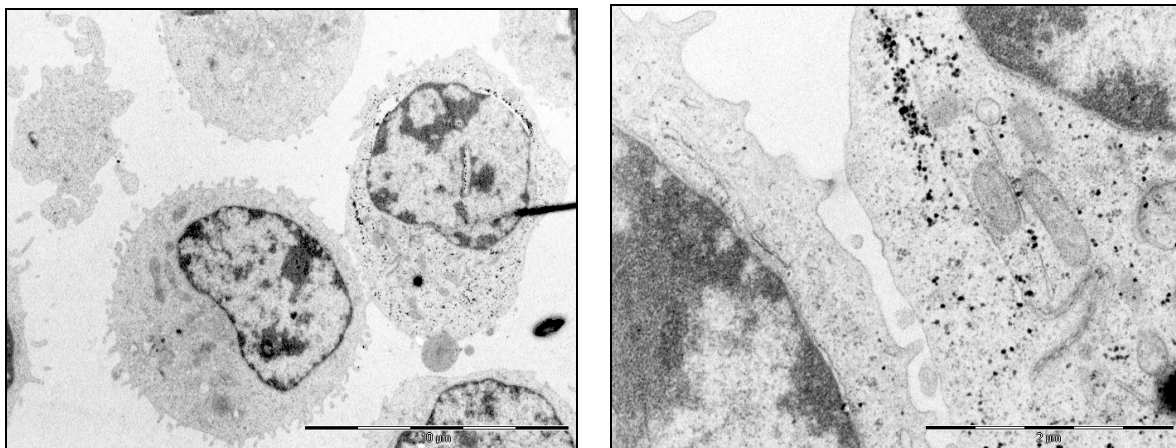


Abbildung 5.14: TEM-Aufnahmen von fixierten T-Zellen, die aktiviert und mit Dox-CMD-MnZn-MNP inkubiert sind; zeigen eine Ansammlung der funktionalisierten MnZn-MNP im Zytoplasma, aber ohne erkennbare Struktur.

Wie zu erkennen ist, liegen diese ohne erkennbare Struktur im Cytosol vor. Auf Grund der Ergebnisse in Abbildung 5.12 und Abbildung 5.13 ist jedoch anzunehmen, dass auch in diesem Fall die funktionalisierten MnZn-MNP durch Endozytose aufgenommen werden. Die Internalisierung der Dox-CMD-MnZn-MNP ist ebenfalls erfolgreich und der Wirkstoff wird nach diesem Ergebnis in gebundener Form von den T-Zellen aufgenommen.

5.2.2 ANALYSE DES ZYTOTOXISCHEN EFFEKTS VON DOXORUBICIN-FUNKTIONALISIERTEN NANOPARTIKELN AUF T-ZELLEN

Nachdem die Aufnahme der Doxorubicin funktionalisierten Partikel in T-Zellen erfolgreich charakterisiert werden kann, wird der zytotoxische Effekt des Doxorubicins auf die T-Zellen dargestellt. Für die Versuche werden aktivierte T-Zellen über eine Stunde bei 37°C mit 1, 2 und 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP beladen und anschließend die Überlebensrate mittels eines MTT-Assays im zeitlichen Ablauf von 24 bis 168 Stunden gemessen. Die Ergebnisse eines MTT-Assays sind in Abbildung 5.15 graphisch dargestellt.

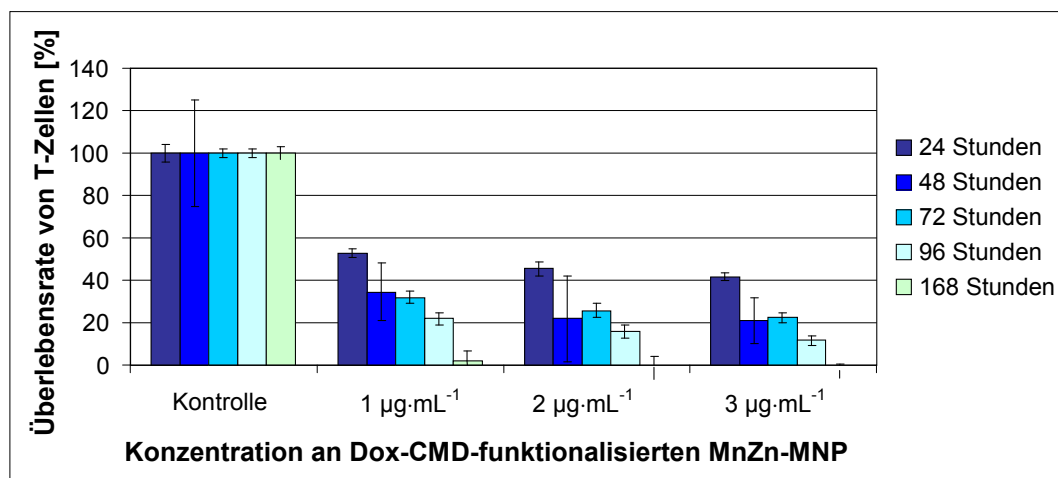


Abbildung 5.15: Ein MTT-Assay der Überlebensrate aktivierter T-Zellen mit unterschiedlichen Beladungsgraden an Dox-CMD-MnZn-MNP. Die T-Zell-Population ist nach 24 Stunden auf ca. 50 % gesunken und dies unabhängig von der eingesetzten Konzentration an Dox-CMD-MnZn-MNP.

Nach 24 Stunden, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, überleben ca. 40 % bis 50 % der mit Dox-CMD-MnZn-MNP-inkubierten T-Zellen. Nach diesen 24 Stunden sinkt die Population weiter ab. Bei Beladung der T-Zellen mit 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Partikelsuspension überleben nach 168 Stunden noch 3 % der T-Zellen. Je höher die Menge an eingesetzter Partikeldispersion ist, desto schneller sterben die T-Zellen ab. Bei den

2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ und 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Partikelsuspensionen sind nach 168 Stunden keine lebenden T-Zellen mehr zu verzeichnen. Basierend auf den Ergebnissen der MTT-Assays ist ein Zeitfenster von rund 24 Stunden vorgegeben, in dem die T-Zellen ihr Ziel erreichen sollten, um so die Krebszellen anzugreifen.

Ein mögliches Einsatzgebiet der T-Zellen-vermittelten Krebstherapie ist die Behandlung von Brustkrebs. Deshalb wird die zytotoxische Wirksamkeit der Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP in Kombination mit den T-Zellen auf Krebszellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 hin untersucht.

Hierfür werden T-Zellen zuerst mit Dox-CMD-MnZn-MNP inkubiert und anschließend ohne und mit bispezifischen Antikörpern (bsAb) zu MCF-7-Krebszellen gegeben. Danach wird die Überlebensrate der Krebszellen mittels eines Zytotoxizitäts-Assays untersucht. Diese Untersuchung erfolgt mit Hilfe eines SRB-Assays, der die Überlebensrate der MCF-7-Zellen nach 48, 72 und 96 Stunden analysiert. In Abbildung 5.16 sind die Ergebnisse eines SRB-Assays zusammengefasst.

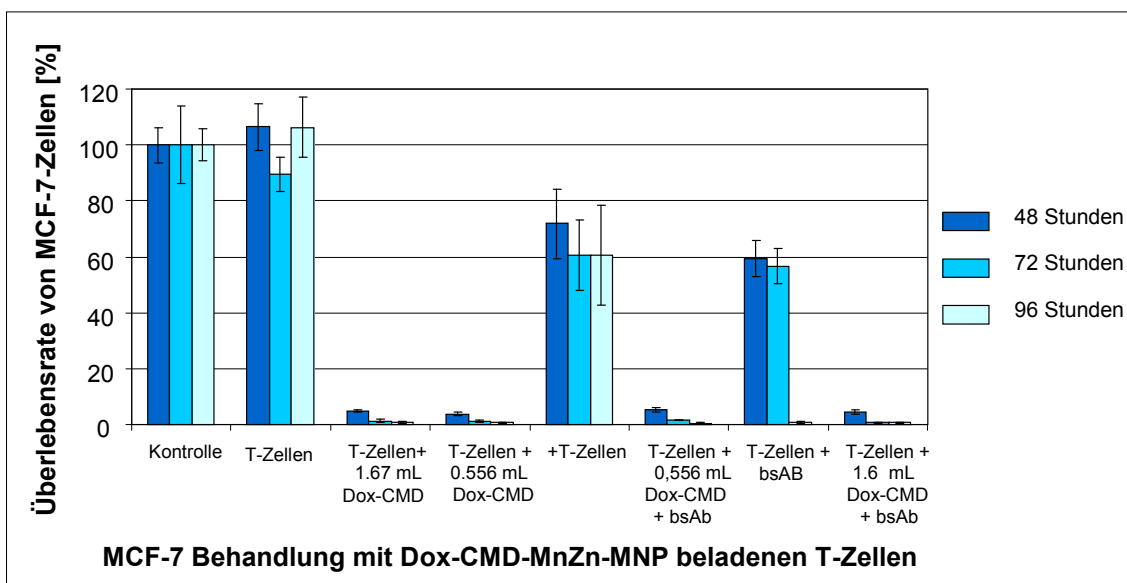


Abbildung 5.16: Ein SRB-Assay der Überlebensrate von MCF-7-Krebszellen nach Behandlung mit Dox-CMD-MnZn-MNP-inkubierten T-Zellen und bsAb HEA125xOKT3. Die Überlebensrate der Krebszellen wird nach 96 Stunden deutlich herabgesetzt.

Anhand des SRB-Assays ist zu erkennen, dass die T-Zellen ohne bispezifischen Antikörper selbst keinen Effekt auf die Überlebensrate der MCF-7-Zellen ausüben. Durch Zugabe des Antikörpers HEA125xOKT3 sinkt die Überlebensrate um rund 40 % nach 48 Stunden sowie nach 96 Stunden beträgt die Überlebensrate der Krebszellen nur noch 2 %. Die Dox-CMD-MnZn-MNP-inkubierten T-Zellen, senken die Überlebensrate der Krebszellen erheblich unabhängig davon ob mit oder ohne bispezifischen Antikörper. So sind nach 48 Stunden bereits 93 % der MCF-7-Zellen abgestorben und nach 96 Stunden ist die

Überlebensrate auf unter 2 % gesunken. Dies gilt auch unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Es kann also von einer guten chemotherapeutischen Wirksamkeit ausgegangen werden.

Weiterhin zeigt dieses Ergebnis, dass die Dox-CMD-MnZn-MNP, wenn sie vermittelt durch die T-Zellen auf die Krebszellen appliziert werden, in hohem Maße zytotoxisch sind. Da diese toxische Wirkung sehr hoch ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht gesagt werden, ob dieser Effekt durch den bispezifischen Antikörper vermittelt wird oder nicht. Es müssen weitere Tests folgen, um eine genaue Aussage darüber treffen zu können.

5.3 ZUSAMMENFASSUNG

Die im Rahmen dieses Kapitels vorgestellten biologischen Tests zeigen alle die erfolgreiche Aufnahme der Doxorubicin-funktionalisierten Nanopartikel in T-Zellen. Zur Charakterisierung dieser Aufnahmen in T-Zellen werden verschiedene bildgebende Verfahren wie Fluoreszenz-Mikroskopie, TEM und FACS-Analyse verwendet, um eine Lokalisation der Doxorubicin-beladenen Nanopartikel in den Zellen zu erreichen. Um anschließend die Überlebensrate dieser Zellen zu analysieren kommen SRB- und MTT-Assays zum Einsatz. Zunächst werden Vortests zur Überprüfung der Spezifität von T-Zellen auf Krebszellen durchgeführt. Dazu wird ein SRB-Assay der Überlebensrate von Krebszellen angefertigt. Diese Krebszellen sind mit unaktivierten, aktivierten (ohne bsAb) und aktivierten mit bispezifischen Antikörper HEA125xOKT3 inkubierten T-Zellen beladen. Weder unaktivierte noch aktivierte (ohne bsAb) T-Zellen üben einen Einfluss auf die Überlebensrate der Krebszellen aus. Nur aktivierte T-Zellen mit bispezifischem Antikörper greifen die Krebszellen an und es kommt zur Abtötung der malignen Zellen. Es wird festgestellt, dass bei einem Verhältnis 0,25 Effektor zu 1 Target der T-Zell-Effekt gerade groß genug ist, damit ein möglicher Medikamenten-Effekt nicht überlagert wird. Des Weiteren werden die Bindungseigenschaften von beladenen T-Zellen mit bispezifischem Antikörper charakterisiert und es wird festgestellt, dass die Beladung von T-Zellen keinen Einfluss auf ihre Spezifität ausübt. In diesem Zusammenhang wird auch die Toxizität von Dextran-beschichteten MnZn-MNP auf T-Zellen mittels eines MTT-Assays untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Dextran-beschichteten MnZn-MNP keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate von T-Zellen haben.

Anknüpfend an diese Ergebnisse folgen Untersuchungen von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP und deren Aufnahme in T-Zellen. Zum Einsatz kommen Doxorubicin-PAD- und die Doxorubicin-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP. Deren Aufnahme einerseits mit FACS und andererseits unter Zuhilfenahme von bildgebenden Verfahren, wie Fluoreszenz-Mikroskopie und TEM, analysiert werden. Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen für beide inkubierten T-Zellen einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität. Dieses Ergebnis liefert noch keinen eindeutigen Beweis für die Aufnahme der funktionalisierten MnZn-MNP in T-Zellen, da im Allgemeinen die Möglichkeit besteht, dass die beladenen MnZn-MNP nur auf der Zelloberfläche adsorbieren. Um dies auszuschließen, werden anschließend Fluoreszenz-Mikroskop- sowie TEM-Aufnahmen von inkubierten T-Zellen angefertigt. Beide Analysemethoden bestätigen eindeutig die Aufnahme der Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP in T-Zellen. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie folgt eine Kofärbung der Membran der T-Zellen mit CD45-FITC, um eine genaue Lokalisierung der Partikel zu erreichen. Bei den Doxorubicin-CMD-MnZn-MNP wird eine verstärkte rote Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns detektiert. Dies deutete zum Einen auf die Aufnahme

der Partikel in die Zelle und zum Anderen auf die Interkalation des Doxorubicins in den Zellkern, wodurch die Fluoreszenzintensität gesteigert wird. Bei den Dox-PAD-MnZn-MNP kann dieser Effekt nicht beobachtet werden. Allerdings ist eine Anhäufung roter Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns lokalisierbar. Bei den TEM-Aufnahmen der Dox-PAD-MnZn-MNP wird gezeigt, dass die funktionalisierten MnZn-MNP mittels Endozytose aufgenommen werden. Diese Aufnahmen zeigten vesikuläre Strukturen, in denen die Partikel geclustert vorliegen.

Um die Überlebensrate der Doxorubicin-beladenen T-Zellen zu charakterisieren, werden MTT-Assays angefertigt. Diese zeigen, dass nach 24 Stunden noch circa 50 % der mit Dox-CMD-MnZn-MNP inkubierten T-Zellen überleben. Danach sinkt die Population weiter ab und nach 168 Stunden überleben nur noch 3 % der T-Zellen, die mit $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Partikelsuspension inkubiert sind. Des Weiteren wird gezeigt, dass je höher die eingesetzte Menge an Partikelsuspension ist, desto eher Sterben die T-Zellen ab. Aus diesen Ergebnissen kann ein Zeitfenster von 24 Stunden ermittelt werden, in dem die beladenen T-Zellen ihren Wirkungsort erreicht haben müssen.

Ein mögliches Einsatzgebiet dieser beladenen T-Zellen stellt die Behandlung von Brustkrebs dar. Deshalb wird mit Hilfe eines SRB-Assays die Überlebensrate von MCF-7-Zellen untersucht, welche mit beladenen T-Zellen inkubiert sind. Die mit Dox-CMD-MnZn-MNP inkubierten T-Zellen, senken die Überlebensrate der Krebszellen erheblich. So sind nach 48 Stunden bereits 93 % der MCF-7-Zellen abgestorben und nach 96 Stunden ist die Überlebensrate sogar auf unter 2 % gesunken. Anhand dieses Ergebnisses kann von einer guten chemotherapeutischen Wirkung der funktionalisierten MnZn-MNP ausgegangen werden.

6. DARSTELLUNG MULTIFUNKTIONALER NANOPARTIKEL MITTELS LAYER-BY-LAYER-TECHNIK

6.1 AUFBAU VON MULTISCHICHTSYSTEMEN AUF PARTIKELOBERFLÄCHEN

Auf Grund der Adsorption von Citrat-Ionen weisen synthetisierte MnZn-MNP eine negative Oberflächenladung auf. Dementsprechend muss für die Bildung der ersten Schicht ein Polykation verwendet werden. Die anschließende Abtrennung des nicht adsorbierten Polyelektrolyten erfolgt je nach Stabilität der Partikelsuspension entweder durch magnetische Separation oder durch 2-tägige Dialyse gegen destilliertes Wasser. Durch die Adsorption des positiv geladenen Polymers an die negativ geladene Oberfläche des Partikels erfolgt eine Ladungsinversion. Somit kann im Anschluss ein negativ geladenes Polymer adsorbieren. Die zuvor beschriebenen Schritte können so lange wiederholt werden, bis die gewünschte Anzahl an Schichten erreicht wird. Allerdings ist der damit verbundene Zeitaufwand sehr groß. In dieser Arbeit beläuft sich die maximale Anzahl der Schichten auf 6. Eine schematische Darstellung der LbL-Deposition auf Partikeln ist in Abbildung 6.1 visualisiert.

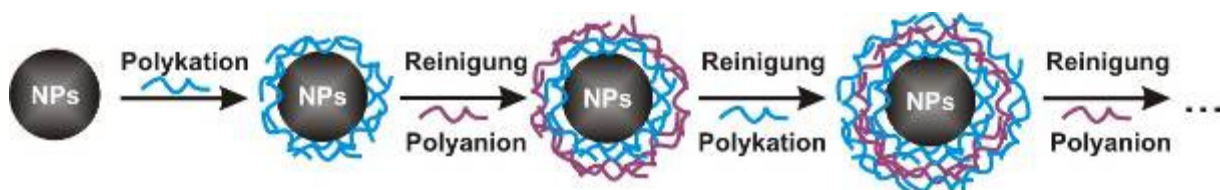


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der angewandten LbL-Technik zur Bildung multifunktionaler Schichten auf magnetischen Nanopartikeln.

In den nachfolgenden Kapiteln wird das Zusammenspiel der eingesetzten Polykationen (PAH und PEI) und Polyanionen (PSSa-co-MA und PEI) dargestellt. Daraus kann das optimale System von Polykation und Polyanion bestimmt werden, welches die besten Voraussetzungen für eine medizinische Anwendung liefern könnte. Die Strukturformeln der verwendeten Polymere können in Abbildung 2.27 nachgeschlagen werden.

Dazu werden verschiedene Schichtsysteme in Abhängigkeit von der Stärke des Polyelektrolyten aufgebaut. Beispielsweise wird in Kapitel 6.1.1 der Schichtaufbau aus zwei schwachen Elektrolyten beschrieben. Wohingegen in Kapitel 6.1.2 der Aufbau von Multischichten bestehend aus schwachen und starken Polyelektrolyten erläutert wird. Anschließend wird in Kapitel 6.1.3 das Schichtsystem, bestehend aus zwei starken Polyelektrolyten, näher charakterisiert. Durch diese Versuchsreihe soll geklärt werden, ob die Stärke des Polyelektrolyten einen Einfluss auf die Stabilität und die Agglomeratenbildung

der Partikel ausübt. Als Charakterisierungsmethoden kommen dabei DLS, FT-IR-Spektroskopie, Zetapotential sowie TEM zur Anwendung.

6.1.1 LAYER-BY-LAYER-DEPOSITION VON POLYALLYLAMIN UND POLYARCYLSÄURE

Das erste vorgestellte Schichtsystem, setzt sich aus Polyallylamin (PAH) als Polykation und Polyarylsäure (PAA) als Polyanion zusammen. Bei beiden Polymeren handelt es sich um schwache Polyelektrolyten, deren Schichtdicke in Abhängigkeit des pH-Werts variiert (vgl. Kapitel 2.3.4). Da der optimale pH-Bereich für medizinische Anwendungen zwischen 6 und 7 liegt und beide Polymere in diesem Bereich die volle Ladungsdichte aufweisen, verhalten sich diese deshalb auch wie starke Elektrolyte.

In Abbildung 6.2 sind die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung von (PAH / PAA)-beschichteten Partikeln mit steigender Schichtzahl aufgeführt.

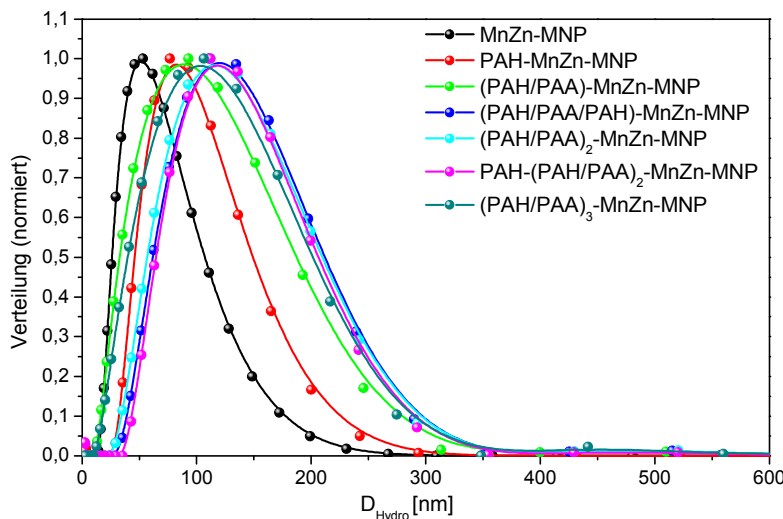


Abbildung 6.2: Darstellung von verschiedenen Verteilungskurven der einzelnen Schichten. Anhand der Größenverteilungskurven ist zu erkennen, dass sich der hydrodynamische Durchmesser mit jeder hinzukommenden Schicht verändert.

Nach der Adsorption der ersten Schicht ist eine größere Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers zu verzeichnen als im Vergleich bei den später hinzukommenden Schichten. Der hydrodynamische Durchmesser ändert sich für die erste Schicht von 43 nm auf 103 nm. Eine mögliche Ursache dafür kann ein erhöhter pH-Wert (8,75) sein, der dafür sorgt, dass PAH nur leicht deprotoniert vorliegt und somit nicht mehr vollständig an die Partikel adsorbiert, wodurch es zur Ausbildung von Loops kommt. Eine Polydispersität von 1,70

deutet auf einen geringen Aggregationsgrad hin. Danach steigt der hydrodynamische Durchmesser, bedingt durch Wechselwirkung des Polyelektrolytens mit dem Suspensionsmedium Wasser, bis zur Adsorption der dritten Schicht kontinuierlich an. Bei (PAH / PAA / PAH) beläuft sich der Durchmesser auf 145 nm und die Polydispersität liegt bei 1,63. Ab (PAH / PAA)₂ fällt der Durchmesser der Nanopartikel allerdings geringfügig ab, welches auf den ändernden pH-Wert zurückzuführen ist. (PAH / PAA)₃-beschichtete MnZn-MNP zeigen einen pH-Wert von 6,79 auf, bei diesem pH-Wert weisen beide Polymere die volle Ladungsdichte auf, folglich nimmt die Schichtdicke ab. (PAH / PAA)₃-beschichtete Partikel haben, trotz der größeren Schichtanzahl, einen hydrodynamischen Durchmesser von 138 nm.

Es wird angenommen, dass jede einzelne Schicht ca. 1 nm dick ist. Somit beläuft sich die reelle Schichtdicke auf circa 6 nm. Diese Annahme wird auch durch die TEM-Aufnahmen in Abbildung 6.5 bestätigt.

In Tabelle 6.1 sind die ermittelten hydrodynamischen Durchmesser (D_{hydro}) sowie die dazugehörigen Werte der Polydispersität σ von (PAH / PAA)-beschichteten Partikeln aufgelistet.

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der Messergebnisse der DLS für die LbL-beschichteten MnZn-MNP.

funktionalisierte Nanopartikel	D_{hydro} [nm] ± Standardfehler	σ ± Standardfehler
Citrat-stabilisierte MnZn-MNP	42,6 ± 0,3	1,37 ± 0,01
PAH-MnZn-MNP	102,56 ± 0,70	1,70 ± 0,01
(PAH / PAA)-MnZn-MNP	126,32 ± 3,13	1,79 ± 0,03
(PAH / PAA / PAH)-MnZn-MNP	144,85 ± 1,39	1,63 ± 0,01
(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	142,70 ± 1,65	1,68 ± 0,01
PAH-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	142,20 ± 1,13	1,59 ± 0,01
(PAH / PAA) ₃ -MnZn-MNP	137,73 ± 3,80	1,74 ± 0,01

Der Vergleich zwischen FT-IR-Spektren der ersten sowie der zweiten Schicht und den beiden verwendeten Edukten PAH und PAA ist in Abbildung 4.62 dargestellt. Die erste adsorbierte Schicht besteht aus PAH. Die dazugehörigen charakteristischen Schwingungen der NH₃⁺-Gruppe liegen bei den Wellenzahlen 1600 cm⁻¹ und 1500 cm⁻¹ und sind der asymmetrischen und symmetrischen Deformationsschwingung zuzuordnen. Die N-H Valenzschwingung liegt bei 3330 cm⁻¹ und wird auf Grund der schwachen Intensität von den Valenzschwingungen der Wassermoleküle überlagert. Die Bande, die bei 2000 cm⁻¹ lokalisiert ist, kann der N-H⁺ Valenzschwingung zugeordnet werden. Bei der Wellenzahl 1000 cm⁻¹ liegt die C-N Valenzschwingung. Die restlichen Signale können in Kapitel 9.4 im

Anhang nachgelesen werden. Durch den Vergleich des FT-IR-Spektrums von PAH-beschichteten Partikeln mit dem von ungebundenem PAH kann eindeutig von einer erfolgreichen Adsorption von PAH an die Partikeloberfläche ausgegangen werden.

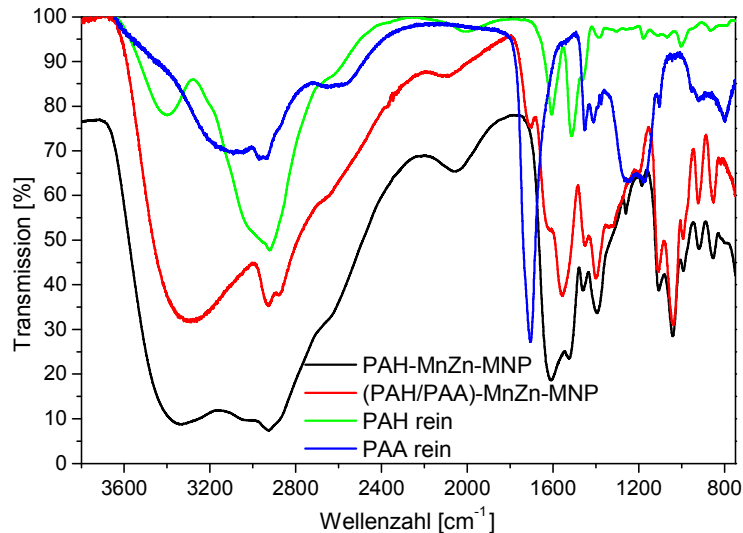


Abbildung 4.62: FT-IR-Spektren der ersten Schicht bestehend aus PAH und der Multischichtsysteme, aufgebaut aus PAH und PAA sowie die Ausgangsprodukte PAH und PAA.

Die charakteristische Gruppe bei beschichteten Partikeln, deren äußerste Schicht PAA darstellt, ist die deprotonierte Carboxyl-Gruppe. Auch hier fällt die O-H Valenzschwingung mit den Valenzschwingungen der Wassermoleküle zusammen und kann somit nicht eindeutig zugeordnet werden. Die C=O Valenzschwingung der Carboxyl-Gruppe liegt bei der Wellenzahl 1710 cm^{-1} . Die asymmetrische Valenzschwingung von COO^- hat eine intensive Signalbande bei 1570 cm^{-1} und darf nicht mit der zuvor beschriebenen Valenzschwingung der NH_3^+ -Gruppe verwechselt werden. Auch hier können die weiteren Absorptionsbanden im Kapitel 9.4 des Anhangs nachgeschaut werden.

Abbildung 4.63 hingegen zeigt FT-IR-Spektren von beschichteten Partikeln mit einer unterschiedlichen Anzahl an Schichten. Eine sichere Identifizierung der äußersten adsorbierten Polymerschicht lässt sich anhand der FT-IR-Spektroskopie treffen. So kann die C=O Valenzschwingung der Carboxyl-Gruppe bei 1710 cm^{-1} verstärkt beobachtet werden, wenn PAA als äußerste Schicht aufgebracht ist. Im Falle von PAH als äußerster Schicht erscheint die signifikante Bande der N-H⁺ Valenzschwingung (2000 cm^{-1}). Durch den Nachweis der charakteristischen Banden von PAA im Spektrum der (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP ist die Adsorption des Polyanions erfolgreich verlaufen.

Neben den Absorptionsbanden von PAA können ebenfalls die Signale von PAH nachgewiesen werden. Jedoch weisen diese nur eine geringe Intensität auf, da es sich um

die darunterliegende Schicht handelt. Die FT-IR-Spektren sind somit eine Kombination von Schwingungen des gesamten Multischichtsystems, wobei jeweils die äußerste Schicht die Signal-intensivsten Banden bildet.

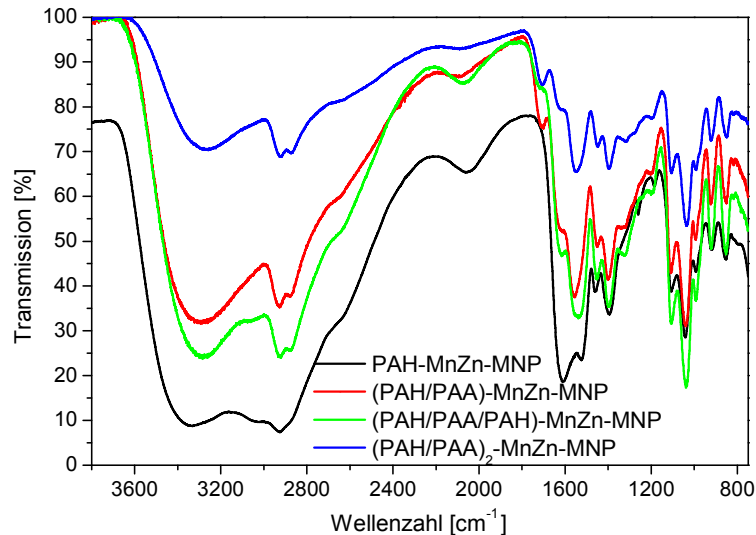


Abbildung 4.63: Gegenüberstellung von typischen FT-IR-Spektren der ersten vier Schichten auf den MnZn-MNP. Die einzelnen Spektren zeigen jeweils die Adsorption des entsprechenden Polyelektrolyts.

Ein FT-IR-Spektrum der ersten bis zur sechsten Schicht von (PAH / PAA)₃-Multischichtsystemen kann in Kapitel 9.6 nachgeschaut werden.

Anhand eines FT-IR-Spektrums kann somit der qualitative Nachweis der Absorption des Polykations oder des Polyanions erbracht werden.

Weiterhin gibt die Messung des Zetapotentials der LbL-beschichteten Partikel Aufschluss über die erfolgreiche Adsorption des jeweiligen Polyelektrolyts. Je nach äußerster Polyelektrolytschicht wird ein positives bzw. negatives Zetapotential gemessen. So ist das Zetapotential der beschichteten Partikel mit Polykation als äußerste adsorbierter Schicht positiv, wohingegen das Zetapotential negativ ist, sobald das Polyanion die äußerste Schicht bildet. Die Ergebnisse von Zetapotential-Messungen sind in Abbildung 6.3 visualisiert. Bei den Messergebnissen handelt es sich um eine 5-fache Bestimmung mit anschließender arithmetischer Mittlung.

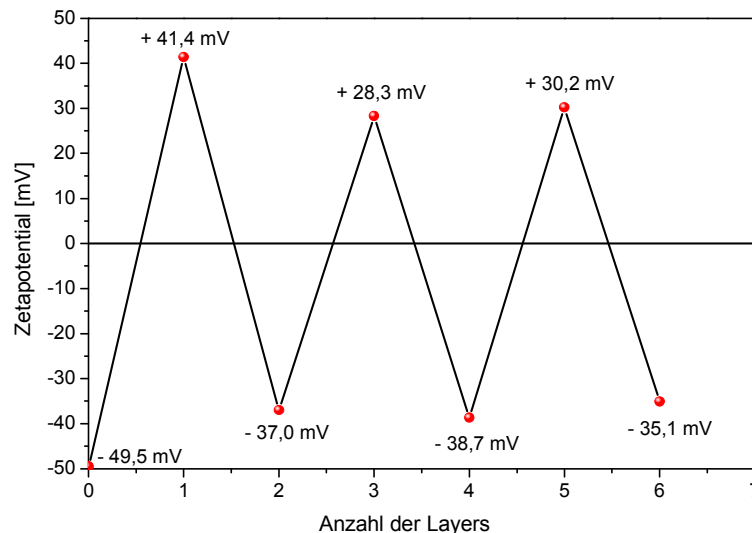


Abbildung 6.3: Auftragung von gemessenen Zetapotentialen als Funktion der Schichtanzahl. Es ist eine Ladungsinversion nach jeder neu adsorbierten Schicht zu erkennen.

Die Citrat-stabilisierten MnZn-MNP weisen ein negatives Potential von $-49,5 \text{ mV} \pm 0,6 \text{ mV}$ auf. Nach Adsorption des Polykations PAH an die Oberfläche kommt es zu einer Ladungsinversion, welche sich durch ein positives Potential von $+41,4 \text{ mV} \pm 1,2 \text{ mV}$ äußert. Der gegenteilige Effekt ist bei der Beschichtung mit dem negativ geladenen PAA zu beobachten. Hier sinkt das Potential auf $-37,0 \text{ mV} \pm 1,0 \text{ mV}$ ab. Dieser Trend setzt sich durch hinzukommende Schichten weiter fort. Auf Grund der erhaltenen Werte des Zetapotentials kann davon ausgegangen werden, dass die Stabilisierung der Partikel rein auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht. Bei Potentialen unter $35,0 \text{ mV}$, ist die elektrostatische Wechselwirkung unter den Partikeln nur schwach ausgebildet und sie neigen vermehrt zur Agglomeration.^[174] Neben der reinen elektrostatischen Wechselwirkung würde noch die sterische Abschirmung hinzukommen.

Die Morphologie der beschichteten Partikel wird mit Hilfe von TEM-Aufnahmen untersucht. So stellt Abbildung 6.4 TEM-Aufnahmen von beschichteten MnZn-MNP dar, die sich in der Anzahl der aufgetragenen Schichten unterscheiden. Die linke Aufnahme zeigt Partikel, die nur mit PAH beschichtet sind, wohingegen die rechte Aufnahme Partikel darstellt, die mit 6 Multischichten versehen sind. Beide Aufnahmen weisen auf einen geringen Aggregationsgrad hin, welcher auch anhand der DLS-Messungen bestätigt wird. Durch Vergleichen der beiden TEM-Aufnahmen fällt auf, dass die Partikel mit steigender Schichtzahl an Unschärfe gewinnen. Diese gewonnene Unschärfe signalisiert die Anwesenheit des Polymers und somit die erfolgreiche Beschichtung der Partikel.

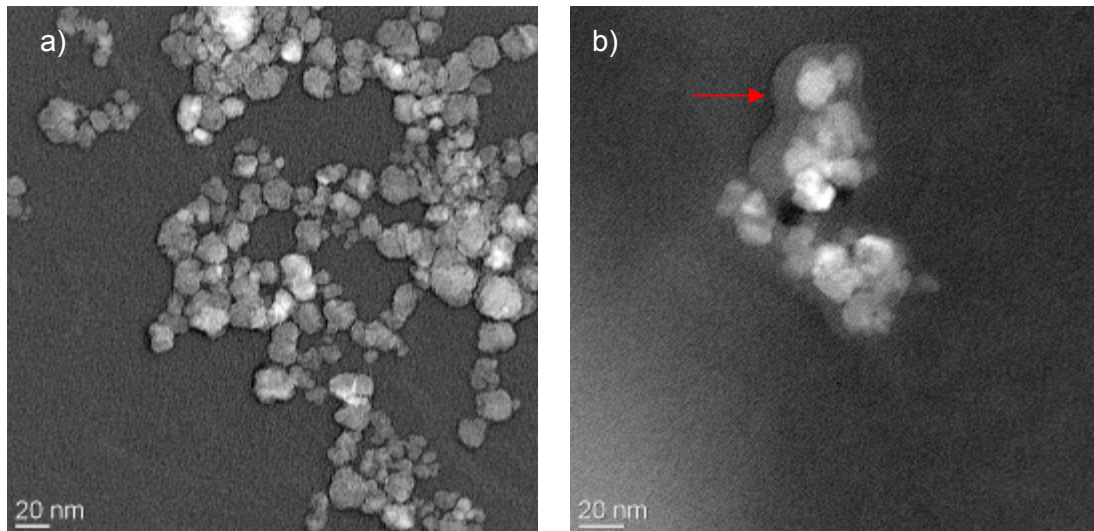


Abbildung 6.4: TEM-Aufnahmen von LbL-beschichteten MnZn-MNP a) PAH-beschichtete MnZn-MNP; Anzahl der Schichten: 1 und b) (PAH / PAA)₃-beschichtete Partikel; Anzahl der Schichten: 6.

TEM-Aufnahmen von LbL-beschichteten MnZn-MNP mit einer höheren Auflösung (siehe Abbildung 6.5) bieten die Möglichkeit, die Schichtdicke eindeutig zu bestimmen. Bei der linken Aufnahme handelt es sich um Partikel, die mit einer Monoschicht PAH beschichtet sind. Anhand der TEM-Aufnahme beläuft sich die Dicke der Schicht auf einen Nanometer.

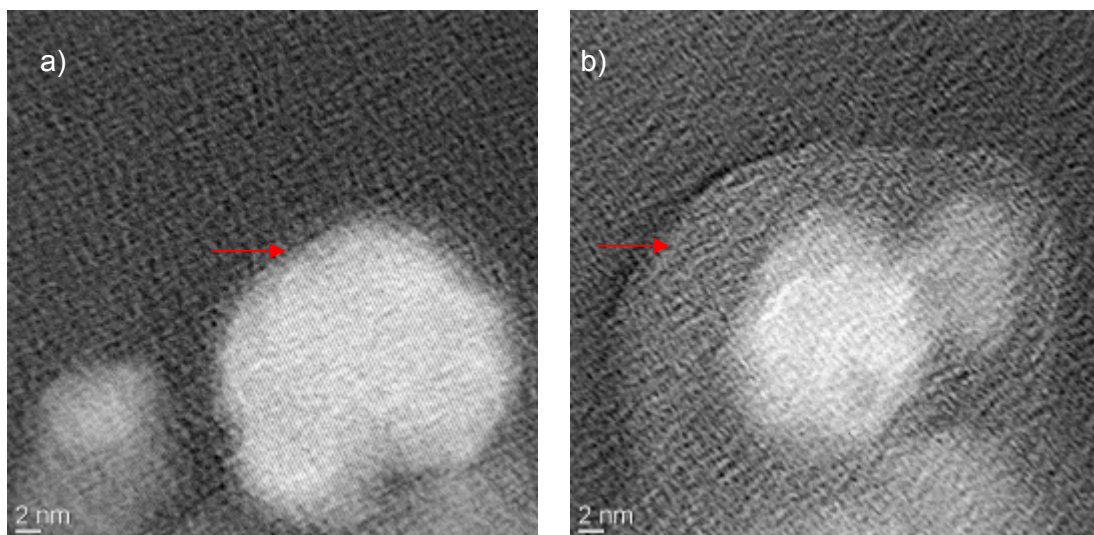


Abbildung 6.5: TEM-Aufnahmen derselben LbL-beschichteten Partikel (vgl. Abbildung 6.4) allerdings mit höherer Auflösung. a) PAH-beschichtete MnZn-MNP; eine Schicht und b) (PAH / PAA)₃-beschichtete Partikel; sechs Schichten.

Bei der rechten Aufnahme handelt es sich um Partikel mit einem Multischichtsystem bestehend aus 6 Schichten, wobei PAA die äußerste Schicht bildet. Eine Messung der Schichtdicke ergibt einen Wert von 6 nm. Weiter zeigen die TEM-Aufnahmen, dass die

Kristallinität der Partikel nach der Beschichtung unverändert bleibt. Die Gitternetzebenen sind auch nach der LbL-Deposition eindeutig erkennbar.

Durch die bisher erläuterten Charakterisierungsmethoden kann die erfolgreiche Beschichtung der Partikel mit Polyallylamin und Polyacrylsäure unter Verwendung der LbL-Deposition aufgezeigt werden. Bei den beschichteten MnZn-MNP handelt es sich um stabile Suspensionen, mit einer geringen Neigung zur Agglomeration. Weiterhin übt die Beschichtung der Partikel keinen Einfluss auf deren Morphologie aus. Außerdem konnte durch die entsprechenden TEM-Aufnahmen gezeigt werden, dass die Schichtdicke der Anzahl der adsorbierten Schichten entspricht. Die Änderung des Oberflächenpotentials nach jeder neu adsorbierten Schicht wird durch Zetapotential-Messungen ebenfalls bestätigt.

Auf Basis dieser Ergebnisse liefert dieses LbL-System optimale Voraussetzungen zur Anwendung als Drug-Delivery System. Des Weiteren soll erwähnt werden, dass sowohl PAH als auch PAA bei einem pH-Wert unter 6 langsam abgebaut werden. Dieser Sachverhalt spielt vor allem bei Krebszellen oder Tumoren eine wichtige Rolle, da diese einen pH-Wert von 4 bis 5 aufweisen. Durch diese Gegebenheit besteht die Möglichkeit, kontrolliert den Wirkstoff über einen längeren Zeitraum am Zielort freizusetzen. Auf Grund der Amino-Gruppe von PAH und der Carboxyl-Gruppe von PAA besteht zusätzlich die Möglichkeit, den Wirkstoff zwischen den einzelnen Schichten einzubauen. Die Ergebnisse der ersten Versuche zur Anbindung von Doxorubicin an Polyallylamin- und Polyacrylsäure-Schichten können in Kapitel 6.2 nachgelesen werden.

6.1.2 LAYER-BY-LAYER-DEPOSITION MITTELS POLYALLYLAMIN UND POLY(4-STYROLSULFONSÄURE-CO-MALEINSÄURE)

Wie zu Anfang von Kapitel 6 geschildert, werden in diesem Kapitel Multischichtsysteme untersucht, die aus einem schwachen und einem starken Polyelektrolyten aufgebaut sind. Dabei handelt es sich zum Einen um PAH als schwaches Polykation und zum Anderen um Poly(4-StyrolSulfonsäure-co-Maleinsäure) (PSSa-co-MA) als starkes Polyanion. Bei diesen Multischichten übt der pH-Wert keinen signifikanten Einfluss auf die Schichtdicke aus, wie bei den zuvor behandelten (PAH / PAA)-Multischichtsystemen.

Auch hier stellen DLS-Messungen die erste Analyseverfahren für das gebildete Multischichtsystem dar. Die dazugehörigen Größenverteilungskurven sind graphisch in Abbildung 6.6 dargestellt, die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 6.2 wiedergegeben.

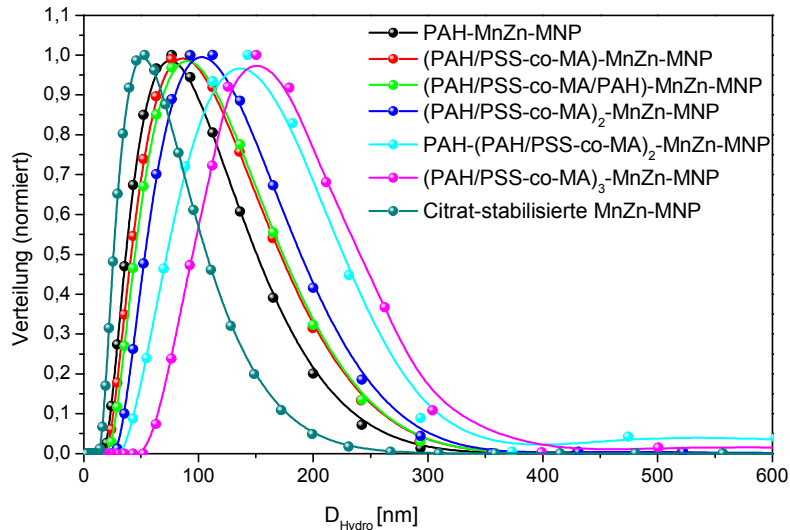


Abbildung 6.6: DLS-Messungen von (PAH / PSSa-co-MA)₃-Multischichtsystemen. Mit jeder neu hinzukommenden Schicht nimmt der hydrodynamische Durchmesser der Partikel zu.

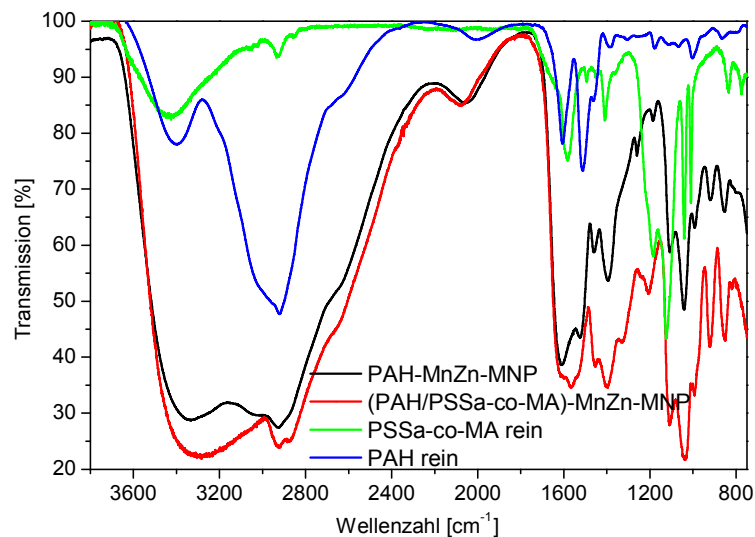
Der Durchmesser bei Adsorption der ersten Schicht am stärksten an. Im Gegensatz zu den unbeschichteten Nanopartikeln, deren hydrodynamischer Durchmesser um die 43 nm liegt, zeigen die PAH-beschichteten MnZn-MNP einen Durchmesser von 102 nm auf. Die Polydispersität dieser Partikel liegt mit 1,76 in einem akzeptablen Bereich. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass der Durchmesser bei den Partikeln, mit PAH als äußerster Schicht, immer um 8 nm bis 10 nm anwächst, wohingegen sich der Durchmesser der Partikel mit PSSa-co-MA als äußerster Schicht immer um 14 nm vergrößert. Die Ursache dafür liegt in der unterschiedlichen Struktur der Polyelektrolyte begründet. Während PAH strukturell gesehen keine Besonderheiten aufweist, liegen beim PSSa-co-MA auf Grund des Styrols und der Sulfonsäure-Gruppe komplexere Strukturgebilde vor, die somit einen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser ausüben.

Des Weiteren besteht eine starke Wechselwirkung zwischen Sulfonsäure-Gruppe und Wasser und dies führt zu einer Vergrößerung der Solvathülle. Diese Tatsachen spiegeln sich auch in den Messergebnissen wider. Da diese Gruppen ebenfalls mit dem Medium in Wechselwirkung stehen, vergrößert sich die Solvathülle der Partikel. Die Werte der Polydispersität verbessern sich, wodurch der Aggregationsgrad durch die Anlagerung weiterer Schichten nicht gesteigert wird.

Tabelle 6.2: Zusammenfassung von DLS-Messergebnissen der (PAH / PSSa-co-MA)-beschichteten Nanopartikeln.

funktionalisierte Nanopartikel	D_{hydro} [nm] ± Standardfehler	σ ± Standardfehler
Citrat-stabilisiertes Ferrofluid	42,6 ± 0,3	1,37 ± 0,01
PAH-MnZn-MNP	101,80 ± 0,85	1,76 ± 0,01
(PAH / PSS-co-MA)-MnZn-MNP	115,09 ± 1,10	1,76 ± 0,01
(PAH / PSS-co-MA / PAH)-MnZn-MNP	127,56 ± 0,99	1,71 ± 0,01
(PAH / PSS-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	143,44 ± 0,99	1,65 ± 0,01
PAH-(PAH / PSS-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	154,08 ± 1,89	1,58 ± 0,01
(PAH / PSS-co-MA) ₃ -MnZn-MNP	168,55 ± 0,90	1,46 ± 0,01

Die entsprechenden FT-IR-Spektren der diversen adsorbierten Multischichten sind in Abbildung 6.7 und Abbildung 6.8 wiedergegeben. Die FT-IR-Spektren in Abbildung 6.7 zeigen die Absorptionsbanden der ersten und zweiten Schicht von Multischichtsystemen im direkten Vergleich mit den dazugehörigen Spektren von reinem PAH und PSSa-co-MA.

**Abbildung 6.7:** FT-IR-Spektren der ersten und zweiten Schicht von (PAH / PSSa-co-MA)-Multischichtsystemen sowie die Spektren von nativem PAH und PSSa-co-MA.

Als erste Schicht kommt erneut das Polykation PAH zum Einsatz. Die charakteristischen Schwingungen der NH_3^+ -Gruppe liegen bei den Wellenzahlen 1606 cm^{-1} und 1525 cm^{-1} und kommen auf Grund von asymmetrischen und symmetrischen Deformationsschwingungen zustande. Wie bereits erwähnt, überlagern sich die Schwingungen der OH-Gruppe der Wassermoleküle mit den N-H Valenzschwingungen der Amino-Gruppe. Die Bande bei

2040 cm^{-1} beruht auf der N-H^+ Valenzschwingung und der Peak bei 1040 cm^{-1} auf der C-N Valenzschwingung. Die restlichen Signale können in Kapitel 9.4 des Anhangs nachgeschlagen werden.

Die Schwingungen des reinen PSSa-co-MAs sind zum Einen auf dem aromatischen Ringsystem des Styrols und zum Anderen auf der vorhandenen Sulfonsäure-Gruppe begründet. Auf Grund der geringen Konzentration an Carboxyl-Gruppen sind diese Schwingungen nur von schwacher Intensität und fallen daher mit den anderen Schwingungen des Polyelektrolytens zusammen. So kann zum Beispiel die Schulter (1700 cm^{-1}) der Bande bei 1600 cm^{-1} der C=O Valenzschwingung der Carboxyl-Gruppe zugeordnet werden.

Des Weiteren signalisiert das Auftauchen des Peaks bei 1600 cm^{-1} in Verbindung mit der Bande bei 1410 cm^{-1} die Valenzschwingungen der deprotonierten Carboxyl-Gruppe. Somit stellt die Bande bei 1600 cm^{-1} eine Kombination der Valenzschwingung der COO^- -Gruppe sowie der C=C Valenzschwingung des Aromatens dar. Die C=C Valenzschwingungen des aromatischen Ringsystems liegen zum Einen bei 1587 cm^{-1} und zum Anderen bei 1497 cm^{-1} und 1445 cm^{-1} . Die zwei scharfen Banden bei 1039 cm^{-1} und 1010 cm^{-1} resultieren aus der in-plane C-H Deformationsschwingung des Aromatens. Das Signal bei 773 cm^{-1} ist eine Kombination der out-of-plane C-H Deformationsschwingung sowie der in-plane C-C-C Ringdeformationsschwingung. Bezogen auf die Sulfonat-Gruppe liegen die asymmetrischen und symmetrischen S=O Valenzschwingungen bei 1186 cm^{-1} und 1123 cm^{-1} . Die beiden Valenzschwingungen der SO_2 -Gruppe des Aromaten-Sulfonat-Systems ($\text{Ar-SO}_2\text{-OR}$) liegen bei 1363 cm^{-1} und 1186 cm^{-1} . Bei der Wellenzahl 832 cm^{-1} befindet sich die S-O-C Valenzschwingung.

Werden die Schwingungen von PSSa-co-MA-beschichteten MnZn-MNP betrachtet, so spiegeln sich die Schwingungen des Aromatens (1606 cm^{-1} , 1563 cm^{-1} , 1454 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} und 1006 cm^{-1}) sowie der Aromaten-Sulfonat-Gruppe / Sulfonsäure-Gruppe (1331 cm^{-1} , 1197 cm^{-1} , 1109 cm^{-1} und 820 cm^{-1}) von PSSa-co-MA in diesem Spektrum wider. Weiterhin ist die Valenzschwingung der deprotonierten Carboxyl-Gruppe bei 1606 cm^{-1} und bei 1400 cm^{-1} zu erkennen. Die breite Bande bei 2085 cm^{-1} ist nicht zu verwechseln mit der N-H^+ Valenzschwingung von PAH. In diesem Fall repräsentiert sie die O-H Valenzschwingung der hydratisierten Sulfonsäure-Gruppe ($\text{SO}_3^-\text{H}_3\text{O}^+$).

Abbildung 6.8 zeigt die FT-IR-Spektren der ersten vier Schichten des Multischichtsystems (PAH / PSSa-co-MA)₂ der beschichteten Partikel. Die Änderungen des FT-IR-Spektrums in Abhängigkeit des Polyelektrolytens der äußersten Schicht, sind eindeutig mit Hilfe dieser Abbildung erkennbar. Bildet PAH die äußerste Schicht, so treten die charakteristischen Schwingungen der protonierten NH_2 -Gruppe (2040 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} und 1520 cm^{-1}) im Spektrum in den Vordergrund. Wohingegen bei den Partikeln, deren äußerste Schicht das

PSSa-co-MA darstellt, die Schwingungen des Aromatensystems (1565 cm^{-1} , 1453 cm^{-1} , 1032 cm^{-1} und 1004 cm^{-1}) sowie der Aromaten-Sulfonat-Gruppe und Sulfonsäure-Gruppe (1327 cm^{-1} , 1207 cm^{-1} , 1110 cm^{-1} und 815 cm^{-1}) verstärkt auftreten.

Ebenfalls erkennen, lassen die Absorptionsbanden der darunterliegenden Schichten. Allerdings zeigen die Schwingungen vom Polyelektrolyten, der die äußerste Schicht bildet, die intensivsten Signale.

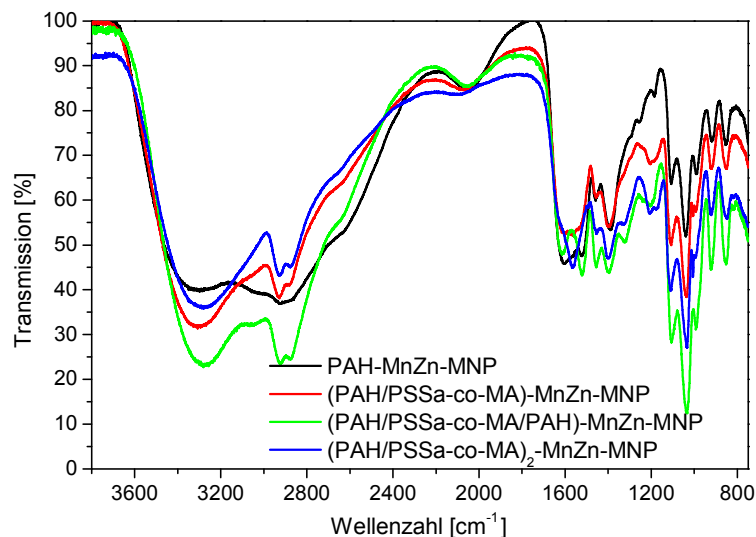


Abbildung 6.8: Typische FT-IR-Spektren von MnZn-MNP mit bis zu vier Schichten im direkten Vergleich zueinander. Die Spektren zeigen eindeutige die Beschichtung der Partikel mit dem jeweiligen Polyelektrolyten auf.

Ein FT-IR-Spektrum der ersten bis zur sechsten Schicht von $(\text{PAH} / \text{PSSa-co-MA})_3$ -Multischichtsystemen kann in Kapitel 9.6 nachgeschaut werden.

Die entsprechenden Messungen des Oberflächenpotentials der Multischichtsysteme sind in Abbildung 6.9 graphisch dargestellt. Im Gegensatz zu $(\text{PAH} / \text{PAA})$ -Multischichtsystemen, ist bei $(\text{PAH} / \text{PSSa-co-MA})$ -Systemen die Änderung des Zetapotentials weniger stark ausgeprägt.

Das Potential sinkt zwar bei den Partikeln, deren äußerste Schicht das Polyanion bildet, bleibt jedoch im positiven Bereich. Eine Ursache dafür könnte ein möglicher Ionenaustausch der Carboxyl- sowie der Sulfonsäure-Gruppen durch Natrium sein. Diese Gruppen haben in diesem Fall keinen Einfluss auf das Potential, da sie nach außen hin neutral wirken. Dennoch ist bei den Partikeln, mit PAH als äußerster Schicht, ein Anstieg des Oberflächenpotentials zu verzeichnen. Auch hier deuteten die Potentiale auf eine elektrostatische Stabilisierung hin. Ausnahme bildet das Zetapotential von $(\text{PAH} / \text{PSSa-co-MA})_3$ -beschichteten Partikeln, dieses liegt unter 35 mV und zeigt somit eine schwächere elektrostatische Stabilisierung.

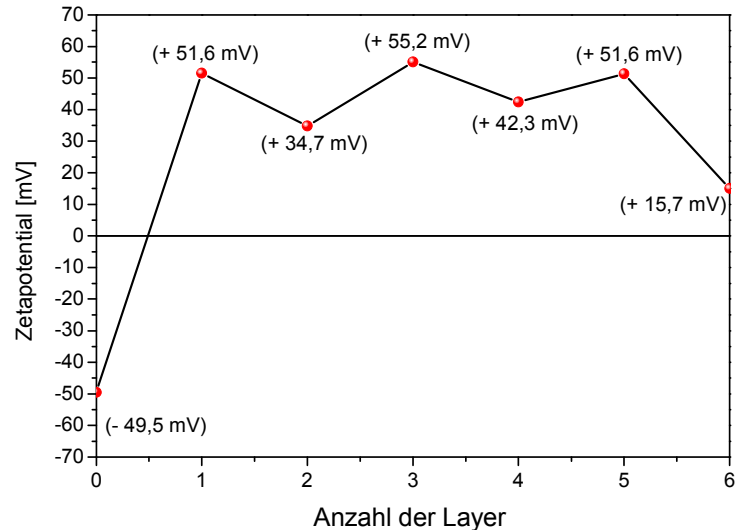


Abbildung 6.9: Auftragung von gemessenen Zetapotentialen als Funktion der Schichtanzahl. Das Zetapotential ändert sich mit jeder neu dazukommenden Schicht.

In Abbildung 6.10 sowie in Abbildung 6.11 sind verschiedene TEM-Aufnahmen der beschichteten MnZn-MNP visualisiert. Anhand der in Abbildung 6.10 gezeigten Aufnahmen weisen die Partikel, trotz variierender Schichtanzahl, keine Unterschiede im Hinblick auf Form, Größe und Aggregationsverhalten auf.

Die linke TEM-Aufnahme stellt PAH-(PAH / PSSa-co-MA)₃-beschichtete MnZn-MNP dar, die rechte Abbildung (PAH / PSSa-co-MA)₂-beschichtete Nanopartikel. Abbildung 6.11 zeigt hingegen TEM-Aufnahmen von Partikeln mit unterschiedlicher Schichtanzahl in einer höheren Auflösung. Die Partikel weisen eine enge Größenverteilung auf.

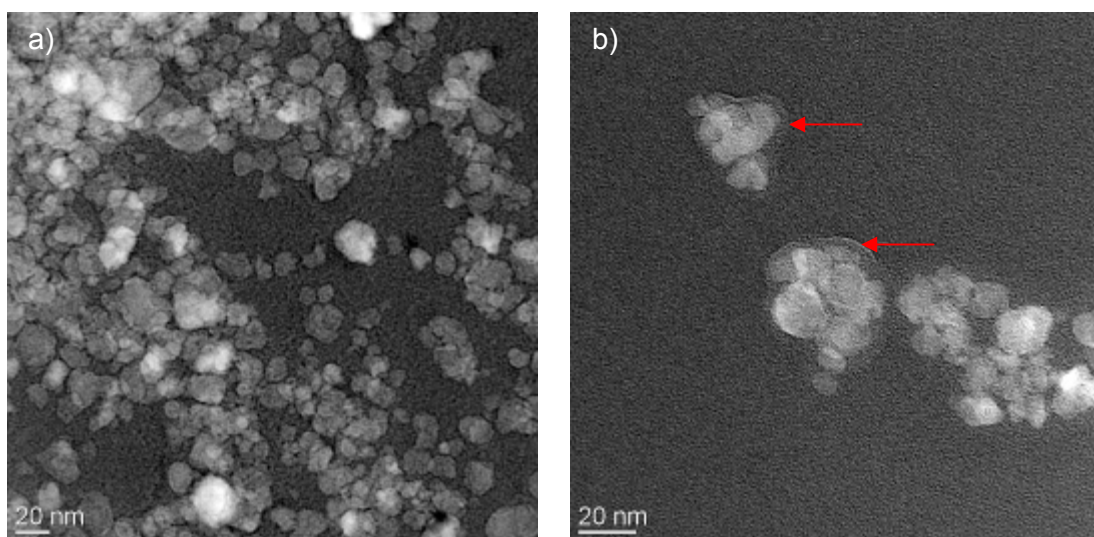


Abbildung 6.10: TEM-Aufnahmen von LbL-beschichteten Partikeln mit unterschiedlicher Schichtanzahl. a) visualisiert (PAH / PSSa-co-MA / PAH)-beschichtete MnZn-MNP; b) stellt (PAH / PSSa-co-MA)₂-beschichtete Partikel dar.

Anhand der Gitternetzebenen der beschichteten MnZn-MNP kann eine Aussage darüber getroffen werden, wo die Polymerschicht beginnt, um somit die genaue Schichtdicke zu bestimmen.

Die drei TEM-Aufnahmen in Abbildung 6.11 stellen Nanopartikel in unterschiedlichen Schichtstadien dar. Abbildung a) zeigt (PAH / PSSa-co-MA / PAH)-beschichtete MnZn-MNP, deren Dicke der Multischicht sich auf ca. 3 nm beläuft. (PAH / PSSa-co-MA)₂-beschichtete MnZn-MNP mit einer Multischichtdicke von 4 nm sind in Abbildung b) dargestellt und in Abbildung c) weisen modifizierte MnZn-MNP eine Dicke von circa 5 nm auf. Hierbei handelt es sich um PAH-(PAH / PSSa-co-MA)₂-beschichtete MnZn-MNP. Anhand dieser Aufnahmen wird deutlich, dass die Schichtdicke mit der Anzahl der Schichten korreliert.

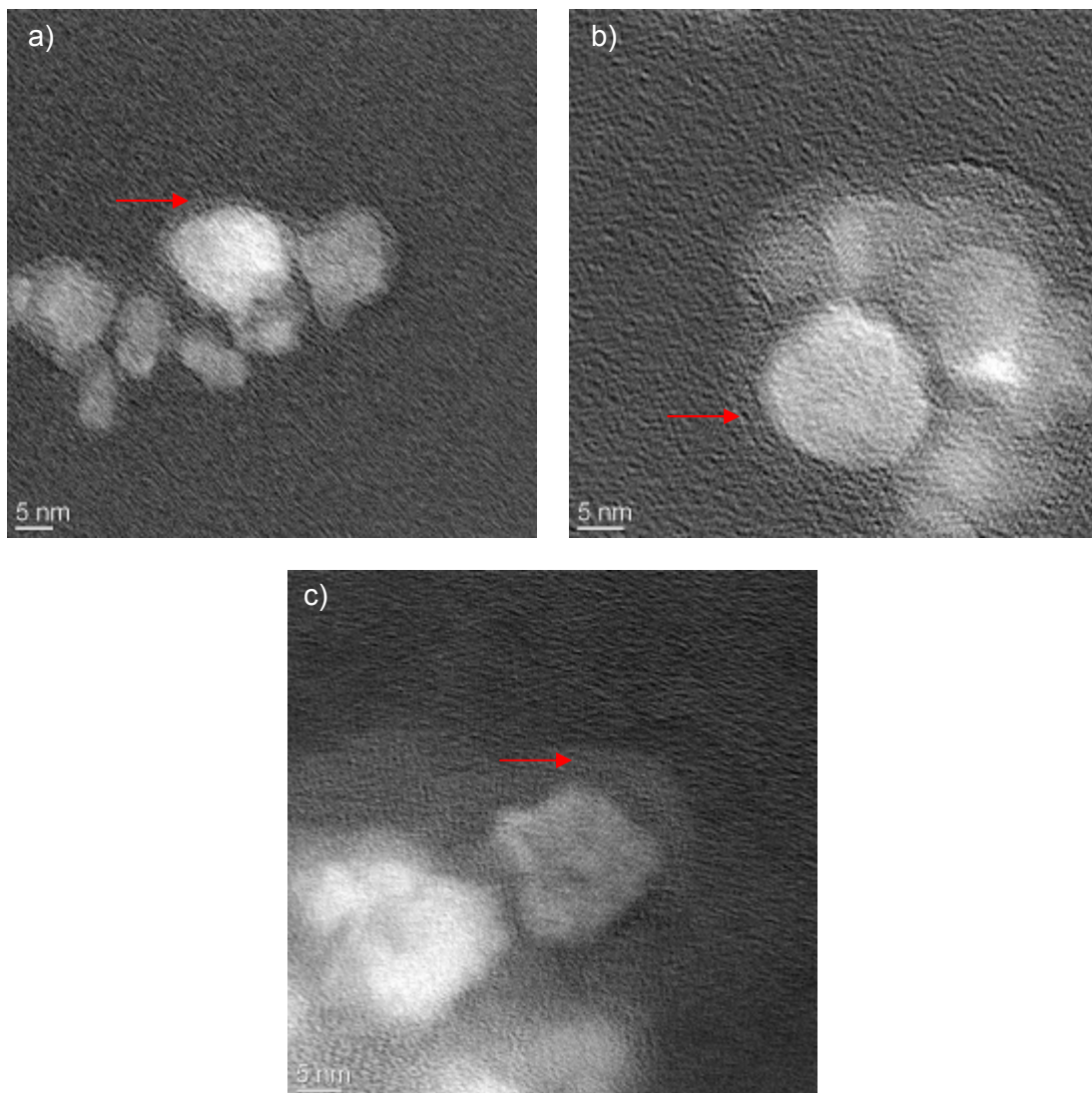


Abbildung 6.11: Hochauflösende TEM-Aufnahmen von LbL-beschichteten Partikeln in unterschiedlichen Schichtstadien. a) (PAH / PSSa-co-MA / PAH)-beschichtete MnZn-MNP; b) (PAH / PSSa-co-MA)₂-beschichtete Partikel und c) PAH-(PAH / PSSa-co-MA)₂-beschichtete MnZn-MNP. Eine Zunahme der Multischichtdicke ist in Abhängigkeit der adsorbierten Schichten eindeutig zuerkennen.

Die erfolgreiche Beschichtung der Partikel mittels PAH und PSSa-co-MA kann ebenfalls nachgewiesen werden und es handelt sich ebenfalls, bei den (PAH / PSSa-co-MA)-beschichteten MnZn-MNP um stabile Suspensionen, mit einer geringen Neigung zur Agglomeration. Weiterhin übt die Beschichtung der Partikel keinen Einfluss auf die Morphologie der Partikel aus. Die Gitternetzebenen sind zweifellos nachweisbar. Die DLS-Messungen zeigen, dass der Durchmesser von Partikeln, mit PAH als äußerster Schicht, um 8 nm bis 10 nm ansteigen, während sich der Durchmesser der Partikel mit PSSa-co-MA immer um 14 nm erhöht. Allerdings zeigen die PAH und PSSa-co-MA nur eine geringe Änderung der Oberflächenladung, welches auf die Versalzung der Säure-Gruppen zurückzuführen werden kann. Trotz geringer Änderungen weisen auch hier die Zetapotential-Messungen auf eine erfolgreiche Beschichtung der Nanopartikel mit dem entsprechenden Polyelektrolyten hin.

6.1.3 AUFBAU EINES MULTISCHICHTSYSTEMS MITTELS POLYETHYLENIMIN UND POLY(4-STYROLSULFONSÄURE-CO-MALEINSÄURE)

Das letzte untersuchte Schichtsystem, welches näher betrachtet werden soll, ist die LbL-Deposition aus Polyethylenimin (PEI) und PSSa-co-MA. Es handelt sich um ein System, bestehend aus einem schwachen und starken Polyelektrolyten, allerdings nimmt Polyethylenimin unter den Polymeren eine Sonderstellung ein.

Auf Grund des Verzweigungsgrads werden Polyethylenimine in lineare und verzweigte Gruppen unterteilt. So besitzen lineare Polyethylenimine hauptsächlich sekundäre Amine, wohingegen die verzweigte Variante primäre, sekundäre und tertiäre Amino-Gruppen aufweist. Bei den verzweigten Polymeren, welche verwendet werden, erhöht sich die Effektivität von PEI mit steigendem Molekulargewicht und zugleich übt der pH-Wert keinen signifikanten Einfluss auf das Polymer mehr aus. Somit kann verzweigtes PEI als starker Polyelektrolyt angesehen werden. Diese Pufferkapazität des PEIs ist zum Einen bedingt durch die vorhandenen Amino-Gruppen und zum Anderen durch die zusätzlich auftretende hohe Ladungsdichte.

Ein Nachteil von PEI ist allerdings seine Toxizität, die sich aber durch bestimmte Faktoren abschwächen lässt. In der Minimierung der Toxizität spielen vor allem das Molekulargewicht, der Grad der Verzweigung und das Zetapotential eine wesentliche Rolle.^[139, 175] Trotzdem wird PEI in vielen Bereichen der Medizin als Transportmittel auf Grund der guten Transfektionseffizienz eingesetzt. Die Ursache dieser Effizienz liegt in der hohen Pufferkapazität bei physiologischen und leicht sauren pH-Werten begründet^[176] sowie in der

hohen Basizitätskonstante, die auf Grund der räumlichen Wechselwirkung der benachbarten Amino-Gruppen zustande kommt.^[177]

Die zuvor genannten Eigenschaften spielen bei dem Protonenschwamm-Effekt eine entscheidende Rolle. Dieser Effekt wird vor allem zur Material-Freisetzung aus Endosomen verwendet, da er auf den unterschiedlichen pH-Werten beruht, die in den Endosomen und der Zelle vorkommen. So herrscht im Endosom ein niedrigerer pH-Wert als in der Zelle selbst. Fällt der pH-Wert im Endosom weiter ab, kann PEI die einströmenden Protonen puffern. Dadurch entsteht ein Ladungsgradient, den die Zelle versucht, durch den erhöhten Transport an Chlorid-Ionen aus dem Zytoplasma in das Endosom auszugleichen. Dies hat zur Folge, dass der osmotische Druck innerhalb des Endosoms ansteigt und es so zu einer vermehrten Wasseradsorption kommt, die ein Anschwellen des gesamten Endosoms verursacht. Dies führt letztendlich zum Platzen des Endosoms und somit zum Freisetzen des Inhalts in das Zytoplasma.^[178] Durch diese Besonderheit eignet sich PEI sehr gut als Transportmittel für Wirkstoffe und sorgt gleichzeitig für eine kontrollierte Abgabe.

Die in Abbildung 6.12 gezeigten Verteilungskurven zeigen Ergebnisse von DLS-Messungen der hergestellten (PEI / PSSa-co-MA)-beschichteten MnZn-MNP. Die Ergebnisse der Größenverteilungsberechnung sind in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

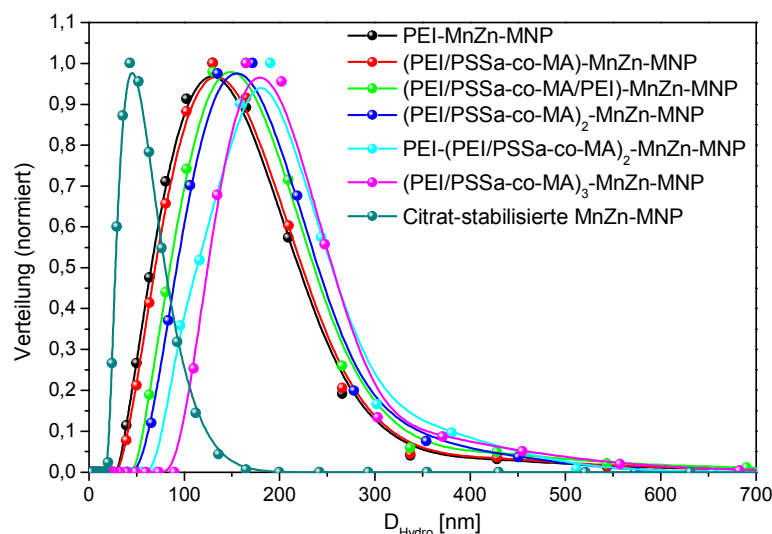


Abbildung 6.12: DLS-Messungen von (PEI / PSSa-co-MA)₃-Multischichtsysteme. Mit jeder neu hinzukommenden Schicht nimmt der hydrodynamische Durchmesser der Partikel zu.

Hier fällt auf, dass sich der Durchmesser der PEI-beschichteten Partikel im Gegensatz zu den unbeschichteten Nanopartikeln verdreifacht. Der hydrodynamische Durchmesser steigt bis auf 153 nm an. Eine mögliche Ursache dafür könnte die verzweigte Struktur des PEIs sein, wodurch es zu einer verstärkten Aggregation der Partikel kommen kann. Danach vergrößert sich der Durchmesser bei jeder neu dazugekommenen Schicht im Durchschnitt

um 8 nm und liegt am Ende für die (PEI / PSSa-co-MA)₃-beschichteten MnZn-MNP bei 193 nm. Allerdings ist die Vergrößerung des Durchmessers bei den Partikeln, deren äußerste Schicht PEI bildet, am stärksten ausgeprägt und liegt zwischen 13 nm und 18 nm. PSSa-co-MA gilt im Allgemeinen als starker Polyelektrolyt, der die volle Ladungsdichte über einen weiten pH-Bereich aufweist und somit dünne gleichmäßige Schichten ausbildet. Diese Tatsache spiegelt sich auch in den Messergebnissen der dynamischen Lichtstreuung wieder. Die Änderung des Durchmessers bei den Partikeln, deren äußerste Schicht aus PSSa-co-MA besteht, liegt im Durchschnitt bei 3 nm.

Die Werte für die Polydispersität liegen in einem angemessenen Bereich. Jedoch steigt der Wert bei der ersten Schicht mit 1,64 am stärksten an und sinkt mit jeder weiter dazukommenden Schicht schließlich bis auf 1,33 (6. Schicht) ab. Dies deutet darauf hin, dass sich das Aggregationsverhalten bei der Bildung der ersten Schicht am meisten verändert und auf die verzweigten Struktur des PEIs zurückgeführt werden kann. Nachdem die erste Schicht ausgebildet ist, legt sich jede weitere Schicht auf die erste Schicht, wodurch das Aggregationsverhalten der Partikel nicht mehr geändert wird.

Tabelle 4.11: Zusammenfassung der DLS-Ergebnisse von (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsystemen.

funktionalisierte Nanopartikel	D_{hydro} [nm] ± Standardfehler	σ ± Standardfehler
Citrat-stabilisierte MnZn-MNP	42,6 nm ± 0,3	1,37 ± 0,01
PEI-MnZn-MNP	152,59 ± 1,88	1,64 ± 0,01
(PEI / PSSa-co-MA)-MnZn-MNP	155,98 ± 1,77	1,61 ± 0,01
(PEI / PSSa-co-MA / PEI)-MnZn-MNP	167,14 ± 1,31	1,51 ± 0,01
(PEI / PSSa-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	172,11 ± 1,10	1,47 ± 0,01
PEI-(PEI / PSSa-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	190,63 ± 1,87	1,42 ± 0,01
(PEI / PSSa-co-MA) ₃ -MnZn-MNP	192,49 ± 1,31	1,33 ± 0,01

Abbildung 6.13 zeigt aufgenommene FT-IR-Spektren der ersten und zweiten Schicht der (PEI / PSSa-co-MA)-modifizierten MnZn-MNP im Vergleich zu den beiden Edukten. Ein FT-IR-Spektren mit 6 verschiedenen Schichten der (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsysteme kann in Kapitel 9.6 des Anhangs eingesehen werden. Die Schwingungen des PEIs, die eingehender betrachtet werden sollen, sind die Schwingungen hervorgerufen durch die funktionellen Gruppen der primären, sekundären und tertiären Amine. Die Absorptionsbande der N-H Valenzschwingung liegt bei 3200 cm⁻¹ und die der C-H Valenzschwingung der NCH-Gruppe bei 2800 cm⁻¹. Primäre Amine haben eine Bande bei 1585 cm⁻¹, bedingt durch N-H Deformationsschwingungen, und ein Signal bei 1040 cm⁻¹, welches auf Grund der

C-N Valenzschwingungen zustande kommt. Des Weiteren hat die CH_2 -Gruppe der funktionellen Gruppe $-\text{CH}_2\text{-NH}_2-$ Absorptionsbanden bei 1355 cm^{-1} und 1295 cm^{-1} , die der out-of-plane Deformationsschwingung zugeordnet werden können. Der Peak bei 1455 cm^{-1} stellt eine Kombination aus der N-H sowie aus der C-H Deformationsschwingung von primären und sekundären Aminen dar. Tertiäre Amine haben eine Bande bei 1107 cm^{-1} , die aus der C-N Valenzschwingung resultiert. Die beschichteten MnZn-MNP, deren äußerste Schicht aus adsorbierten PEI aufgebaut ist, weisen Absorptionsbanden bei 1585 cm^{-1} , 1465 cm^{-1} , 1395 cm^{-1} , 1287 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} und 1047 cm^{-1} , die mit den Signalen des reinen PEIs korrelieren. Die Adsorption des PEIs an Citrat-beschichteten MnZn-MNP ist somit erfolgreich verlaufen. Die beschichteten Partikeln, mit adsorbierten PSSa-co-MA als äußerster Schicht, zeigen dieselben charakteristischen Schwingungen wie das reine Edukt PSSa-co-MA. Die genaue Zuordnung der einzelnen Schwingungen von reinen PSSa-co-MA wurde bereits im vorangegangenen Kapitel 6.1.2 erklärt. Die charakteristischen Schwingungen können in diesem Kapitel oder in Kapitel 9.4 des Anhangs nachgeschaut werden. Die Absorptionsbanden von PEI werden in den Spektren bei den beschichteten Partikeln, deren äußerste Schicht aus PSSa-co-MA aufgebaut ist, ebenfalls nachgewiesen. Daher kann die erfolgreiche Adsorption mittels PSSa-co-MA angenommen werden.

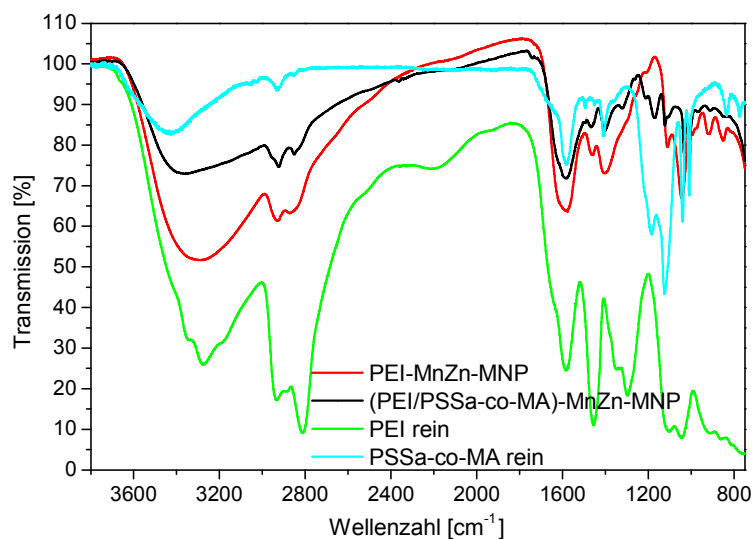


Abbildung 6.13: FT-IR-Spektren der ersten, bestehend aus PEI und der zweiten Schicht, aufgebaut aus PEI und PSSa-co-MA, des Multischichtsystems sowie die Spektren von den reinen Edukten.

In Abbildung 6.14 sind typische FT-IR-Spektren von (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsystemen wiedergegeben. Es sind jeweils die charakteristischen Absorptionsbanden der entsprechenden Polyelektrolyten zu erkennen, welche die äußerste Schicht des Systems bilden. Somit kann die erfolgreiche Adsorption jedes Polyelektrolyten an die Partikel nachgewiesen werden.

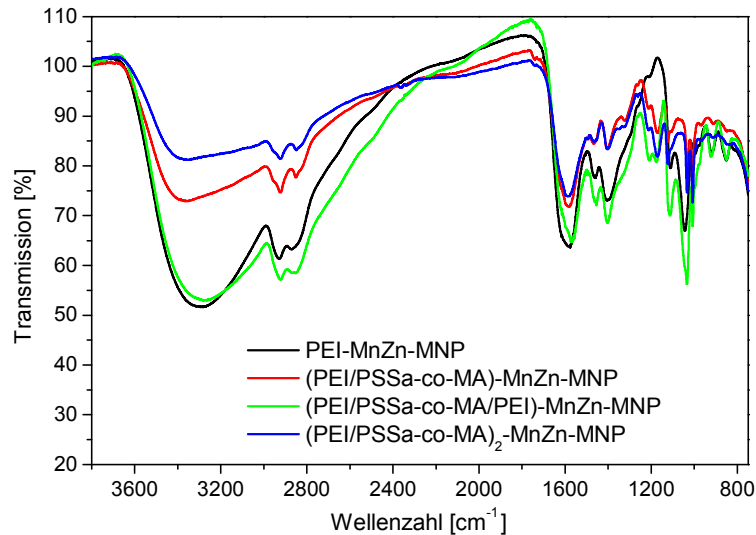


Abbildung 6.14: FT-IR-Spektren der ersten vier Schichten von (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsystemen zeigen jeweils die erfolgreiche Adsorption der neu hinzukommenden Schicht.

Die Ergebnisse der Zetapotential-Messungen sind in Abbildung 6.15 graphisch zusammengefasst. Nach der Adsorption von PEI steigt das Potential von $-56,3 \text{ mV} \pm 0,6 \text{ mV}$ auf $+27,9 \text{ mV} \pm 0,7 \text{ mV}$ an und sinkt nach der Adsorption des Polyanions, auf Grund der Ladungsinversion, wieder auf $-14,8 \text{ mV} \pm 3,0 \text{ mV}$. Dieser Trend setzt sich mit jeder neu dazukommenden Schicht fort. Obwohl eine Änderung des Potentials in Abhängigkeit des Polyelektrolyten stattfindet, liegen die Potentiale unter dem Wert für eine rein elektrostatische Stabilisierung der Partikel. So kommt neben der schwachen elektrostatischen noch die sterische Stabilisierung von PSSa-co-MA hinzu.

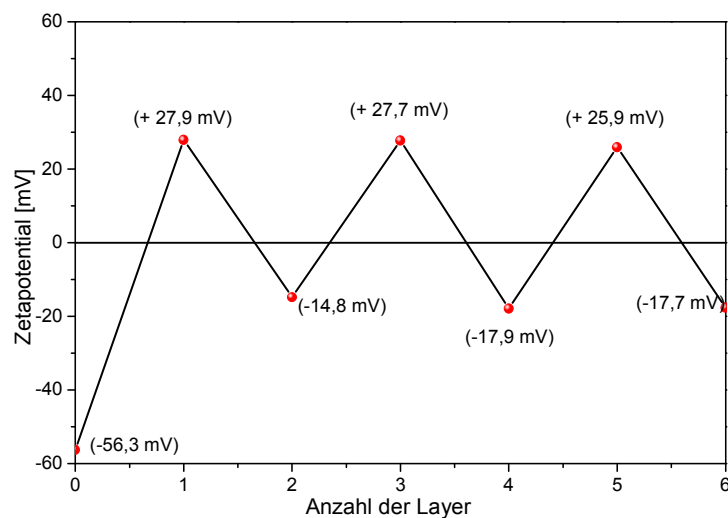


Abbildung 6.15: Auftragung von ermittelten Zetapotentialen als Funktion der Schichtanzahl von (PEI / PSSa-co-MA)-beschichteten Partikel. Nach jeder neu adsorbierten Schicht ändert sich das Zetapotential.

Die in Abbildung 6.16 gezeigten TEM-Aufnahmen visualisieren beschichtete MnZn-MNP mit variierender Schichtanzahl, die keine Unterschiede in Form, Größe und Aggregationsverhalten aufweisen. Allerdings fällt auf, dass die Partikel mit zunehmender Schichtanzahl an Unschärfe gewinnen. Dies kann auf die Präsenz der Polyelektrolyten zurückzuführen werden.

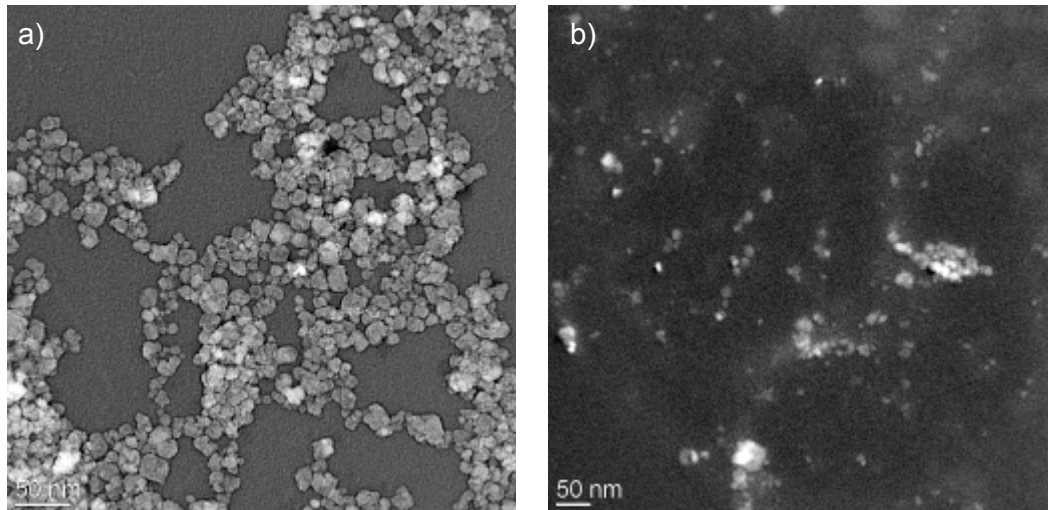


Abbildung 6.16: TEM-Aufnahmen von (PEI / PSSa-co-MA)-beschichteten Partikeln mit a) (PEI / PSSa-co-MA)-beschichtete und b) (PEI / PSSa-co-MA)₂-beschichtete MnZn-MNP.

Abbildung 6.17 veranschaulicht hochauflösende TEM-Aufnahmen von Multischichten a) zeigt PEI-beschichtete MnZn-MNP, deren Schichtdicke 1 nm ist. Hingegen zeigt Abbildung b) Partikel mit einer Schichtanzahl von 3. Die Messung der Schichtdicke ergibt einen Wert von circa 3 nm. Die Gitternetzebenen sind in beiden Beschichtungsstadien eindeutig zu erkennen.

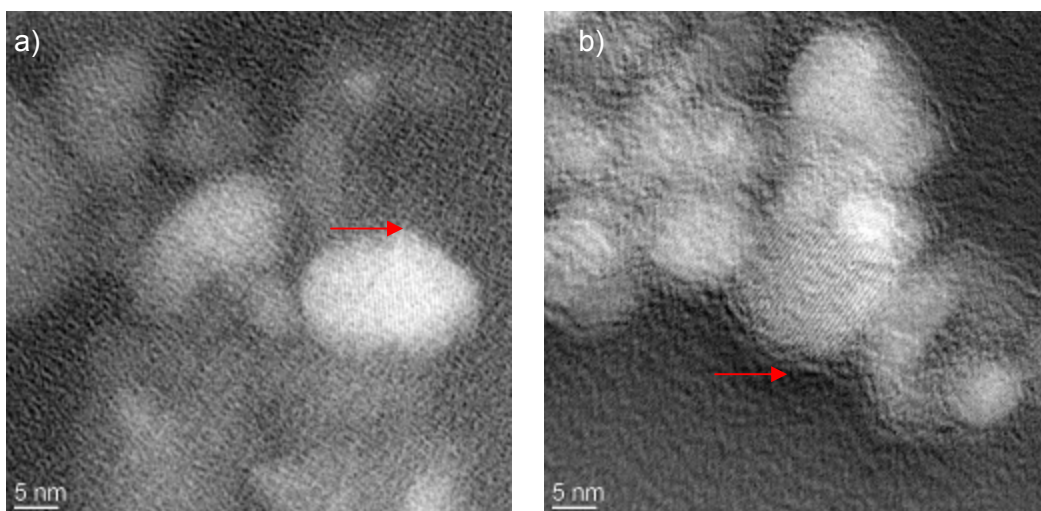


Abbildung 6.17: Hochauflösende TEM-Aufnahmen von LbL-beschichteten Partikeln. a) PEI-beschichtete MnZn-MNP; b) (PEI / PSSa-co-MA/PEI)-beschichtete Partikel.

Zusätzlich soll erwähnt werden, dass analoge Versuche zur Bildung von Multischichtsystemen bestehend aus PEI und PAA durchgeführt werden. Allerdings ist es nicht möglich, trotz Änderung bestimmter Variablen, wie beispielsweise die Konzentration des Polyelektrolyten, eine stabile Partikelsuspension zu erhalten. Das Aggregationsverhalten der Partikel änderte sich nach der dritten oder der vierten Schicht so stark, dass kurz nach der Zugabe des neuen Polyelektrolyten die Partikelsuspension zu einer zäh-viskosen schwarzen Masse agglomerierte. Diese starke Agglomeratenbildung wird anhand der angefertigten TEM-Aufnahmen in Abbildung 6.18 auch verdeutlicht. Allein der hydrodynamische Durchmesser der (PEI / PAA / PEI)-beschichteten Partikel stieg im Vergleich zu den anderen Schichtsystemen auf über 220 nm an, welches ebenfalls auf eine verstärkte Aggregation hinweist. Eine mögliche Ursache für diese Instabilität könnte das Zusammenspiel zwischen dem starken und dem schwachen Polyelektrolyten sein. Bei PAA handelt es sich um ein schwaches Polyanion, dessen Protonierungsgrad in Abhängigkeit des pH-Werts variiert. Diese protonierten COO⁻-Gruppen haben so keine Möglichkeit, vollständig zu adsorbieren und es entsteht ein Ladungsdefizit. Um die hohe Ladungsdichte von PEI auszugleichen, muss mehr Polyanion adsorbiert werden, wodurch es zur Ausbildung einer dicken voluminösen Schicht kommen kann. Dies würde auch den starken Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers erklären. In Kapitel 9.6.1 des Anhangs sind DLS-Messergebnisse sowie FT-IR-Spektren und Zetapotential-Messungen von (PEI/PAA)-Multischichtsystemen aufgeführt

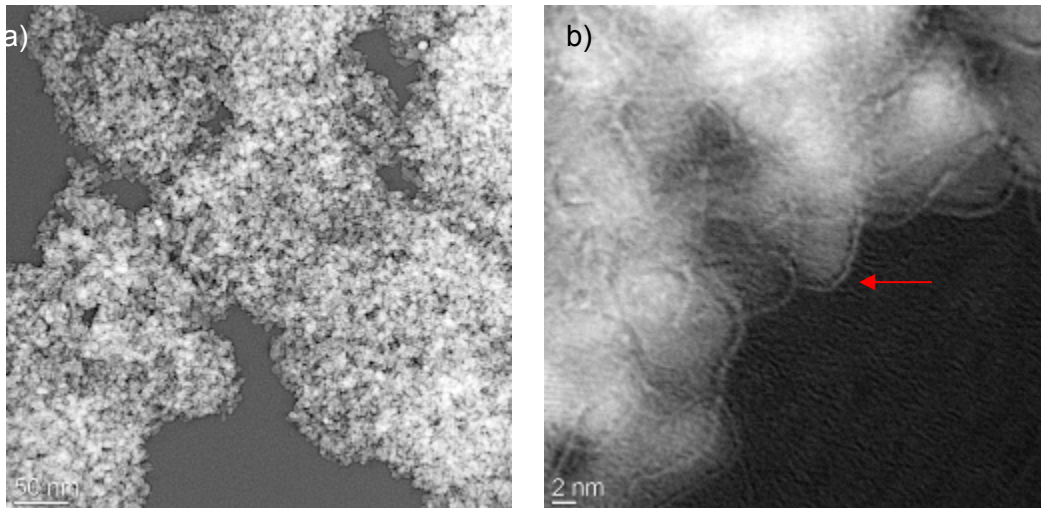


Abbildung 6.18: TEM-Aufnahmen von (PEI / PAA / PEI)-Multischichtsystemen. Das verstärkte Aggregationsverhalten ist eindeutig erkennbar.

6.2 BIOMEDIZINISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON MULTISCHICHTSYSTEMEN

6.2.1 BIOMEDIZINISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON (PAH / PSSA-CO-MA)-BESCHICHTETEN MnZn-MNP

Die in Kapitel 6.1 vorgestellten MnZn-MNP aufgetragenen Multischichtsysteme bilden die Grundlage der Drug-Delivery Systeme. Basierend auf den erzielten Ergebnissen liefern (PAH / PAA)-Multischichtsysteme die besten Voraussetzungen. Dies liegt zum Einen in der stabilen Partikelsuspension begründet, die zugleich einen geringen Aggregationsgrad aufweist und zum Anderen auf der elektrostatischen Wechselwirkung, die zwischen den MnZn-MNP und der Schicht sowie zwischen den einzelnen Schichten vorliegt.

Durch Verwendung von PAH und PAA als Polyelektrolyten kann die Anbindung des Doxorubicins an die Partikel auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Dieses spielt für spätere Verkapselungsansätze eine wichtige Rolle und stellt somit einen entscheidenden Vorteil dar. So besteht die Möglichkeit, den Wirkstoff über verschiedene Bindungen in die Schichtsysteme einzubauen, um damit eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung zu erzielen. Bildet Polyarylsäure (PAA) die äußerste adsorbierte Schicht, so erfolgt die Bindung des Doxorubicins über die primäre Amino-Gruppe. Bildet hingegen das Polykation PAH die äußerste Schicht, erfolgt die Anbindung des Wirkstoffs an das Polykation über dessen Keto-Gruppe. Die zu Grunde liegenden Reaktionsmechanismen sind eingehend in Kapitel 4.3 beschrieben. Der schematische Reaktionsweg ist in Abbildung 6.19 dargestellt.

Bevor eine Wirkstoff-Verkapselung in Erwägung gezogen werden kann, müssen im Vorfeld Versuche durchgeführt werden, mit der Zielsetzung die Stabilität sowie die erfolgreiche Anbindung des Doxorubicins an PAH und PAA aufzuzeigen. Zu diesem Zweck wird Doxorubicin an die unterschiedlichen Schichten des Multischichtsystems angebinden. So soll untersucht werden, ob sich das Verhalten der Partikel in Gegenwart des Doxorubicins, mit steigender Schichtanzahl ändert.

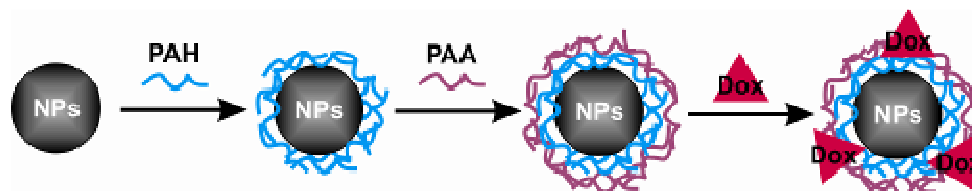


Abbildung 6.19: Schematische Darstellung der Synthese der Wirkstoff-funktionalisierten Nanopartikel. An die negativ geladene Partikeloberfläche adsorbiert zuerst das positiv geladene PAH. Nach der mit einhergehender Ladungsinversion kann das negativ geladene PAA adsorbiert werden. Die kann so lange wiederholt werden, bis die gewünschte Schichtanzahl erreicht wird.

Des Weiteren wird zusätzlich noch die Anbindung des Wirkstoffs an das Multischichtsysteme bestehend aus PEI und PSSa-co-MA durchgeführt. Auf Grund des im Kapitel 6.1.3 beschriebenen Protonenschwamm-Effekts bieten (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsysteme einen alternativen Ansatzpunkt im Drug-Delivery Bereich. Hierzu werden die 4. und die 5. Schicht des Multischichtsystems untersucht. Um die Stabilität von Doxorubicin-funktionalisierten (PAH / PAA)-Multischichtsystemen zu charakterisieren, wird die dynamische Lichtstreuung herangezogen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind zum Einen in Abbildung 6.20 graphisch dargestellt und zum Anderen in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

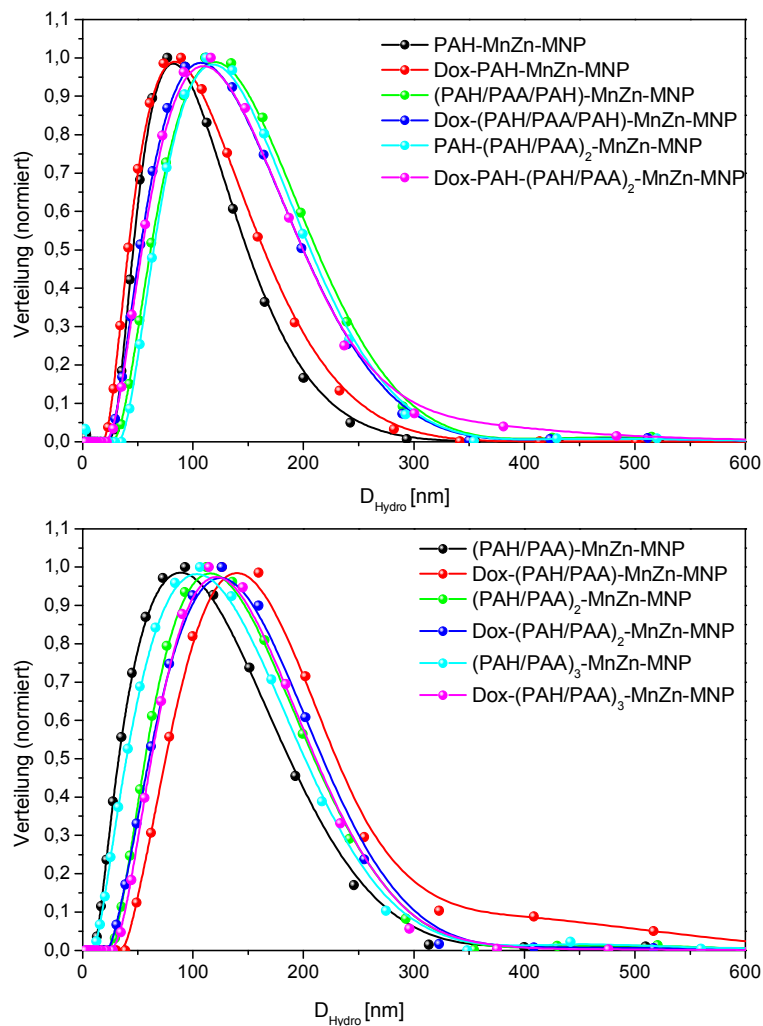


Abbildung 6.20: Größenverteilungskurven der mit Doxorubicin-funktionalisierten (PAH / PAA)-Multischicht-beschichteten MnZn-MNP. Oben: DLS-Messergebnisse von Dox-funktionalisierten MnZn-MNP; Doxorubicin ist an die äußerste PAH-Schicht, die Anzahl der darunter liegenden Schicht variiert. Unten: Messergebnisse von Dox-Multischichtsystemen, Doxorubicin bindet an die äußerste adsorbierte PAA-Schicht, die Anzahl der darunter liegenden Schichten variiert. In beiden Fällen ist eine Änderung der Partikelgröße zu verzeichnen.

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass sich der hydrodynamische Durchmesser der Partikel nach Funktionalisierung mit Doxorubicin vergrößert. Dies liegt unter anderem an der zusätzlich auftretenden Wechselwirkung des Doxorubicins mit dem umgebenden Suspensionsmedium. Bei den Doxorubicin-funktionalisierten Partikeln, deren äußerste Schicht das Polyanion darstellt, tritt der oben geschilderte Fall der Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers ein. Auch kann eine Verbesserung des Polydispersitätskoeffizientens festgestellt werden, welches auf eine zusätzliche Stabilisierung der Partikel durch den angebotenen Wirkstoff hindeutet.

Im Gegensatz dazu verkleinert sich der hydrodynamische Durchmesser nach Doxorubicin Anbindung, wenn das Polykation PAH die äußerste adsorbierte Schicht bildet. Eine Ausnahme bilden allerdings die Partikel, die ausschließlich mit nur einer PAH-Schicht beschichtet sind. Hier steigt der Durchmesser nach der Modifizierung mit Doxorubicin an. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der sich ändernde pH-Wert sein. So spielt der pH-Wert bei Doxorubicin Anbindung an die mit einer Monoschicht PAH-beschichteten MnZn-MNP zunächst keine entscheidende Rolle. Dies ändert sich jedoch mit wachsender Schichtanzahl. Die Schichtdicke, der aus zwei schwachen Polyelektrolyten bestehende Multischichtsysteme variiert in Abhängigkeit des pH-Werts.

Für die Ausbildung dünner Schichten sollte der pH-Wert zwischen 6 und 7 liegen. Allerdings weist die (PAH / PAA / PAH)-beschichtete Partikelsuspension einen pH-Wert über 7 auf, wodurch die äußerste Polykation-Schicht leicht deprotoniert vorliegt. Da Doxorubicin einen leicht aciden Charakter aufweist, kommt es zu einer Absenkung des pH-Werts auf 6,4 bis 6,6. Durch diese Änderung nimmt die Schichtdicke ab, wodurch der hydrodynamische Durchmesser der (PAH / PAA / PAH)-beschichteten Partikel verkleinert wird. Dies spiegelt sich auch in den Messergebnissen der PAH-(PAH / PAA)₅-beschichteten MnZn-MNP wider. Der Einfluss des pH-Werts auf den hydrodynamischen Durchmesser wird bereits am Beispiel der DLS-Messergebnisse von (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP in Kapitel 6.1.1 aufgezeigt.

Eine weitere alternative Erklärung für die Verkleinerung des hydrodynamischen Durchmessers nach der Doxorubicin Anbindung an die äußerste PAH-Schicht der Multischichtsysteme liegt in der erhöhten auftretenden Ladungsdichte, die zum Einen durch das Polykation PAH zustanden kommt und zum anderen auf den Wirkstoff zurückgeführt werden kann. Diese erhöhte Ladungsdichte führt dahin, dass die Schichtdicke dünner wird; folglich nimmt auch der hydrodynamische Durchmesser ab. Hingegen findet bei einer Doxorubicin-Funktionalisierung von MnZn-MNP, deren äußerste Schicht aus PAA aufgebaut ist, eine Ladungskompensation zwischen Doxorubicin und der Carboxyl-Gruppen von PAA statt. Der hydrodynamische Durchmesser vergrößert sich auf Grund der Wechselwirkung von Doxorubicin mit Wasser.

Tabelle 6.3: Zusammenfassung von Ergebnissen aus den DLS-Messungen für Doxorubicin-funktionalisierten (PAH / PAA)-beschichtete MnZn-MNP mit variierender Schichtanzahl. Hierbei sind die DLS-Ergebnisse der Doxorubicin-funktionalisierten (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP blau hervorgehoben.

funktionalisierte Nanopartikel	D_{hydro} [nm] \pm Standardfehler	σ \pm Standardfehler
PAH-MnZn-MNP	102,56 \pm 0,70	1,60 \pm 0,01
Dox-PAH-MnZn-MNP	110,76 \pm 0,92	1,73 \pm 0,01
(PAH / PAA / PAH)-MnZn-MNP	144,85 \pm 1,39	1,63 \pm 0,01
Dox-(PAH / PAA / PAH)-MnZn-MNP	135,27 \pm 1,47	1,71 \pm 0,01
PAH-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	142,20 \pm 1,13	1,59 \pm 0,01
Dox-PAH-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	136,61 \pm 1,26	1,70 \pm 0,01
(PAH / PAA)-MnZn-MNP	126,32 \pm 3,13	1,79 \pm 0,03
Dox-(PAH / PAA)-MnZn-MNP	142,34 \pm 1,50	1,58 \pm 0,01
(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	142,70 \pm 1,65	1,68 \pm 0,01
Dox-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	148,98 \pm 2,34	1,68 \pm 0,02
(PAH / PAA) ₃ -MnZn-MNP	137,73 \pm 3,80	1,94 \pm 0,01
Dox-(PAH / PAA) ₃ -MnZn-MNP	144,33 \pm 1,54	1,63 \pm 0,01

Um die Anbindung von Doxorubicin an die jeweils äußerste Schicht der Multischichtsysteme zu untersuchen, wird FT-IR-Spektroskopie verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind graphisch in Abbildung 6.21 sowie in Abbildung 6.22 visualisiert. Durch die Anbindung des Doxorubicins an die beschichteten Partikel entstehen in Abhängigkeit vom Polyelektrolyten, der die äußerste Schicht bildet (PAH oder PAA), charakteristische Bindungen. Bei Multischichtsysteme, mit PAH als äußerster Schicht, bildet sich durch die Doxorubicin Anbindung eine sekundäre Amin-Verknüpfung. Wohingegen im Fall von PAA als äußerste adsorbierter Schicht eine Säure-Amid-Bindung entsteht. Beide Verknüpfungen weisen im IR spezifische Schwingungen auf, anhand derer eine eindeutige Aussage über die erfolgreiche Anbindung des Wirkstoffs an MnZn-MNP getroffen werden kann.

So zeigt Abbildung 6.21 die Spektren, bei denen die Anbindung des Doxorubicins an die Kern / Schale-Partikel über die sekundären Amin-Verknüpfungen entstanden ist. Zusätzlich ist ein FT-IR-Spektrum von (PAH / PAA / PAH)-beschichteten MnZn-MNP zum Vergleich aufgeführt.

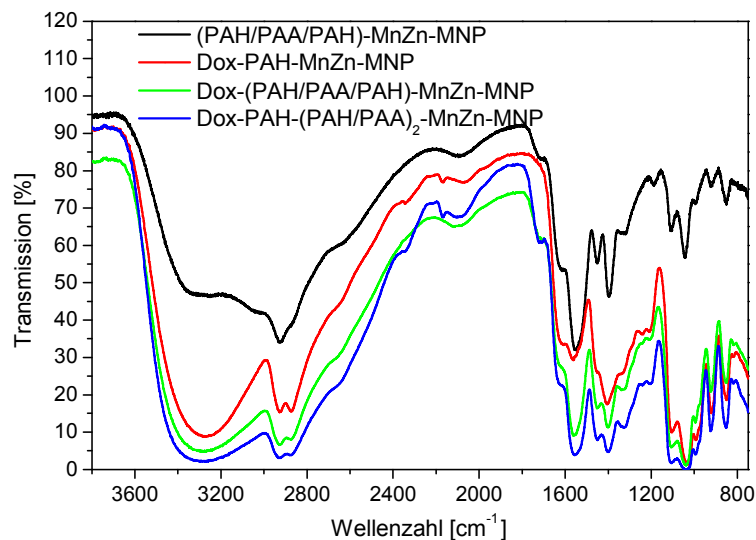


Abbildung 6.21: FT-IR-Spektren von Wirkstoff-funktionalisierten MnZn-MNP. Die Anbindung von Doxorubicin erfolgt ausschließlich an PAH. Die charakteristischen Schwingungen der gebildeten Amino-Gruppe sind eindeutig erkennbar.

Die signifikanten Absorptionsbanden resultieren hierbei aus der N-H Schwingung der sekundären Amin-Bindung des Doxorubicins an PAH. Die N-H Valenzschwingung liegt im Bereich von 3500 cm^{-1} bis 3300 cm^{-1} . Diese wird jedoch auf Grund der starken Intensität von OH-Schwingung überlagert. Die N-H Deformationsschwingung hingegen besitzt eine Bande bei 1580 cm^{-1} . Weiterhin können die Signale bei 1120 cm^{-1} und 1095 cm^{-1} der C-N Valenzschwingung von sekundären Aminen zugeordnet werden.

Bedingt durch die Synthese treten Banden auf, die der funktionellen Gruppe der Imine zugeschrieben werden können. So weisen die breiten Absorptionsbanden bei 2330 cm^{-1} und 2100 cm^{-1} auf $\text{-C=N}^+\text{-H}$ Schwingungen von protonierten Iminen hin. Die Biegeschwingung dieser funktionellen Gruppe liegt bei der Wellenzahl 1620 cm^{-1} . Das Auftreten dieser Banden bedeutet zwar, dass die Reaktion nicht vollständig verlaufen ist, allerdings werden Imine im Sauren leicht gespalten. Dies dazu führt, dass der Wirkstoff erst in den Endosomen freigesetzt wird. Somit handelt es sich bei Iminen um pH-sensitive Bindungen.

Des Weiteren liegen die Absorptionsbanden, die bedingt durch die aromatischen C=C Valenzschwingungen des Doxorubicins zustande kommen, bei 1620 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} und 1405 cm^{-1} . Die Signale bei 1620 cm^{-1} und 1560 cm^{-1} setzen sich folglich aus den Valenzschwingungen des Aromatens sowie aus Schwingungen der sekundären Amine und Imine zusammen. Diese Kombination aus den diversen Schwingungen führt zu einer Intensitätszunahme dieser Banden. Anhand der aufgeführten Absorptionsbanden kann von einer erfolgreichen Anbindung des Wirkstoffs an die äußerste PAH-Schicht der Multischichtsysteme ausgegangen werden.

Abbildung 6.22 stellt FT-IR-Spektren der Doxorubicin-funktionalisierten Nanopartikel, mit PAA als äußerster Schicht, dar. Die kennzeichnenden Schwingungen folgen aus den entstandenen Säure-Amid-Bindungen.

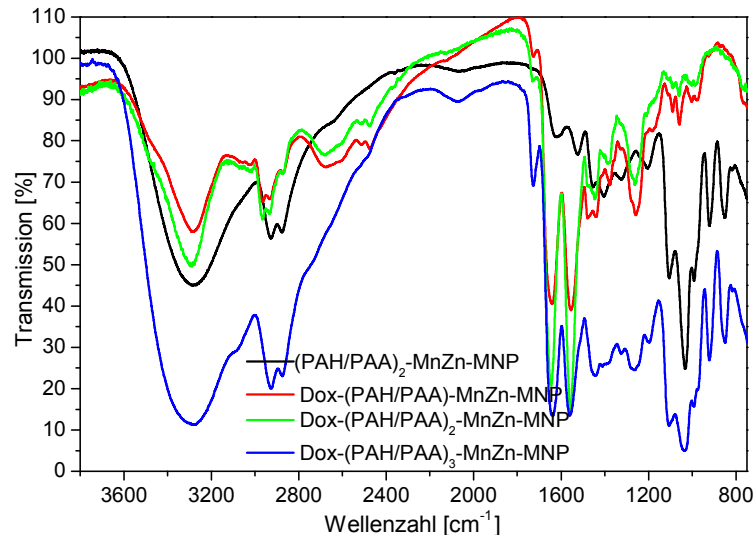


Abbildung 6.22: FT-IR-Spektren von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP. Die Anbindung des Doxorubicins erfolgt über das primäre Amin, unter Ausbildung einer Säure-Amid-Bindung an die äußerste PAA-Schicht von beschichteten Partikeln.

Die Anhäufung von Signalen bei 2665 cm^{-1} , 2520 cm^{-1} und 2477 cm^{-1} resultiert aus den Schwingungen des aromatischen Systems von Doxorubicin. Die C=O Valenzschwingung der Säure-Amid-Bindung liegt bei 1643 cm^{-1} . Es kommt zu einer Verschiebung der C=O Bande basierend auf der geringeren Elektonegativität von Stickstoff im Gegensatz zum Sauerstoff. Diese Varianz bewirkt eine Verschiebung des Signals zu niedrigeren Frequenzen hin. Die vorhandene Bande bei 1725 cm^{-1} deutet auf freie Carboxyl-Gruppen hin. Auf Grund der Konformation der Säure-Amid-Bindung kann in *cis*- und *trans*-Isomere unterschieden werden. Das intensive Signal bei 1550 cm^{-1} wird der N-H Deformationsschwingung der *trans*-Form zugeordnet. Allerdings liegt auch die C=C Valenzschwingung des Aromatens in diesem Wellenzahlbereich. Weiterhin stellt die Bande bei 1440 cm^{-1} eine Kombination der N-H Deformationsschwingung sowie der N-H Biegeschwingung der *cis*-Form dar. Des Weiteren liegt die C-N Valenzschwingung der *trans*-Form bei 1255 cm^{-1} . Wohingegen die C-N Valenzschwingung der *cis*-Form bei 1370 cm^{-1} erscheint. Die aufgenommenen FT-IR-Spektren von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP unterscheiden sich eindeutig von den Spektren der LbL-beschichteten MnZn-MNP. Durch das Vorhandensein der charakteristischen Schwingungen der Säure-Amid-Bindung kann von einer gelungenen Funktionalisierung der äußersten PAA-Schicht der Multischichtsysteme ausgegangen werden.

Auf Grund der Autofluoreszenz des Doxorubicins ($\lambda_{\text{Ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$) können spektroskopische Methoden wie UV / Vis oder Fluoreszenz zur Charakterisierung der funktionalisierten Nanopartikel herangezogen werden. So stellen Abbildung 6.23 und Abbildung 6.24 die Ergebnisse der UV / Vis-Analyse von Doxorubicin-funktionalisierten LbL-beschichteten MnZn-MNP dar. Die Spektren in Abbildung 6.23 zeigen die Doxorubicin-Funktionalisierung von (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP, deren äußerste Schicht PAH bildet.

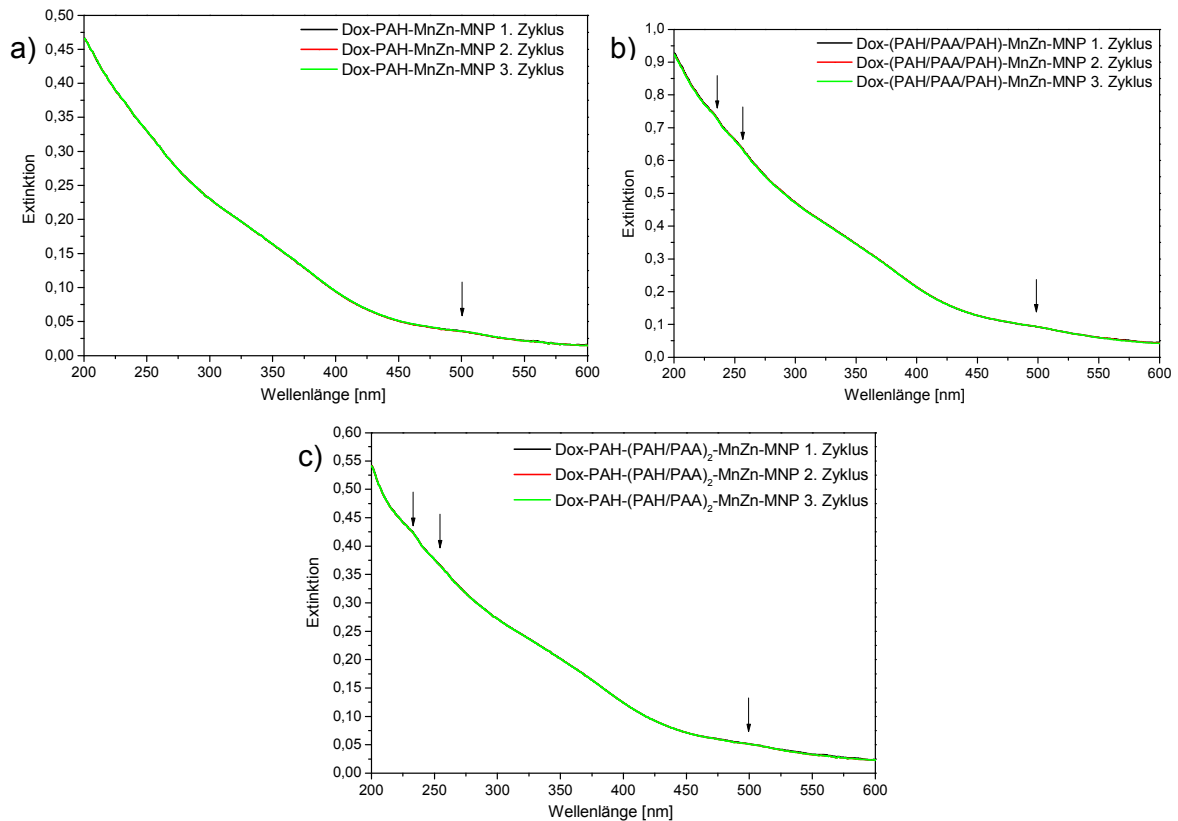


Abbildung 6.23: Darstellung von UV / Vis-Spektren von Doxorubicin-funktionalisierten Partikeln, deren äußerste Schicht PAH ist, allerdings variiert die darunter liegende Schichtanzahl. Alle Spektren weisen die charakteristischen Absorptionsmaxima des Wirkstoffs auf (siehe Pfeile).

a) Dox-PAH-beschichtete Partikel; Schichtanzahl: 1, b) Doxorubicin-Funktionalisierung der (PAH / PAA / PAH)-beschichteten MnZn-MNP; Schichtanzahl: 3 und c) Doxorubicin-funktionalisierte (PAH / PAA)₂-PAH-beschichteten MnZn-MNP; Schichtanzahl: 5.

Bei allen UV / Vis-Spektren ist das kennzeichnende Extinktionsmaximum des Doxorubicins zu sehen. Allerdings kommt dieses Maximum, durch die zusätzliche Streuung und Absorption, hervorgerufen durch die MnZn-MNP, nicht ganz zur Geltung. Bei diesen funktionalisierten Partikeln liegt das Extinktionsmaximum bei 480 nm. Es kommt zu einer leichten Verschiebung der maximalen Extinktion zu höheren Wellenlängen hin, die auf Grund der Anbindung von Doxorubicin an PAH entsteht. Abbildung 6.24 visualisiert

UV / Vis-spektroskopische Untersuchungen der (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP mit PAA als äußerster Schicht. Die Anbindung des Doxorubicins erfolgt über die Bildung der Säure-Amid-Bindung. Da es sich bei dieser Bindung um ein konjugiertes System handelt, verschiebt sich die Wellenlänge des Extinktionsmaximums von Doxorubicin zu einer höheren Frequenz und liegt jetzt bei 500 nm. Diese Ergebnisse stimmten auch mit spektroskopischen Untersuchungen von Doxorubicin-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP, die in Kapitel 4.3 charakterisiert werden, überein.

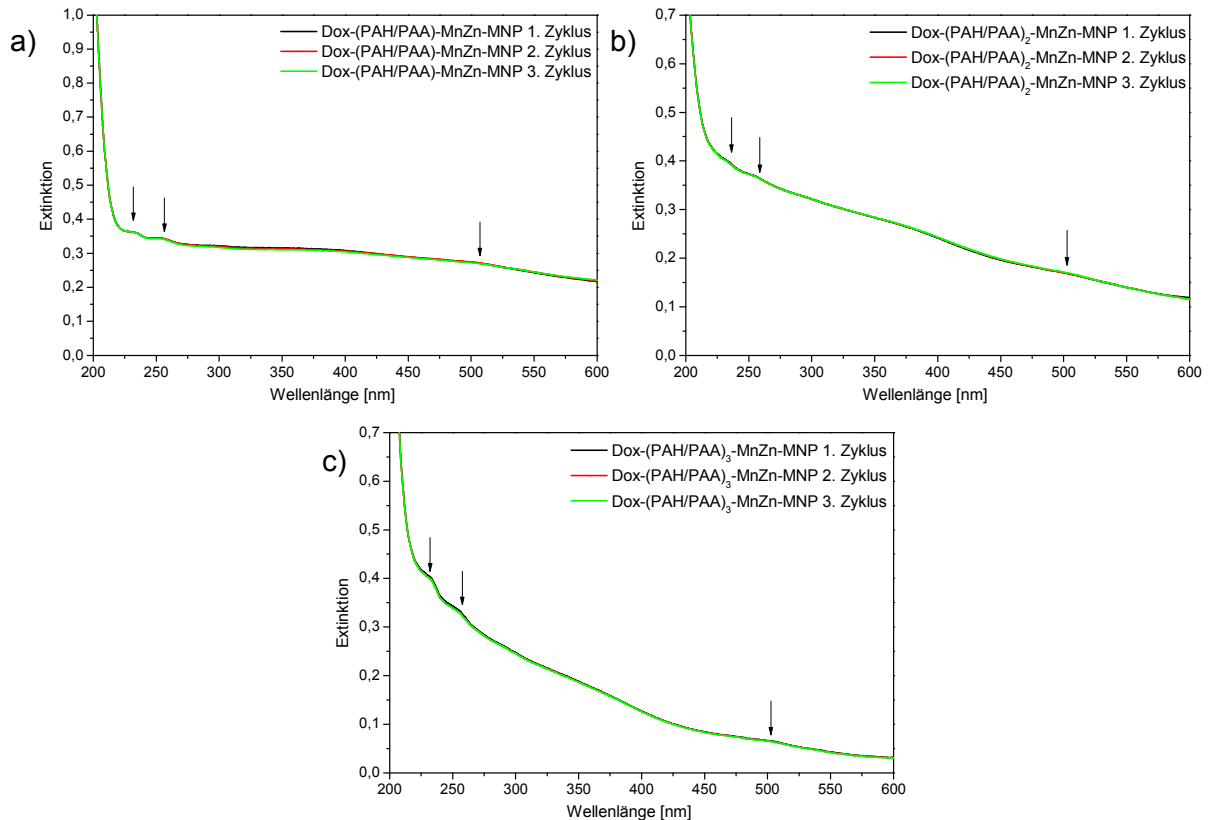


Abbildung 6.24: Darstellung von UV / Vis-Spektren der Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP.

Die Anbindung des Doxorubicins erfolgt an die äußerste PAA-Schicht. Die darunter liegende Schichtanzahl variiert. Alle Spektren weisen die charakteristischen Absorptionsmaxima des Wirkstoffs auf (markiert durch Pfeile). a) Doxorubicin-(PAH / PAA)-beschichtete MnZn-MNP, Schichtanzahl: 2; b) Doxorubicin-Funktionalisierung der (PAH / PAA)₂-beschichteten MnZn-MNP; Schichtanzahl: 4; c) Dox-(PAH / PAA)₃-beschichtete MnZn-MNP, Schichtanzahl: 6.

Zur Überprüfung der Stabilität der Partikelsuspension werden im zeitlichen Abstand von einer Stunde 3 automatisch wiederholte Messungen durchgeführt. Aus den aufgenommenen Zyklen-Messungen (Abbildung 6.23 und Abbildung 6.24) geht hervor, dass es sich bei allen Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP um stabile Suspensionen handelt.

Die Konzentrationsbestimmung des Wirkstoffs erfolgt, wie bereits erläutert, über die Analyse des Dialysewassers mittels UV / Vis-Spektroskopie. Dazu wird im Vorfeld eine

Kalibriergerade ausgehend von einer Konzentrationsreihe (siehe Abbildung 4.46 und Abbildung 4.47) ermittelt. Grundlage für die lineare Anpassung ist das Lambert-Beer'sche Gesetz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst. Dabei geht hervor, dass die Doxorubicinkonzentration der (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP, bei denen die Anbindung des Doxorubicins über eine Säure-Amid-Verknüpfung erfolgt, etwas höher liegt. Die Doxorubicinkonzentrationen liegen zwischen $1,35 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ und $1,46 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$. Hingegen weisen die Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP, deren Anbindung über die äußerste PAH-Schicht der Multischichtsysteme erfolgt, einen Konzentrationsbereich von $1,05 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ bis $1,15 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ auf.

Tabelle 6.4: Zusammenfassung der berechneten Konzentrationen des Doxorubicins im Dialysewasser und folglich in den Partikelsuspensionen.

funktionalisierte Nanopartikel	eingesetzte Konzentration an Dox [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Konzentration im Dialysewasser [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Konzentration an gebundenem Dox [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]
Dox-PAH-MnZn-MNP	1,84	0,779	1,061
Dox-(PAH / PAA)-MnZn-MNP	1,84	0,492	1,448
Dox-(PAH / PAA / PAH)-MnZn-MNP	1,84	0,705	1,135
Dox-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	1,84	0,379	1,461
Dox-PAH-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	1,84	0,689	1,151
Dox-(PAH / PAA) ₃ -MnZn-MNP	1,84	0,448	1,392

Auf Grund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentration an Doxorubicin nicht mit der Schichtanzahl der Multischichtsysteme variiert, sondern nur an die entsprechende äußerste Schicht bindet. Wird zum Beispiel die ermittelte Konzentration der zweiten Schicht mit dem Konzentrationswert der sechsten Schicht der Multischichtsysteme verglichen, so liegen beide im gleichen Bereich. Dies stellt eine wichtige Grundlage für die folgenden Wirkstoff-Verkapselungsversuchen dar.

Als zweite spektroskopische Analysemethode kommt die Fluoreszenz-Messung zum Einsatz. Die dazugehörigen Extinktions- und Emissionsspektren von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP sind in Abbildung 6.25 und Abbildung 6.26 dargestellt. Abbildung 6.25 repräsentiert die Fluoreszenz-Spektren von Doxorubicin-funktionalisierten Partikeln, deren Anbindung über Polyallylamin erfolgt. Sowohl die Extinktions- als auch die Emissions-Spektren zeigen die charakteristischen Maxima auf. Allerdings ist eine Verschiebung der Wellenlänge zu beobachten. Die Wellenlänge der maximalen Extinktion liegt bei 500 nm und die der Emission bei 590 nm bzw. 595 nm. Auf

Grund dieser Verschiebung kann von einer erfolgreichen Bindung des Doxorubicins an die Partikel, deren äußerste Schicht aus PAH aufgebaut ist, ausgegangen werden.

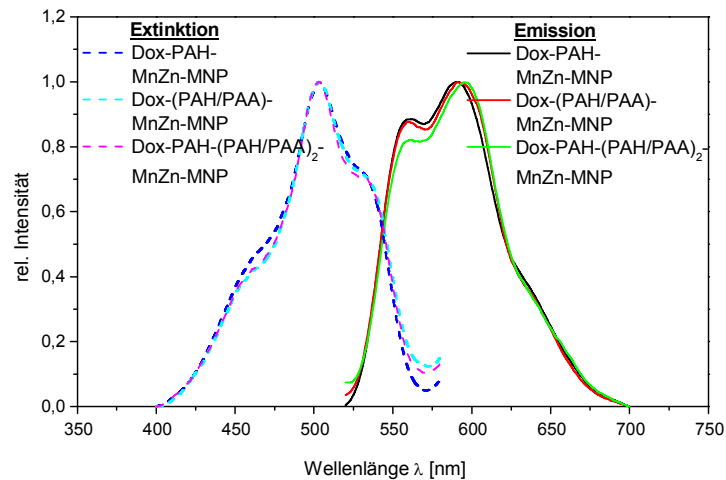


Abbildung 6.25: Darstellung charakteristischer Extinktions- und Emissions-Spektren von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP, wobei PAH die äußerste Schicht der Multisysteme bildet.

In Abbildung 6.26 sind Ergebnisse der Fluoreszenz-Analyse der Doxorubicin-(PAH / PAA)-beschichteten Nanopartikel visualisiert, wobei Polyarcylsäure die äußerste adsorbierte Schicht bildet. Hier kommt es, bedingt durch die entstandene Säure-Amid-Bindung, ebenfalls zu einer Verschiebung des Spektrums zu höheren Wellenlängen hin. Diese Verschiebung ist sowohl in den Extinktions- als auch in den Emissions-Spektren der Wirkstoff-beladenen MnZn-MNP zu sehen. Die maximale Extinktion liegt bei einer Wellenlänge von 500 nm und das Emissionsmaximum bei 600 nm. Es kann eindeutig die Autofluoreszenz des Doxorubicins nachgewiesen werden.

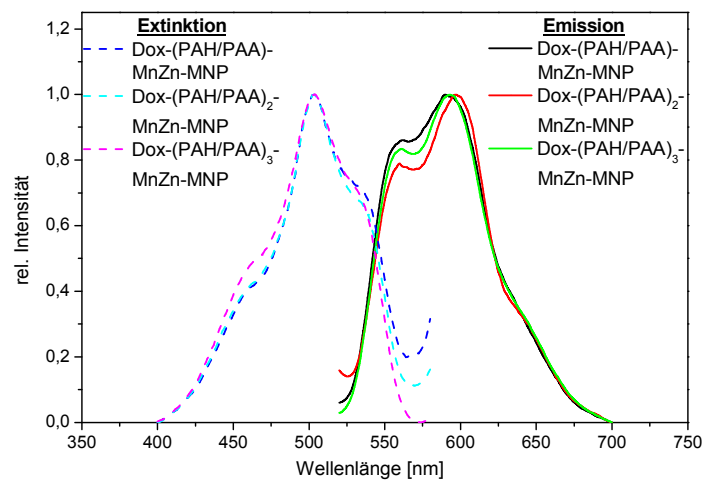


Abbildung 6.26: Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Doxorubicin-funktionalisierten Partikeln, deren Anbindung an die äußerste PAA-Schicht durch Bildung einer Säure-Amid-Verknüpfung erfolgt. Dargestellt sind die Extinktions- sowie die Emissions-Spektren von verschiedenen Schichten.

Die Abbildung 6.27 und Abbildung 6.28 präsentieren aufgenommene Zetapotential-Messungen der Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP als Funktion des pH-Werts. Anhand dieser Messungen kann zum Einen der isoelektrische Punkt bestimmt und zum Anderen eine qualitative Aussage über die erfolgte Funktionalisierung der Partikel getroffen werden. Hierzu erfolgt eine 5-fache Bestimmung des Zetapotentials mit anschließender arithmetischer Mittlung.

Die Anbindung des Doxorubicins an beschichtete MnZn-MNP hat eine Veränderung des Zetapotentials zur Folge. Dies liegt einerseits in der Anbindung des Doxorubicins an die Carboxyl-Gruppe, wodurch diese ihr negatives Potential verliert, und andererseits an der Abschirmung von Potentialen, die auf Grund des Wirkstoffs zustande kommt. Insgesamt bedeutet das, dass sich das Zetapotential nach der Doxorubicin-Funktionalisierung verringert. Diese Verringerung spiegelt sich auch in allen Messergebnissen wider, die in Tabelle 6.5 zusammengefasst sind.

Tabelle 6.5: Tabellarische Zusammenfassung der ermittelten Zetapotentiale sowie die entsprechenden isoelektrischen Punkte der Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP. Die Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP sind blau hervorgehoben.

funktionalisierte Nanopartikel	Zetapotential [mV]	isoelektrischer Punkt [pH-Wert]
PAH-MnZn-MNP	+41,4 ± 1,2	-
Dox-PAH-MnZn-MNP	+6,7 ± 4,1	8,51
(PAH / PAA / PAH)-MnZn-MNP	+28,3 ± 0,9	-
Dox-(PAH / PAA / PAH)-MnZn-MNP	+10,5 ± 0,9	7,27
PAH-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	+30,2 ± 1,0	-
Dox-PAH-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	+23,9 ± 7,7	6,75
(PAH / PAA)-MnZn-MNP	-37,0 ± 1,0	-
Dox-(PAH / PAA)-MnZn-MNP	-11,6 ± 1,2	3,1
(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	-38,7 ± 0,8	-
Dox-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	-18,6 ± 2,9	3,87
(PAH / PAA) ₃ -MnZn-MNP	-35,1 ± 0,7	-
Dox-(PAH / PAA) ₃ -MnZn-MNP	-9,2 ± 0,8	5,84

Die Bestimmung des isoelektrischen Punkts von Doxorubicin-funktionalisierten Partikeln, mit PAH als äußerster Schicht, sind in Abbildung 6.27 graphisch dargestellt. Anhand dieser Messung ist zu erkennen, dass die Schichtanzahl einen Einfluss auf den isoelektrischen

Punkt ausübt. Je größer die Anzahl der Schichten ist, desto mehr verschiebt sich der isoelektrische Punkt zu niedrigerem pH-Wert hin.

So fällt der pH-Wert des isoelektrischen Punkts in der Reihenfolge Dox-PAH-MnZn-MNP > Dox-(PAH / PAA / PAH)-MnZn-MNP > Dox-PAH-(PAH / PAA)₂-MnZn-MNP von 8,51 auf 6,32 ab. Dieser Effekt kann höchstwahrscheinlich auf die entstandene Pufferkapazität der (PAH / PAA)-Multischichtsysteme zurückgeführt werden.

Um die Stabilität dieser Partikelsuspension bei dem physiologischen pH-Wert zu gewährleisten kommen somit nur Doxorubicin-funktionalisierte MnZn-MNP in Frage, deren Schichtanzahl größer als eins ist. Eine mögliche Alternative für die nur mit einer Lage an PAH-beschichteten MnZn-MNP wäre eine anschließende Verkapselung.

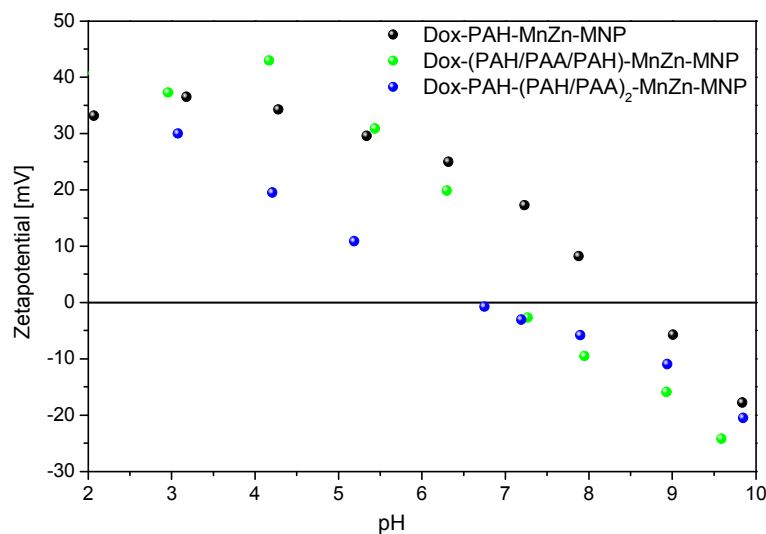


Abbildung 6.27: Auftragung des isoelektrischen Punkts von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP als Funktion des pH-Werts. Die Anbindung von Doxorubicin erfolgt an die äußerste PAH-Schicht. Der pH-Wert des isoelektrischen Punkts sinkt mit wachsender Schichtanzahl.

Hingegen zeigt Abbildung 6.28 die Analyse des isoelektrischen Punkts der Dox-(PAH / PAA)-funktionalisierte MnZn-MNP, deren äußerste adsorbierte Schicht aus PAA aufgebaut ist. Hier liegt der isoelektrische Punkt für die zweite Schicht bei einem pH-Wert von 3,1. Für die vierte Schicht liegt der Punkt bei 4,00 und für die sechste Schicht schließlich bei 5,97. Anhand der Ergebnisse wird ersichtlich, dass der pH-Wert des isoelektrischen Punkts mit steigender Schichtanzahl ansteigt. Eine Ursache dafür sind die hinzukommenden Schichten an PAA und die damit verbundene Erhöhung der Pufferkapazität.

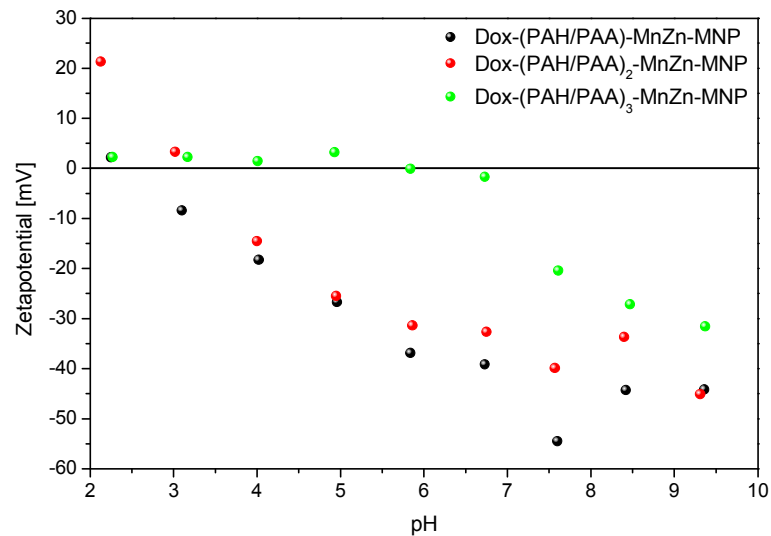


Abbildung 6.28: Auftragung des isoelektrischen Punkts von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP als Funktion des pH-Werts. Die Anbindung des Doxorubicins erfolgt an die äußerste PAA-Schicht der Multischichtsysteme. Der pH-Wert des isoelektrischen Punkts steigt mit wachsender Schichtanzahl.

Abbildung 6.29 und 6.30 visualisiert Doxorubicin-funktionalisierte MnZn-MNP, die sich in der Schichtanzahl sowie in dem äußeren Polyelektrolyten unterscheiden. Diese Aufnahmen stehen repräsentativ für alle anderen Schichten. Aus diesen TEM-Aufnahmen ist ersichtlich, dass sich weder die Morphologie noch das Aggregationsverhalten der Partikel nach Funktionalisierung ändert. In Abbildung 6.30 links ist die Schicht der Dox-(PAH / PAA)₃-funktionalisierte MnZn-MNP klar erkennbar. Diese Schichtdicke beträgt 6 nm.

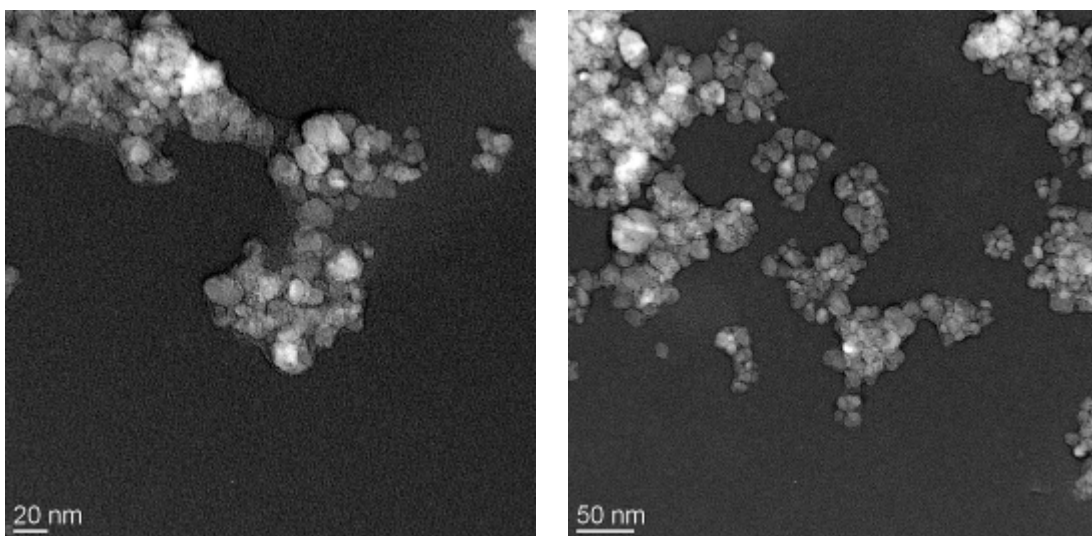


Abbildung 6.29: TEM-Aufnahmen von Dox-(PAH / PAA / PAH)-beschichteten MnZn-MNP. Es kann weder eine Änderung in der Morphologie noch im Aggregationsgrad festgestellt werden.

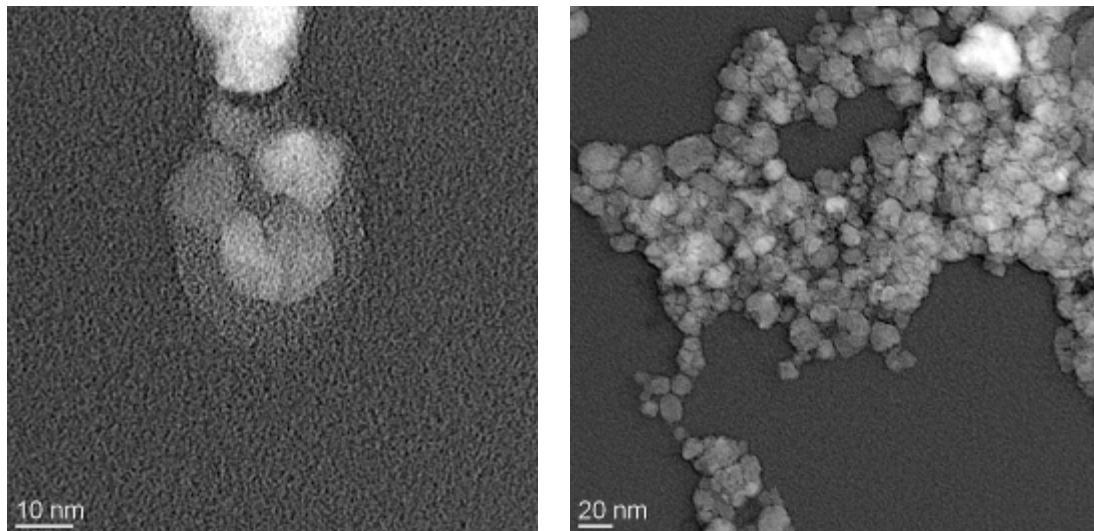


Abbildung 6.30: TEM-Aufnahmen von Dox-(PAH / PAA)₃-beschichteten MnZn-MNP dar. Es kann weder eine Änderung in der Morphologie noch im Aggregationsgrad festgestellt werden.

6.2.2 BIOMEDIZINISCHE FUNKTIONALISIERUNG VON (PEI / PSSa-co-MA)-BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN

Nicht nur die Multischichtsysteme, bestehend aus Polyallylamin und Polyarcylsäure, bieten sehr gute Voraussetzungen für die Anwendung als Drug-Delivery Systeme, sondern auch (PEI / PSSa-co-MA)-Schichtsysteme. Für die Untersuchungen wird die 4. bzw. die 5. Schicht mit Doxorubicin funktionalisiert und anschließend charakterisiert. Die 4. und die 5. Schicht unterscheiden sich im Polyelektrolyten, der jeweils die äußerste Schicht bildet. So bildet bei der 4. Schicht das Polyanion PSSa-co-MA die äußerste Schicht. Wohingegen das Polykation PEI die äußerste Schicht bei dem 5-fach geschichteten Multischichtsystem darstellt. Einerseits soll durch die Variation der endständigen Polymere die Möglichkeit aufgezeigt werden, dass verschiedene funktionelle Gruppen des Wirkstoffs an die verschiedenen Schichten gebunden werden können, dadurch besteht die Möglichkeit mehrere Wirkstoffe in das System mit einzubauen. Andererseits soll der Protonenschwamm-Effekt von PEI genutzt werden. Ein Unterschied zu dem bereits beschriebenen Schichtsystemen (siehe Kapitel 6.2.1), liegt in der Verwendung des Polyanions. PSSa-co-MA weist eine teilweise Versalzung der Carboxyl-Gruppen auf, wodurch eine geringere Konzentration an Doxorubicin gebunden werden kann, im Vergleich zu PAA. Durch diesen Effekt entsteht ein Konzentrationsgradient bei dem Schichtsystem, der vor allem für eine kontrollierte Abgabe einen Vorteil darstellt. Die Größenverteilungskurven Doxorubicin-funktionalisierter (PEI / PSSa-co-MA)-beschichteter

MnZn-MNP sind in Abbildung 6.31 graphisch wiedergegeben. Die zugehörigen berechneten Werte sind in Tabelle 6.6 zusammengefasst.

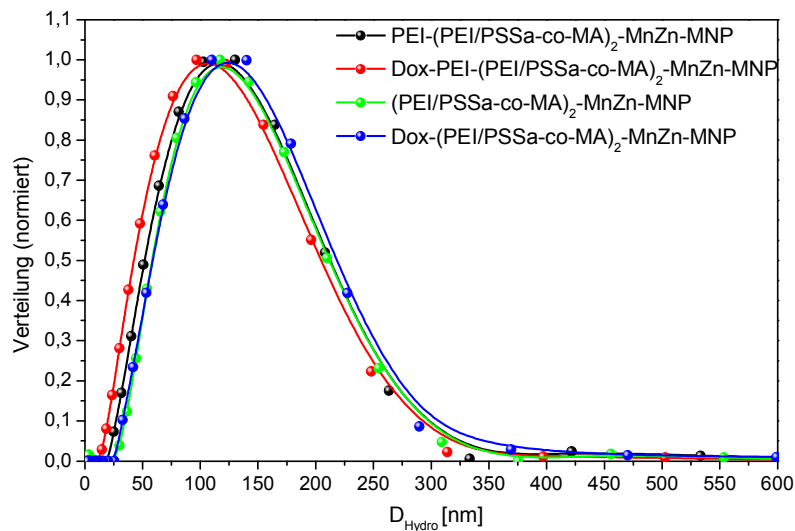


Abbildung 6.31: Größenverteilungskurven von (PEI / PSSa-co-MA)-beschichteten MnZn-MNP, mit und ohne Doxorubicin Funktionalisierung. In allen Fällen ist eine Änderung des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel zu verzeichnen.

Bei beiden mit Doxorubicin-funktionalisierten Schichtsystemen ist eine Änderung des hydrodynamischen Durchmessers zu verzeichnen. Bei den Doxorubicin-funktionalisierten Partikeln, deren äußerste Schicht vom Polyanion PSSa-co-MA gebildet wird, vergrößert sich der Durchmesser von 145 nm auf 149 nm. Diese Vergrößerung beruht auf der Anbindung des Doxorubicins an die Schicht. Allerdings verringert sich der Durchmesser der funktionalisierten Partikel, bei denen das Polykation die äußerste Schicht bildet, von 144 nm auf 139 nm. Derselbe Effekt kann für die (PAH / PAA)-Multischichtsysteme beobachtet werden (siehe Kapitel 6.2.2). Auch hier könnte in der Änderung des pH-Werts eine mögliche Ursache für die Verkleinerung des hydrodynamischen Durchmessers liegen. Bei PEI handelt es sich um einen Polyelektrolyten, der aber auf Grund der hohen Ladungsdichte und der tertiären Amino-Gruppen als starker Polyelektrolyt angesehen wird. Das verwendete PEI hat eine Molmasse um die $1800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und zeigt bedingt durch die geringen Molekülmassen ein Verhalten auf, welches zwischen einem schwachen und einem starken Polyelektrolyten liegt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Ladungsdichte von PEI in Abhängigkeit des pH-Werts verändert, welches wiederum eine Änderung der Schichtdicke zur Folge hat. Die Ladungsdichte nimmt in Anwesenheit von Doxorubicin zu, folglich nimmt die Schichtdicke ab und damit auch der hydrodynamische Durchmesser.

Tabelle 6.6: Zusammenfassung der DLS-Messergebnisse und der Polydispersität σ von (PEI / PSSa-co-MA)-Systemen sowie der Systeme mit Doxorubicin-Funktionalisierung (blau hervorgehoben).

funktionalisierte Nanopartikel	D_{hydro} [nm] ± Standardfehler	σ ± Standardfehler
PEI-(PEI / PSSa-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	144,06 ± 2,74	1,77 ± 0,02
Dox PEI-(PEI / PSSa-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	139,03 ± 3,49	1,89 ± 0,03
(PEI / PSSa-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	144,56 ± 1,73	1,68 ± 0,01
Dox-(PEI / PSSa-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	148,84 ± 2,30	1,69 ± 0,01

Zur Charakterisierung der Anbindung des Doxorubicins an PEI bzw. PSSa-co-MA wird die FT-IR-Spektroskopie angewandt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 6.32 dargestellt. Bei der Anbindung des Wirkstoffs an PEI reagiert die Keto-Gruppe des Doxorubicins mit der primären Amino-Gruppe von PEI unter Bildung einer sekundären Amin-Bindung. Hingegen reagiert bei der Anbindung von Doxorubicin an PSSa-co-MA die primäre Amino-Gruppe des Doxorubicins mit der freien Carboxyl-Gruppe der PSSa-co-MA unter Ausbildung einer Säure-Amid-Bindung.

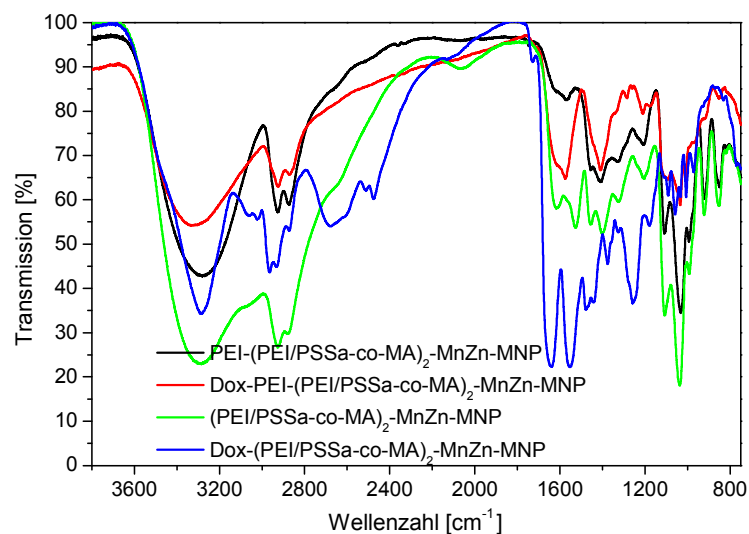


Abbildung 6.32: FT-IR-Spektren von Doxorubicin-funktionalisierten und (PEI / PSSa-co-MA)-beschichteten MnZn-MNP. Dargestellt sind die Spektren der 4. und 5. Schicht sowie deren Funktionalisierung mit Doxorubicin. Beide Spektren von funktionalisierten MnZn-MNP beweisen die erfolgreiche Bindung des Doxorubicins an das entsprechende Polymer.

Die charakteristischen Schwingungen des sekundären Amins sowie der Säure-Amid-Bindung werden bereits bei den Doxorubicin-funktionalisierten (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP eingehend beschrieben (siehe Kapitel 6.2.2). Dementsprechend kann ebenfalls von einer erfolgreichen Anbindung des Wirkstoffs an die

verschiedenen Polyelektrolyte ausgegangen werden. Beide Spektren der funktionalisierten Partikel weisen die signifikanten Absorptionsbande der entsprechenden Bindungen auf. Vor allem bei den Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP, deren äußerste Schicht von PSSa-co-MA gebildet wird, ist die *cis*- bzw. *trans*-Isomerie der Säure-Amid-Bindung zu erkennen.

Abbildung 6.33 repräsentiert die UV / Vis-Analyse der beiden Doxorubicin-funktionalisierten Partikelsuspensionen. Die linke Abbildung zeigt die Ergebnisse der UV / Vis-Analyse von Doxorubicin funktionalisierten PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-beschichteten MnZn-MNP. Trotz des starken Untergrunds, der durch die Partikel verursacht wird, sind die charakteristischen Absorptionsmaxima des Doxorubicins zu erkennen. Eine ähnliche Aussage kann über die Spektren von Dox-(PEI / PSSa-co-MA)₂-Systemen getroffen werden, welche in der rechten Abbildung dargestellt sind. Allerdings sind in diesem Fall die Absorptionsmaxima weniger stark ausgebildet, welches auf die geringe Konzentration an Doxorubicin zurückgeführt werden kann. Nichtsdestotrotz kann in beiden Partikelsuspensionen Doxorubicin nachgewiesen werden.

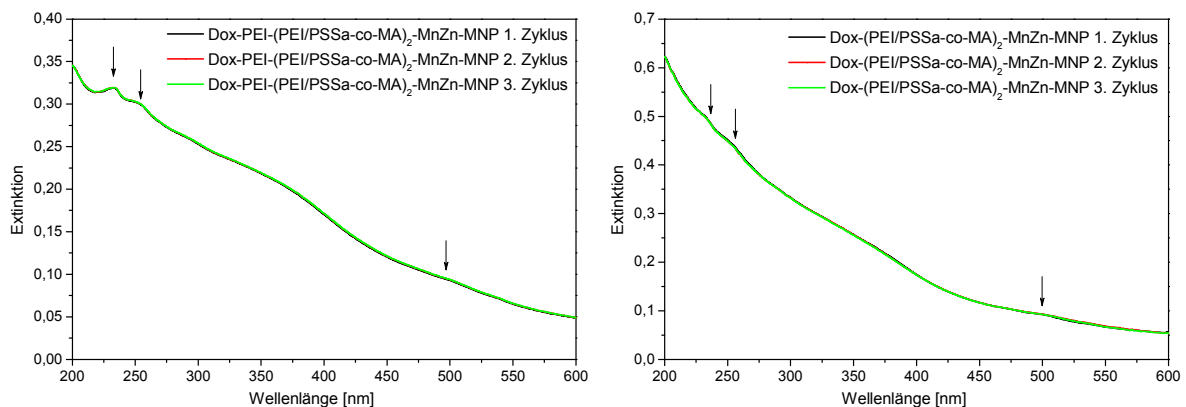


Abbildung 6.33: UV / Vis-Spektren von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP, mit den charakteristischen Absorptionsmaxima von Doxorubicin (markiert durch Pfeile). Links: Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-beschichtete MnZn-MNP; Rechts: Dox-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierte MnZn-MNP.

Die 3 automatisch wiederholten Messungen dienen ebenfalls zur Überprüfung der Stabilität der Suspension. Wie anhand der Spektren ersichtlich ist, handelt es sich sowohl bei Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-beschichteten als auch bei Dox-(PEI / PSSa-co-MA)₂-beschichteten MnZn-MNP um Suspensionen, deren Stabilität über einen längeren Zeitraum hin gewährleistet werden kann.

In Tabelle 6.7 sind die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung an Doxorubicin zusammengefasst. Die Dox-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierten MnZn-MNP weisen eine geringere Konzentration an gebundenem Doxorubicin auf als die Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierte MnZn-MNP. Die Bestimmung an

Doxorubicinkonzentration erfolgt unter Zuhilfenahme des Lambert-Beer'schen-Gesetzes und anschließender linearen Anpassung (siehe Abbildung 4.46 und Abbildung 4.47).

Tabelle 6.7: Zusammenfassung der Konzentrationsbestimmung von Doxorubicin, welche an (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsysteme gebunden ist.

funktionalisierte Nanopartikel	eingesetzte Konzentration an Dox [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Konzentration im Dialysewasser [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Konzentration an gebundenem Dox [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]
Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA) ₂ MnZn-MNP	1,84	0,546	1,294
Dox-(PEI / PSSa-co-MA) ₂ MnZn-MNP	1,84	0,987	0,853

Abbildung 6.34 zeigt Extinktions- sowie Emissions-Spektren der funktionalisierten MnZn-MNP. Bei den Partikeln, deren äußerste Schicht das Polyanion bildet, ist eine stärkere Verschiebung des Emissions-Spektrums zu höheren Wellenlängen zu beobachten, welche auf Grund der gebildeten Säure-Amid-Bindung entsteht. Diese Verschiebung macht sich sowohl im Extinktions- als auch im Emissions-Spektrum bemerkbar. Für beide funktionalisierten MnZn-MNP liegt die maximale Extinktion bei 500 nm. Allerdings emittieren Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-beschichtete MnZn-MNP maximal bei 590 nm, wohingegen Dox-(PEI / PSSa-co-MA)₂-Systeme ein Extinktionsmaximum bei 595 nm haben. Alle aufgenommenen Spektren dieser funktionalisierten Multischichtsysteme weisen eindeutig die Autofluoreszenz des Wirkstoffs auf. Somit kann von einer erfolgreichen Beladung der Partikel mit Doxorubicin ausgegangen werden.

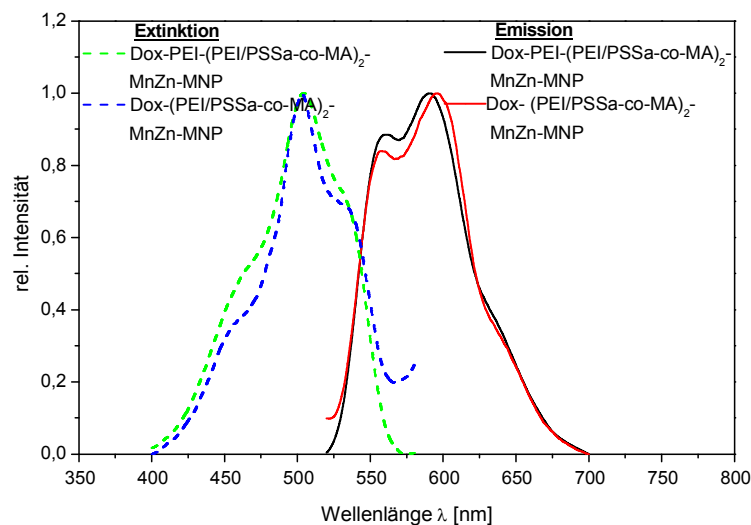


Abbildung 6.34: Darstellung von Extinktions- und Emissions-Spektren mit Doxorubicin-funktionalisierten 4- und 5-fach beschichteten (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsystemen.

Die Bestimmung des isoelektrischen Punkts der Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP ist in Abbildung 6.35 dargestellt. So weisen Doxorubicin-funktionalisierte Partikel, mit PSSa-co-MA als äußerster Schicht, einen isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert von 3,82 auf. Bei den Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierten MnZn-MNP liegt der isoelektrische Punkt mit einem pH-Wert von 5,05 etwas höher. Beide funktionalisierten Partikel weisen einen isoelektrischen Punkt unter dem physiologischen pH-Wert des Blutes auf und können somit für medizinische Anwendung in Betracht gezogen werden.

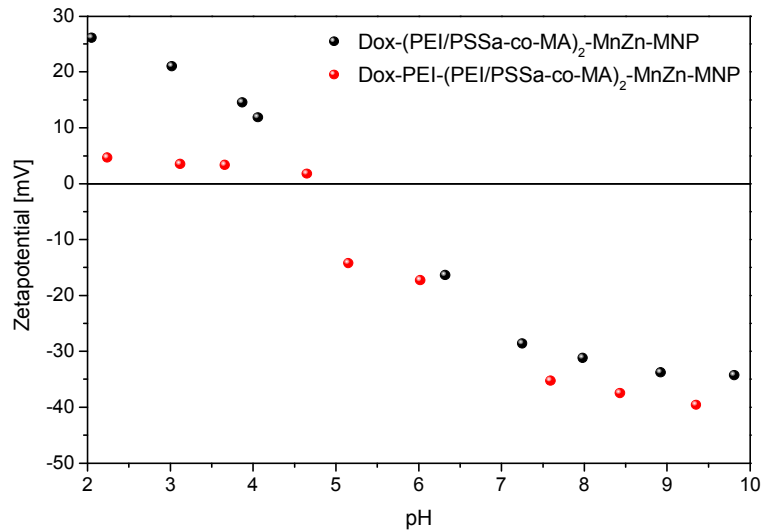


Abbildung 6.35: Darstellung des isoelektrischen Punkts der mit Doxorubicin-funktionalisierten 4- und 5-fach beschichteten (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsystemen.

Die Messungen der Zetapotentiale weisen ebenfalls auf die erfolgreiche Beschichtung der Partikel mit dem Wirkstoff hin. Bei Dox-(PEI / PSSa-co-MA)₂-Systemen ändert sich das Potential von $-17,9 \text{ mV} \pm 0,2 \text{ mV}$ auf $+9,2 \text{ mV} \pm 0,5 \text{ mV}$ und bei Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierten MnZn-MNP sinkt das Potential nach der Funktionalisierung mit Doxorubicin von $+25,9 \text{ mV} \pm 1,9 \text{ mV}$ auf $+5,2 \text{ mV} \pm 0,8 \text{ mV}$. In beiden Fällen ist eine eindeutige Änderung des Zetapotentials nach der Funktionalisierung mit dem Wirkstoff zu verzeichnen.

Um die Beschaffenheit der Wirkstoff-funktionalisierten MnZn-MNP zu charakterisieren, wird die Elektronenmikroskopie zu Hilfe genommen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 6.36 dargestellt. Die linke TEM-Aufnahme visualisiert eine Funktionalisierung der PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-Multischichtsysteme, während die rechte Aufnahme Partikel der Dox-(PEI / PSSa-co-MA)₂-Systeme präsentiert. Es ist ersichtlich, dass sich weder die Morphologie noch das Aggregationsverhalten der Partikel durch die Funktionalisierung ändert.

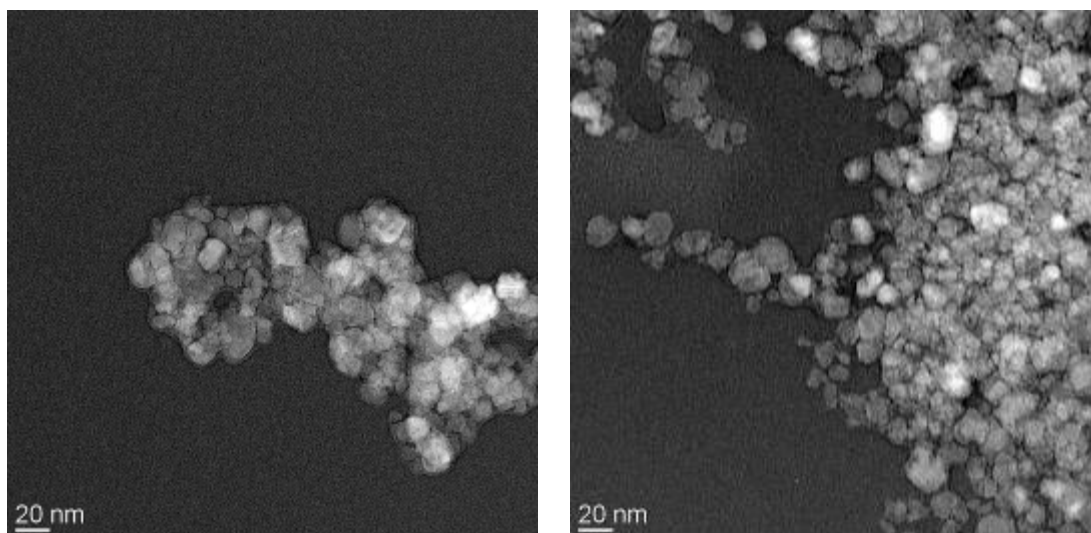


Abbildung 6.36: TEM-Aufnahmen von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP.

Links: Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierte MnZn-MNP;

Rechts: Dox-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierte MnZn-MNP. Änderungen in der Morphologie und im Aggregationsgrad sind nicht feststellbar.

6.2.3 CHARAKTERISIERUNG VON DOXORUBICIN-FUNKTIONALISIERTEN LbL-BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN MITTELS FCS

Die Ergebnisse der FCS-Messungen von Doxorubicin-(PAH/PAA)-Multischichtsystem-funktionalisierten MnZn-MNP sind in Abbildung 6.37 und Abbildung 6.38 zusammengefasst. Der Übersicht halber sind die Messergebnisse für die ersten drei Schichten von funktionalisierten (PAH/PAA)-Multischichtsystemen in Abbildung 6.37 und die für die 4. bis 6. Schicht in Abbildung 6.38 dargestellt. Tabelle 6.8 fasst die ermittelten Diffusionszeiten und Durchmesser der in Abbildung 6.37 bis Abbildung 6.39 gezeigten Graphen zusammen.

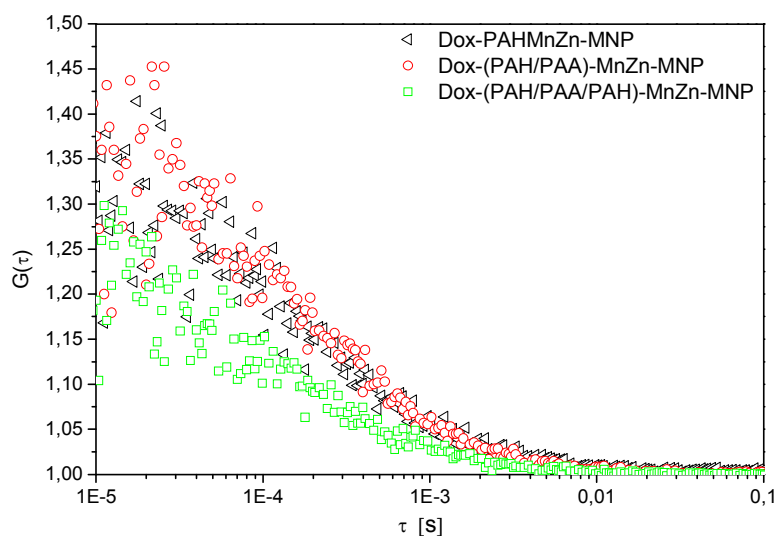


Abbildung 6.37: Darstellung der FCS-Messergebnisse von Doxorubicin-funktionalisierten (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP. Aufgetragen sind jeweils die FCS-Messergebnisse der 1., 2. und 3. Schicht der Multischichtsysteme.

Bei Betrachtung dieser Messergebnissen fällt auf, dass sich die Diffusionszeiten von Doxorubicin-funktionalisierten (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP, deren äußerste Schicht PAH bildet, trotz Zunahme der Schichtanzahl, kaum ändert. Die Diffusionszeit liegt für Dox-PAH-funktionalisierte MnZn-MNP bei $200 \mu\text{s}$ für Dox-(PAH / PAA / PAH)-MnZn-MNP bei $108 \mu\text{s}$ und für Dox-PAH-(PAH / PAA)₂-MnZn-MNP bei $168 \mu\text{s}$. Diese Diffusionszeiten lassen ebenfalls erkennen, dass es sich um Doxorubicin, gebundenen an PAH, handelt (vgl. Kapitel 4.3.3). Auch die ermittelten Durchmesser liegen unterhalb der tatsächlichen Größe der magnetischen Partikel (siehe Tabelle 6.8). Die FCS stellt eine sehr empfindliche Messmethode dar, die stark von der Umgebungstemperatur beeinflusst wird. Basierend auf dieser Tatsache und dem Umstand, dass die Messungen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt werden mussten, wird davon ausgegangen, dass diese ermittelten Diffusionszeiten nicht signifikant voneinander abweichen (siehe Tabelle 6.8).

In Abbildung 6.38 sind die FCS-Messergebnisse von Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP, deren äußerste Schicht PAA bildet dargestellt. Bei den ermittelten Diffusionszeiten ist eine Zunahme der Diffusionszeit mit steigender Schichtanzahl erkennbar.

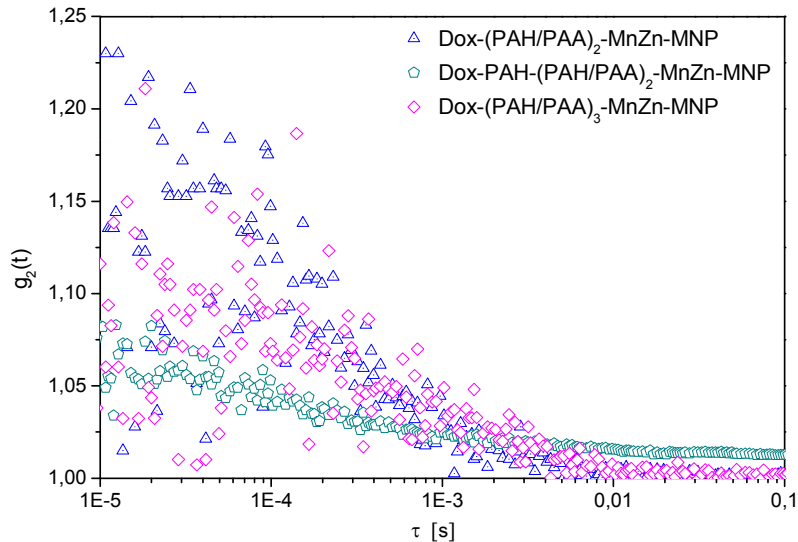


Abbildung 6.38: Darstellung der FCS-Messergebnisse von Doxorubicin-funktionalisierten (PAH/PAA)-beschichteten MnZn-MNP. Aufgetragen sind die FCS-Messergebnisse der 4., 5. und 6. Schicht der Multischichtsysteme.

So nimmt die Diffusionszeit in der Reihenfolge der Probe $\text{Dox-(PAH/PAA)-MnZn-MNP} < \text{Dox-(PAH/PAA)}_2\text{-MnZn-MNP} < \text{Dox-(PAH/PAA)}_3\text{-MnZn-MNP}$ von $191 \mu\text{s}$ über $289 \mu\text{s}$ und auf schließlich $504 \mu\text{s}$ zu. Anhand dieser Diffusionszeiten lässt sich ein Trend mit steigender Schichtanzahl erkennen, der sich auch in der Zunahme der ermittelten Größe (siehe Tabelle 6.8) widerspiegelt. Allerdings liegen die Größen der funktionalisierten Partikel signifikant unter den mittels XRD und TEM errechneten Größen. Somit handelt es sich bei den Werten wahrscheinlich ebenfalls um Doxorubicin, welches an PAA gebunden vorliegt. Eine mögliche Erklärung liegt im resonanten Energietransfer (siehe Kapitel 4.3.3) begründet, der dafür sorgt, dass die Fluoreszenz von Doxorubicin, welche an die Partikel gebunden ist, nicht detektiert wird. Auch hier fungieren die magnetischen Nanopartikel als Akzeptor und Doxorubicin als Donor und der maximale Abstand zwischen Akzeptor und Donor, der erreicht werden kann, liegt bei 6 nm .

Die Fluoreszenz, welche detektiert wird, ist die von Doxorubicin gebunden an das Polymer PAA bzw. PAH, die einen genügend großen Abstand zu den MnZn-MNP aufweisen, dass FRET nicht auftreten kann. Dieser Abstand kann zum Einen durch das starke Verdünnungs-Verhältnis zustande kommen. Dadurch können die einzelnen Schichten verstärkt mit dem Suspensionsmedium in Wechselwirkung treten, die Ladungsdichte nimmt ab und dies hat zur Folge, dass der schwache Elektrolyt nicht so stark adsorbiert wird, somit

Loops ausbildet und dadurch dickere Schichten entstehen. Ist an diese Schicht bzw. an solch einen Loop Doxorubicin gebunden, so wird diese Fluoreszenz gemessen.

In Abbildung 6.39 sind die erhaltenen FCS-Graphen der 4. und 5. Schicht von (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsystemen dargestellt. Die Diffusionszeit von Dox-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierten MnZn-MNP beträgt 504 μ s, wohingegen Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierte MnZn-MNP eine Diffusionszeit von 191 μ s haben. Die Ursachen für die Diffusionszeiten sowie die kleineren Durchmesser sind bei den Doxorubicin-funktionalisierten (PAH / PAA)-Multischichtsystemen eingehend erklärt worden und können ebenfalls auf dieses System übertragen werden. Tabelle 6.8 fasst die ermittelten Diffusionszeiten sowie Durchmesser, der in Abbildung 6.37 bis Abbildung 6.39 gezeigten FCS-Graphen, zusammen.

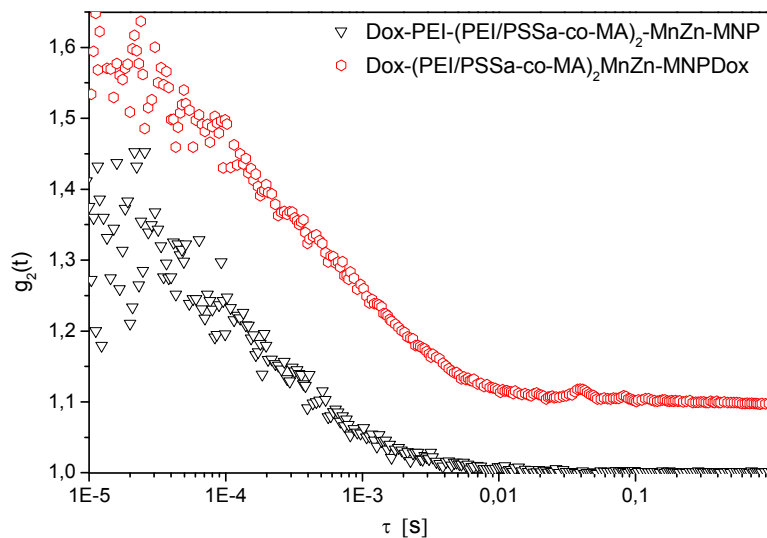


Abbildung 6.39: Darstellung der FCS-Messergebnisse von Doxorubicin-(PEI / PSSa-co-MA)₂- und Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA)₂-funktionalisierten MnZn-MNP.

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die FCS-Messergebnisse vom Polyelektrolyt, der die äußerste Schicht bildet, beeinflusst werden. So ist im Falle von PAA eindeutig eine Tendenz der Diffusionszeiten mit steigender Schichtanzahl zu sehen, wohingegen bei PAH als äußerster Schicht diese Tendenz fehlt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die erhöhte Ladungsdichte, basierend auf PAH und Doxorubicin, sein. Diese erhöhte Ladungsdichte sowie die verstärkte Wechselwirkung der NH-Gruppen mit dem Suspensionsmedium Wasser haben einen Einfluss auf die Fluoreszenz. Dieser Effekt ist ebenfalls bei (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsystemen (siehe Abbildung 6.39) zu sehen.

Tabelle 6.8: Zusammenfassung der ermittelten Diffusionszeiten von Doxorubicin-funktionalisierten (PAH / PAA)- und (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsystemen. Die Multischichtsysteme, bei denen die Anbindung von Doxorubicin über Ausbildung einer Säure-Amid-Bindung erfolgt, sind blau hervorgehoben.

funktionalisierte Nanopartikel	Diffusionszeit τ_D [μ s]	ermittelte Größe [Å]
Dox-PAH-MnZn-MNP	200	13,93
Dox-(PAH / PAA)-MnZn-MNP	191	13,30
Dox-(PAH / PAA / PAH)-MnZn-MNP	108	7,52
Dox-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	289	20,12
Dox-PAH-(PAH / PAA) ₂ -MnZn-MNP	168	11,70
Dox-(PAH / PAA) ₃ -MnZn-MNP	504	35,09
Dox-(PEI / PSSa-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	504	35,09
Dox-PEI-(PEI / PSSa-co-MA) ₂ -MnZn-MNP	191	13,30
Doxorubicin	54	3,76

Des Weiteren übt die Temperatur einen starken Einfluss auf die Diffusionszeiten aus. Dadurch dass die Messungen nicht in einer thermostatisierten Umgebung durchgeführt werden, kann es auf Grund der vom Laser induzierten Erwärmung der magnetischen Nanopartikel und damit der Probe kommen, die schnellere Diffusionszeiten zur Folge hat. Zusätzlich kann bei Doxorubicin der Photobleich-Effekt auftreten, der durch den Laser ausgelöst wird und zur Zerstörung des Doxorubicins führt.

Auf Grundlage der Ergebnisse kann nicht von vorne herein davon ausgegangen werden, dass Doxorubicin nicht an die MnZn-MNP gebunden vorliegt, es kann allerdings keine Aussage, auf Grund der auftretenden und beschriebenen Effekte, über die Bindungsstärke zwischen Partikel und Polymer getroffen werden. Allerdings zeigen die Methoden wie FT-IR-Spektroskopie und Zetapotential-Messungen eindeutig die erfolgreiche Adsorption des jeweiligen Polymers.

6.3 ABSCHLIEßENDE ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieses Kapitels werden verschiedene Polyelektrolyten mittels des LbL-Verfahrens auf die Oberfläche von magnetischen Nanopartikeln aufgebracht. Als Polykationen werden dabei Polyallylamin (PAH) und Polyethylenimin (PEI) verwendet, als Polyanionen kommen Polyacrylsäure (PAA) und Poly(4-styrolsulfonsäure-co-maleinsäure) (PSSa-co-MA) zum Einsatz. Die maximale Schichtanzahl beläuft sich bei allen untersuchten Schichtsystemen auf 6. Zur Charakterisierung dieser Multischichtsysteme werden unter anderem dynamische Lichtstreuung, FT-IR-Spektroskopie, Zetapotentialbestimmung und Transmissionselektronenmikroskopie angewandt. Diese eingesetzten Methoden erlauben es, bestimmte Schlussfolgerungen über die Größenverteilung, den Aufbau der einzelnen Schichten, die damit verbundene Oberflächenladung sowie über die Morphologie dieser Systeme zu treffen.

Die dargelegten Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der Herstellung von beschichteten Nanopartikeln mittels der LbL-Deposition um einen sehr gut reproduzierbaren Prozess handelt. Vor allem die (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP liefern optimale Ergebnisse, die einerseits in der relativ engen Größenverteilung und andererseits in der Stabilität und dem damit verbundenen geringen Aggregationsgrad begründet liegen. Des Weiteren kann anhand der aufgenommenen FT-IR-Spektren und den dazugehörigen Zetapotential-Messungen die Beschichtung mittels PAH oder PAA erfolgreich nachgewiesen werden. Mit Hilfe von TEM-Aufnahmen werden sowohl die vorliegende Schichtdicke als auch die Morphologie der beschichteten Partikel analysiert. Außerdem übt das LbL-Verfahren keinen Einfluss auf die Kristallinität der Nanopartikel aus. Die Gitternetzebenen sind nach jeder Schicht eindeutig nachweisbar. Ein Nachteil dieses System ist der pH-Wert. Es handelt sich bei beiden Polymeren um schwache Polyelektrolyte, deren volle Ladungsdichte vom pH abhängt. Der pH-Bereich, in dem beide Polymere die volle Ladungsdichte aufweisen, liegt zwischen 6 und 7,2. Allerdings ist dies auch der pH-Bereich, der für medizinische Anwendung eine wichtige Rolle spielt.

Ähnlich gute Ergebnisse liefern die Multischichtsysteme bestehend aus PAH und PSSa-co-MA. Allerdings ist zum Einen die Größenverteilung breiter als bei den (PAH / PAA)-beschichteten MnZn-MNP und zum Anderen ist die Änderung des Zetapotentials mit jeder neuen Schicht nur gering. Dies lässt darauf schließen, dass neben elektrostatischen Wechselwirkungen noch sterische Effekte hinzukommen. Des Weiteren bieten (PAH / PAA)-Schichtsysteme auf Grund des vorhandenen Abbaus im sauren pH-Bereich einen weiteren Vorteil für die Anwendung als Drug-Delivery System. Demzufolge wird auf (PAH / PSSa-co-MA)-Systeme nicht näher eingegangen.

Ebenfalls wird PEI als Polykation zum Aufbau von multifunktionalen Schichten näher untersucht. Dieser Polyelektrolyt bietet auf Grund des Protonenschwamm-Effekts einen

zusätzlichen Vorteil, der sich vor allem für eine gezielte Wirkstofffreisetzung ausnutzen lassen kann.

Zunächst werden Multischichtsysteme, bestehend aus PEI und PSSa-co-MA, eingehender charakterisiert. Hier zeigt sich bereits durch die dynamische Lichtstreuung der Einfluss der verzweigten Struktur von PEI. Bei Bildung der ersten Schicht steigt der Durchmesser um das Dreifache an als im Vergleich zu den unbeschichteten MnZn-MNP an. Durch die Struktur des PEIs kann es zu einem verstärkten Aggregationsgrad kommen. Dies wird mit Hilfe von TEM-Aufnahmen nachgewiesen. Jedoch ändert sich der Durchmesser mit jeder neu hinzukommenden Schicht nur noch geringfügig, was auf keine weitere Änderung des Aggregationsgrads schließen lässt. Auch die Werte der Polydispersität liegen in einem guten Bereich. Der erfolgreiche Aufbau einer Multischichtstruktur wird Schicht für Schicht sowohl mit FT-IR-Spektroskopie als auch mit Zetapotential-Messung nachgewiesen. Trotz des vergrößerten hydrodynamischen Durchmessers und des Aggregationsgrads weisen diese Partikel eine gute Stabilität auf, wodurch sie für Drug-Delivery Systeme in Betracht gezogen werden können.

Ferner werden ebenfalls auf PEI und PAA basierende Schichtsysteme untersucht. In diesem Zusammenhang ist es nicht möglich, eine stabile Partikelsuspension herzustellen. Obwohl die Konzentration des eingesetzten Polyelektrolyten verringert wird, agglomerierten die Partikel nach der 4. aufgetragenen Schicht so stark, dass nur noch eine zäh-viskose schwarze Masse übrig blieb. Der Grund dafür kann einerseits in der verzweigten Struktur des PEIs liegen und andererseits in der Größe der magnetischen Nanopartikel. Dieses Zusammenspiel und die Tatsache, dass es sich bei PAA um einen schwachen Polyelektrolyten handelt, machen es zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich stabile Partikelsuspension mit mehr als 4 Schichten herzustellen.

Nachdem Multischichtsysteme, welche aus PAH und PAA aufgebaut sind, sich als geeignetste von den untersuchten Schichtsystemen herauskristallisierten, werden die Kern / Schale-Partikel mit dem Wirkstoff Doxorubicin modifiziert. Auf Grund der funktionellen Gruppen der verwendeten Polyelektrolyten besteht so die Möglichkeit, den Wirkstoff über verschiedene Bindungen an die Polymere zu bringen. Außerdem können durch die verschiedenen funktionellen Gruppen ebenfalls andere Biomoleküle oder Wirkstoffe angebunden werden.

Untersucht wird die Anbindung von Doxorubicin an jede einzelne Schicht, um so eine Aussage über das Verhalten und die Stabilität der Partikelsuspensionen treffen zu können. Diese Versuche liefern einen wichtigen Anhaltspunkt für die späteren Verkapselungsversuche. Als Charakterisierungsmethoden kommen dynamische Lichtstreuung, Zetapotential-Messungen, TEM, FT-IR-, UV / Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie zum Einsatz. Alle verwendeten Methoden zeigen die erfolgreiche Anbindung

des Doxorubicins an die verschiedenen Schichten. So kann mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie die Anbindung zwischen Doxorubicin und PAH bzw. PAA anhand der signifikanten Schwingungen bestätigt werden. UV / Vis- sowie Fluoreszenz-Aufnahmen zeigen die charakteristischen Absorptionsmaxima von gebundenem Doxorubicin. Eine Besonderheit ist bei den Ergebnissen der DLS-Messung zu verzeichnen. Der Durchmesser der Partikel, deren äußerste Schicht aus PAA besteht, vergrößerte sich nach der Funktionalisierung mit Doxorubicin. Hingegen verkleinert sich der Durchmesser bei Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP, deren äußerste Schicht PAH bildet. Eine Ursache kann die Änderung des pH-Werts sein und die erhöhte Ladungsdichte, die bedingt durch PEI und Doxorubicin entsteht. Diese beiden Gegebenheiten sorgen dafür, dass die Schichtdicke dünner wird. So weisen die Partikel mit PAH als äußerster Schicht einen höheren pH-Wert auf als Partikel, die mit PAA beschichtet sind. Außerdem vermindert die Funktionalisierung mit dem Wirkstoff die Stabilität der Partikelsuspension nicht. Diese Aussage kann auf Grund der aufgenommenen UV / Vis-Zyklen-Messung getroffen werden. Die Bestimmung des isoelektrischen Punkts ergibt für alle funktionalisierten Schichten, ausgenommen der Ersten, einen Wert, der unter dem physiologischen pH-Wert des Blutes liegt. Des Weiteren wird gezeigt, dass Doxorubicin nur an die äußerste Schicht gebunden vorliegt. Würde Doxorubicin zusätzlich an andere Schichten binden, so müssen sich die ermittelten Konzentrationswerte stark voneinander unterscheiden. Dies ist nicht der Fall. Somit sind diese funktionalisierten Systeme für weitere Verkapselungsversuche sowie für die Anwendung als Drug-Delivery System sehr gut geeignet.

Auf Grund des strukturellen Begleiteffekts von PEI werden ebenfalls (PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsysteme untersucht. Dazu wird die 4. und die 5. Schicht mit dem Wirkstoff modifiziert und anschließend charakterisiert. Die Schichtanzahl wird deshalb gewählt, um so einen Einblick in die Stabilität der Partikelsuspensionen zu erhalten. Je mehr Schichten umso höher ist die Möglichkeit, dass die Stabilität der Suspension verringert wird. Des Weiteren ermöglichen PEI und PSSa-co-MA, dass der Wirkstoff auf zwei verschiedene Wege an die Partikel gebunden werden kann. Auch hier werden die erfolgreiche Funktionalisierung sowie die Stabilität der Partikelsuspension nachgewiesen.

Um eine genaue Aussage über das Verhalten dieser Drug-Delivery Systeme machen zu können, müssen verschiedene biologische Zellversuche folgen. Nur so ist es möglich, herauszufinden, welches dieser Schichtsysteme das größte Potential aufweist.

7. FLUORESZENZ-MARKIERTE NANOPARTIKEL ALS MULTIFUNKTIONALE NANOCARRIERS

7.1 ÜBERSICHT DER VERSCHIEDENEN BESCHICHTUNGSMÖGLICHKEITEN VON NANOPARTIKEL

Zur Detektion bestimmter Proteine, aufgenommener Wirkstoffe sowie deren Aufnahmeweg oder zur Lokalisierung von diverser, intrazellulär ablaufender Prozessen hat sich die Fluoreszenz-Mikroskopie als eine der aufschlussreichsten Charakterisierungsmethoden herauskristallisiert. Die Fluoreszenzmarkierung kann durch fluoreszierende Proteine oder markierte Antikörper erreicht werden. Es können aber auch Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluorescein-5-IsoThioCyanat (FITC) oder 4',6-DiAmidin-2'-PhenylIndol (DAPI) genutzt werden. Alle Fluorophore müssen bestimmte Anforderungen erfüllen. So dürfen sie zum Beispiel die physiko-chemischen Eigenschaften des Trägersystems nicht beeinflussen und sollten kovalent an das Trägersystem gebunden sein. Wenn der Fluoreszenzfarbstoff nicht kovalent an das System gebunden ist, besteht die Möglichkeit, dass der Farbstoff bereits vor der Aufnahme in die Zelle freigesetzt wird.

Viele Wirkstoffe zeigen keine eigene Fluoreszenz, wodurch eine Analyse der Aufnahme oder des Aufnahmewegs in die Zellen schwierig ist. Durch die zusätzliche Anbindung eines Markers an diese Wirkstoff-beladenen Trägersysteme kann dies umgangen werden. Eine Alternative ist die Bindung von zwei verschiedenen Fluoreszenzmarkern an das gleiche Trägersystem, wie z. B. FITC und Doxorubicin. Diese bieten die Möglichkeit einer genauen Lokalisierung der Wirkstoff-beladenen Systeme in den Zellen. Die zu analysierenden Zellen müssen so die Fluoreszenz von Doxorubicin sowie die des FITCs aufweisen. Im Falle des Doxorubicins weist der Zellkern, nach der Interkalation, eine rote Fluoreszenz auf, wohingegen außerhalb des Zellkerns die grüne Fluoreszenz des FITCs zu sehen sein muss. So kann eine genaue Aussage getroffen werden, ob Wirkstoff-funktionalisierte Systeme in die Zelle aufgenommen werden oder nur der Wirkstoff.

Bei den in der Arbeit verwendeten Fluoreszenzmarkern handelt es sich zum Einen um FITC, dessen Extinktionsmaximum bei 492 nm liegt und das Emissionsmaximum bei 518 nm, und zum Anderen um DAPI. Die charakteristischen Maxima für DAPI liegen für die Extinktion bei 350 nm und für die Emission bei 461 nm. Beide Marker kommen vor allem in biologischen Untersuchungen oft zum Einsatz. Weiterhin besteht die Möglichkeit, durch die Verwendung dieser Fluoreszenzfarbstoffe ein größeres Einsatzgebiet abzudecken. Als Trägersystem werden $Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe_2O_4$ Nanopartikel verwendet.

Auf Grund der vielen Modifizierungsmöglichkeiten der Nanopartikeloberfläche können auch diverse Bisphosphonate sowie synthetische Aminosäuren zur Beschichtung verwendet

werden. Eingesetzt werden bei den Bisphosphonaten Alendronsäure und 1,1-Diphosphono-2,3-Dicarbonsäure (DPDC) (siehe Abbildung 2.3) und bei den synthetischen Aminosäuren 6-Aminohexansäure. Im Gegensatz zu Dextranen müssen diese Stoffe zuvor nicht modifiziert werden und weisen eine bessere thermische Beständigkeit auf. Bedingt durch die vorhandenen funktionellen Gruppen ist die Anbindung unterschiedlichster Verbindungen wie z. B. Wirkstoffe, Polymere, Biomoleküle, Fluoreszenzmarker realisierbar. Ein weiterer Vorteil ist deren Biokompatibilität.

7.1.1 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON ALENDRONSÄURE- ODER 1,1-DIPHOSPHONO-2,3-DICARBONSÄURE-BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN

Auf Grund der thermischen Beständigkeit erfolgt die Oberflächenmodifizierung der Partikel mit Bisphosphonaten unmittelbar nach dem Fällungsprozess, d. h. ohne vorherige Stabilisierung mit Citrat-Ionen. Dadurch erfolgt die Bindung an die Partikel über die vorhandenen Phosphorsäure-Gruppen. Die funktionelle Gruppe, an die der Fluoreszenzmarker oder der Wirkstoff gebunden werden kann, ist im Falle der Alendronsäure die primäre Amino-Gruppe und bei DPDC die Carboxyl-Gruppen.

Beide beschichteten Partikeldispersionen weisen einen pH-Wert auf, der für medizinische Anwendungen erforderlich ist. Des Weiteren zeigen beide beschichteten Partikel ein negatives Zetapotential. Tabelle 7.1 fasst pH-Werte, Konzentrationen und ermittelte Zetapotentiale zusammen.

Tabelle 7.1: Zusammenfassung der pH-Wert-Bestimmung, der Konzentration sowie des Zetapotentials der beiden Bisphosphonat-beschichteten Partikel.

funktionalisierte Nanopartikel	pH-Wert der Dispersion	Konzentration der Dispersion [mg·mL ⁻¹]
Alendronsäure-beschichtete MnZn-Ferrite	7,23-7,68	32
DPDC-beschichtete MnZn-Ferrite	7,12	33

Zur Größenbestimmung der beschichteten MnZn-MNP werden Röntgendiffraktometrie und dynamische Lichtstreuung genutzt. Die Bestimmung der Kristallitgröße erfolgt durch Auswertung der XRD-Reflexe unter Anwendung der Scherrer-Theorie. In Abbildung 7.1 und Abbildung 7.2 sind typische Diffraktogramme von beschichteten MnZn-Ferriten dargestellt.

Zur Identifizierung werden die gemessenen Diffraktogramme der Probe mit den charakteristischen Reflexen von $\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ aus der Kristalldatenbank (Jacobsite zincian, PDF 74-2402) verglichen. In den Diffraktogrammen sind die Reflexe der Kristalldatenbank als blaue Linien gekennzeichnet. Die Bestimmung des volumengemittelten Kristallitdurchmessers erfolgt mittels des Scherrer-Verfahrens durch Heranziehen der signalintensivsten Reflexe (220), (311), (400), (422), (511), (440). Vorher werden die Diffraktogramme mit Hilfe einer Basislinienkorrektur angepasst. Unter Verwendung einer Lorentz-Anpassung (vgl. Gleichung 4-1) wird die FWHM der Reflexe bestimmt. Die Abbildung 7.1 zeigt XRD-Messungen von Alendronsäure-beschichteten Partikeln. Die beschichteten Nanopartikel liegen nanokristallin vor und das Vorhandensein von Fremdphasen kann ausgeschlossen werden. Die Kristallitgröße der Nanopartikel liegt bei $13,5 \text{ nm} \pm 1,3 \text{ nm}$.

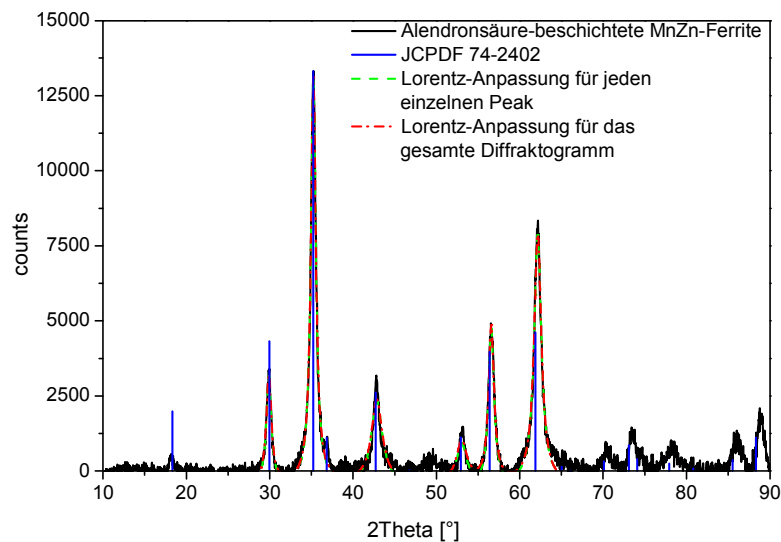


Abbildung 7.1: Darstellung eines typischen Diffraktogramms von Alendronsäure-beschichteten Partikeln mit den charakteristischen Reflexen. Die Lorentz-Anpassung ist grün bzw. rot markiert und die Reflexe aus der Datenbank blau.

Tabelle 7.2: Zusammenfassung der Scherrer-Kalkulation für die signalintensivsten Reflexe von Alendronsäure-beschichteten Partikeln.

<i>hkl</i>	220	311	400	422	511	440
2θ [°]	29,904	35,241	42,853	53,026	56,586	62,155
FWHM [°]	0,723	1,614	0,705	1,551	0,779	1,066
L_{vol} [nm]	12,8	5,9	13,0	6,4	12,9	9,7
D_{vol} [nm]	17,1	7,9	17,3	8,5	17,2	12,9
$\varnothing D_{vol}$ [nm]	$13,5 \pm 1,3$					

Hingegen präsentiert Abbildung 7.2 die charakteristischen Reflexe von MnZn-MNP, welches mit DPDC beschichtet wird. Anhand der aufgenommenen Diffraktogramme wird deutlich, dass die Reflexe der beschichteten Partikel vollständig mit denen der Datenbank übereinstimmen und kristallin vorliegen. Das Vorhandensein von Fremdphasen kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Die volumengemittelte Kristallitgröße dieser Nanopartikel beläuft sich auf $17,6 \text{ nm} \pm 1,1 \text{ nm}$. Die entsprechende Scherrer-Kalkulation ist zusammenfassend in Tabelle 7.3 dargestellt.

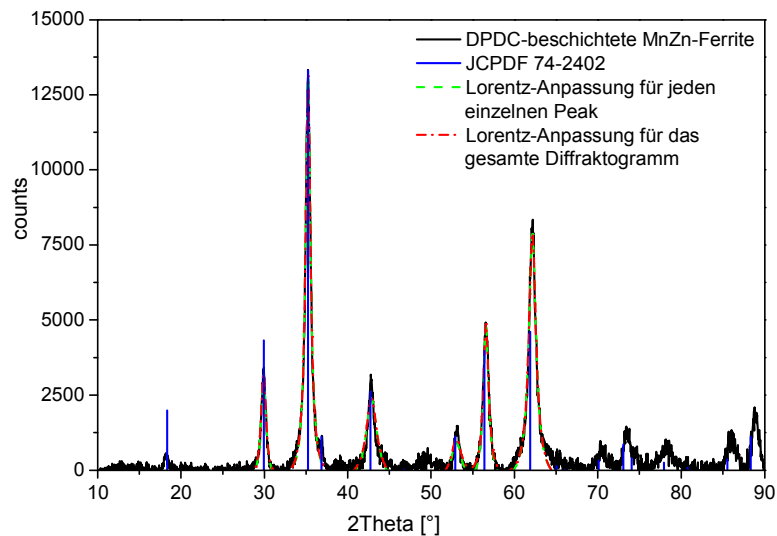


Abbildung 7.2: Darstellung einer XRD-Messung von DPDC-beschichteten Partikeln mit den typischen Reflexen. Die Lorentz-Anpassung ist ebenfalls grün bzw. rot markiert und die Reflexe aus der Datenbank blau.

Tabelle 7.3: Zusammenfassung der Scherrer-Kalkulation der signalintensivsten Reflexe der DPDC-beschichteten Partikel.

<i>hkl</i>	220	311	400	422	511	440
2θ [°]	29,962	35,310	42,967	53,224	56,754	62,326
<i>FWHM</i> [°]	0,589	0,636	0,989	0,672	0,710	0,987
<i>L</i>_{vol} [nm]	15,5	14,6	9,6	14,7	14,1	10,5
<i>D</i>_{vol} [nm]	20,7	19,5	12,8	19,6	18,8	14,0
$\bar{\phi} D_{vol}$ [nm]	$17,6 \pm 1,3$					

Die Messung des hydrodynamischen Durchmessers erfolgt mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS). Die Ergebnisse der Größenverteilungskurven von Bisphosphonat-beschichteten Nanopartikeln sind in Abbildung 7.3 wiedergegeben.

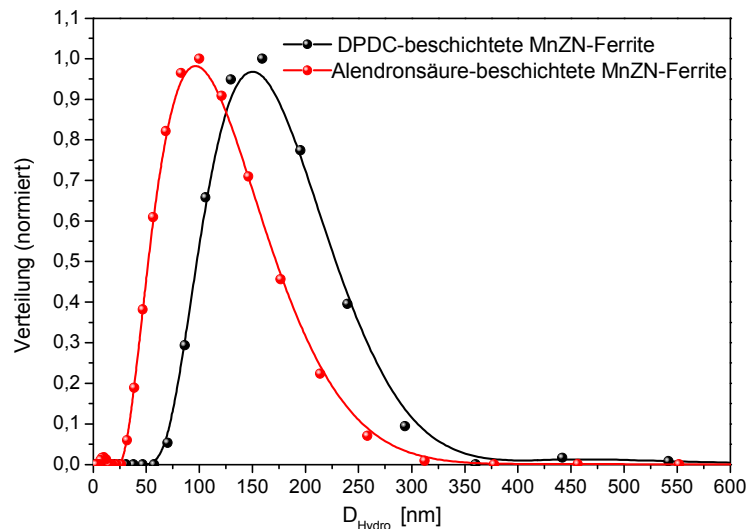


Abbildung 7.3: Darstellung einer Größenverteilungskurven von beschichteten Partikeln. Die DPDC-beschichteten Partikel ($D_{Hydro} = 166$ nm) haben einen größeren hydrodynamischen Durchmesser als die mit Alendronsäure beschichteten Partikel ($D_{Hydro} = 119$ nm).

Die mit Alendronsäure beschichteten Partikel sind mit einem Durchmesser von 119 nm kleiner als die mit DPDC-beschichteten MnZn-Ferriten, deren hydrodynamische Durchmesser bei 166 nm liegt. Dieser Unterschied kann auf eine größere Solvathülle der DPDC-beschichteten Partikeln zurückzuführen sein. Diese Solvathülle kommt auf Grund der Wechselwirkung der beiden Carboxyl-Gruppen mit dem Medium (Wasser) zustande. Die Carboxyl-Gruppen von DPDC liegen deprotoniert vor (siehe FT-IR-Spektrum in Abbildung 7.7) und nehmen deshalb den maximalen Abstand zu einander ein. Durch diesen maximalen Abstand nimmt die Solvathülle zu und damit auch der hydrodynamische Durchmesser. Bei den Alendronsäure-beschichteten MnZn-Nanopartikeln findet hingegen nur eine Wechselwirkung zwischen den freien primären Amino-Gruppen und den Hydroxyl-Ionen statt.

Des Weiteren ist die Kristallitgröße der Alendronsäure-beschichteten Partikeln geringer, welches ebenfalls einen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser ausübt. Eine andere denkbare Erklärung für den größeren Durchmesser ist, dass nicht nur die Phosphonat-Gruppen an die Partikel adsorbieren, sondern auch ein Teil der Carboxyl-Gruppen. Dadurch stehen Aggregate, die einen größeren hydrodynamischen Durchmesser aufweisen.

Beide Partikelsuspensionen weisen eine relativ enge Größenverteilung und einen geringen Aggregationsgrad auf. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 7.4 dargestellt.

Tabelle 7.4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Größenverteilungsberechnung für die beiden Bisphosphonat-beschichteten Partikel.

funktionalisierte Nanopartikel	D_{hydro} [nm] ± Standardfehler	σ ± Standardfehler
Alendronsäure-beschichtete MnZn-Ferrite	118,82 ± 0,77	1,62 ± 0,01
DPDC-beschichtete MnZn-Ferrite	166,16 ± 0,65	1,40 ± 0,01

Ein EDX-Spektrum der mit Alendronsäure beschichteten Partikel kann in Abbildung 7.4 eingesehen werden und ein Spektrum von DPDC-beschichteten Partikeln befindet sich in Abbildung 7.5. In beiden Spektren sind die charakteristischen Linien der Elemente Eisen, Mangan, Phosphor und Zink nachzuweisen.

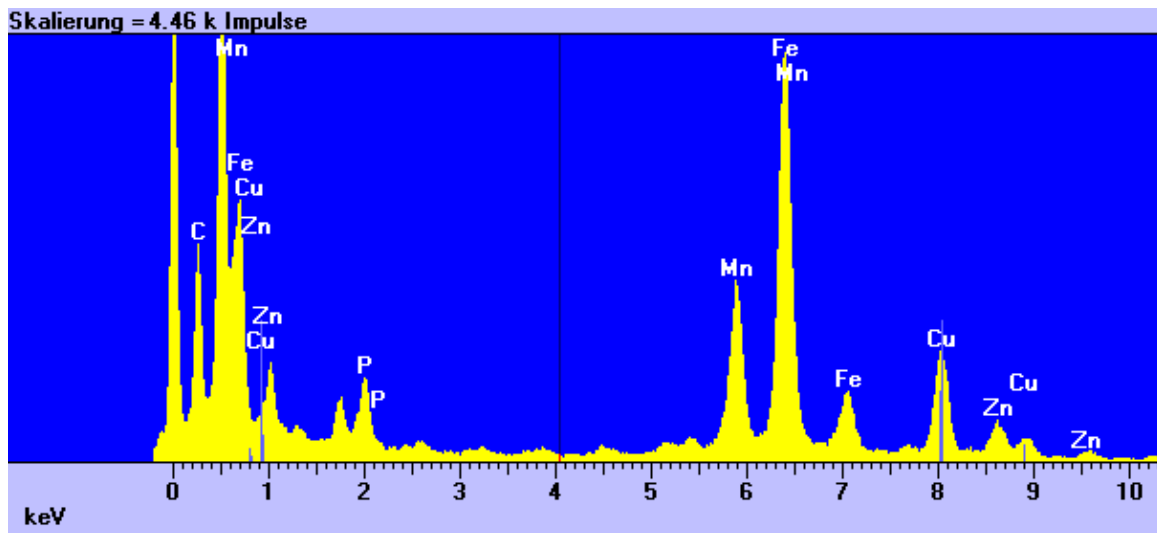


Abbildung 7.4: EDX-Analyse von Alendronsäure-beschichteten Partikeln zeigt die signifikanten Signale der Elemente Eisen, Mangan, Phosphor und Zink.

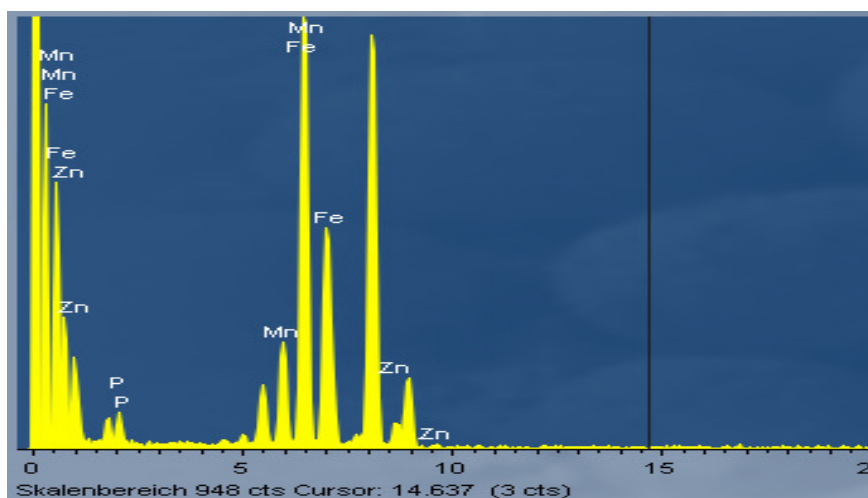


Abbildung 7.5: EDX-Analyse von DPDC-beschichteten Partikeln mit den charakteristischen Signalen der Elemente Eisen, Mangan, Phosphor und Zink.

Um die erfolgreiche Beschichtung der Partikel mit dem entsprechenden Bisphosphonat zu analysieren, wird FT-IR-Spektroskopie zu Hilfe genommen. Allerdings gestaltet sich die Charakterisierung der Bisphosphonate etwas schwieriger als die der Dextran-Derivate, da auf Grund der geringen Anzahl der funktionellen Gruppen auch eine geringere Anzahl an Signalen zu erwarten ist. Abbildung 7.6 zeigt ein FT-IR-Spektrum von Alendronsäure-beschichteten Partikeln.

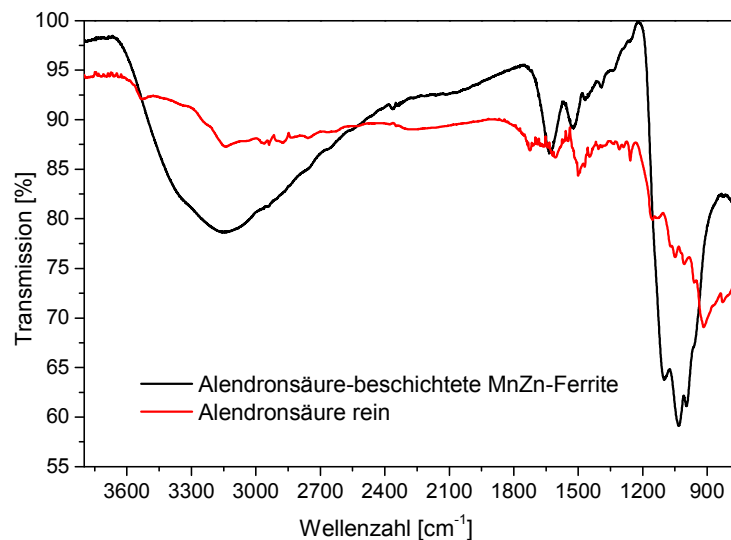


Abbildung 7.6: Darstellung eines FT-IR-Spektrums mit den charakteristischen Absorptionsbanden von Alendronsäure-beschichteten Partikeln. Im Vergleich ist ein FT-IR-Spektrum der reinen Alendronsäure aufgeführt.

Die signifikanten Absorptionsbanden von Alendronsäure-beschichteten Partikeln liegen bei 1633 cm^{-1} , 1526 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 1034 cm^{-1} und 987 cm^{-1} . Die Bande bei 1633 cm^{-1} kann der P=O Valenzschwingung der Phosphonat-Gruppe zugeordnet werden. Die N-H Deformationsschwingung der primären Amino-Gruppe liegt bei einer Wellenzahl von 1526 cm^{-1} . Diese ist auf Grund der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Amino-Gruppe und Wasser zu höheren Frequenzen verschoben. Die C-N Valenzschwingung hat eine Absorptionsbande bei 1100 cm^{-1} .

Die Bindung der Phosphonat-Gruppe an die Partikel führt zur Bildung einer Fe-O-P Bindung, diese weist eine Absorptionsbande bei 1034 cm^{-1} auf.^[179] Ebenfalls bei dieser Wellenzahl liegt die P-O Valenzschwingung. Die Bande bei 987 cm^{-1} kann der P-C-P Valenzschwingung zugeordnet werden. Durch das Vorhandensein dieser Absorptionsbanden kann von einer erfolgreichen Beschichtung der Partikel mittels Alendronsäure ausgegangen werden. In Abbildung 7.7 ist ein repräsentatives FT-IR-Spektrum von DPDC-beschichteten Partikeln aufgezeigt. Die wichtigsten Signale der DPDC-beschichteten Partikel liegen bei 1560 cm^{-1} , 1391 cm^{-1} , 1061 cm^{-1} , 1000 cm^{-1} und 846 cm^{-1} . So hat die asymmetrische Valenzschwingung

der COO^- -Gruppe eine Absorptionsbande bei 1560 cm^{-1} . Der Peak bei 1391 cm^{-1} ist eine Kombination aus C-O Valenzschwingung und der O-H Deformationsschwingung. Die Fe-O-P Schwingung erscheint bei der Wellenzahl 1061 cm^{-1} und fällt mit der P-O Valenzschwingung zusammen. Die Bande bei 1000 cm^{-1} kann der P-C-P Valenzschwingung zugeordnet werden und das Signal bei 846 cm^{-1} der P-C Valenzschwingung. Somit kann von einer erfolgreichen DPDC-Bindung an die Partikel ausgegangen werden.

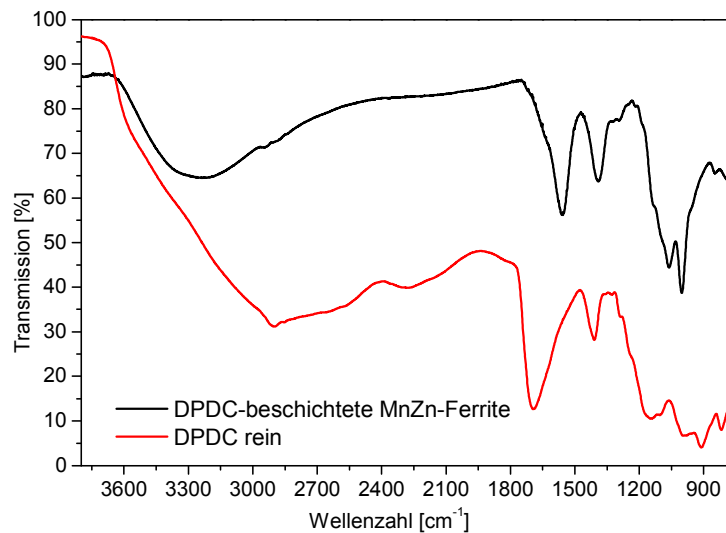


Abbildung 7.7: Darstellung eines FT-IR-Spektrums mit den kennzeichnenden Absorptionsbanden von DPDC-beschichteten Partikeln im Vergleich zu einem FT-IR-Spektrum von nativer DPDC.

Zur Charakterisierung der Morphologie werden TEM-Aufnahmen angefertigt. Diese Aufnahmen sind in Abbildung 7.8 und in Abbildung 7.9 visualisiert. Dabei zeigt Abbildung 7.8 TEM-Aufnahmen der mit Alendronsäure beschichteten Partikel. Diese liegen kristallin vor und zeigen eine enge Größenverteilung.

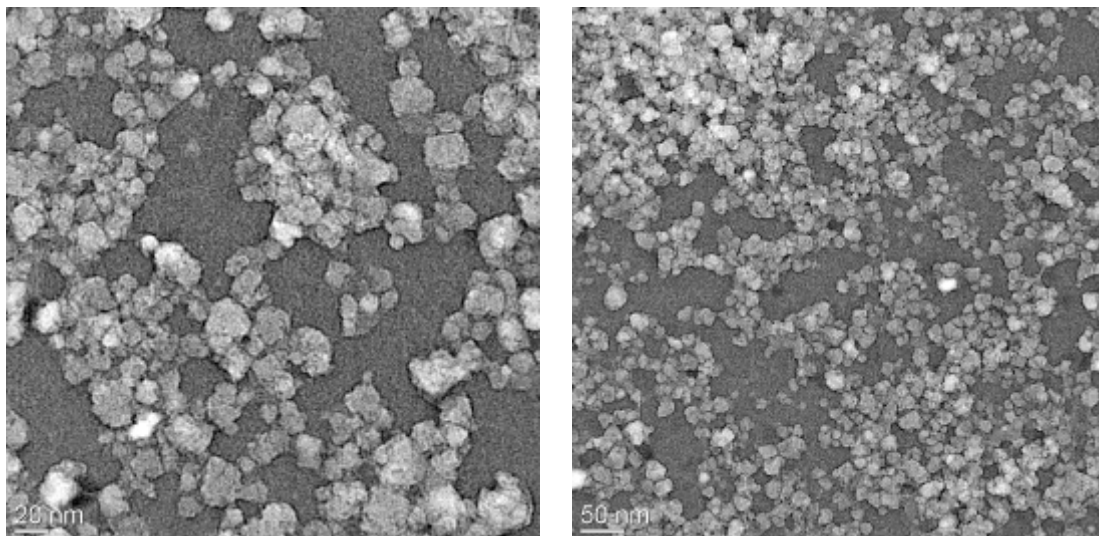


Abbildung 7.8: TEM-Aufnahmen von Alendronsäure-beschichteten Partikeln. Die Partikel zeigen einen geringen Aggregationsgrad und eine enge Größenverteilung.

Abbildung 7.9 repräsentiert TEM-Aufnahmen von DPDC-beschichteten MnZn-Ferriten. Diese Partikel zeigen einen etwas höheren Aggregationsgrad als die Alendronsäure-beschichteten Partikel. Nichtsdestotrotz weisen die Partikel eine gute Kristallinität auf.

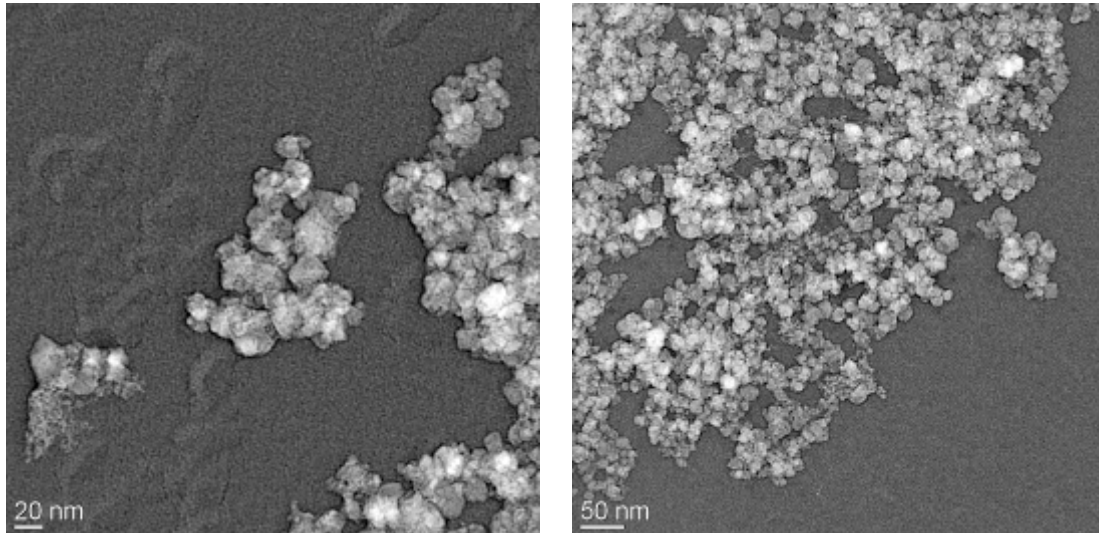


Abbildung 7.9: TEM-Aufnahmen von DPDC-beschichteten Partikeln. Ein leicht erhöhter Aggregationsgrad und gute Polydispersität zeichnen die Partikel aus.

7.1.2 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON 6-AMINOHEXANSÄURE-BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN

Eine weitere Verbindung, deren Anwendung neben Alendronsäure und DPDC noch näher untersucht wird, stellt 6-Aminohexansäure dar. Hierbei handelt es sich um eine synthetische Aminosäure, die somit als biokompatibel eingestuft werden kann. Die Stabilisierung der Partikel erfolgt direkt mit 6-Aminohexansäure unmittelbar nach der Synthese. Die funktionelle Gruppe, welche an die Partikel bindet, sind die Carboxyl-Gruppen. Zur Bindung des Wirkstoffs an die beschichteten Partikel steht dementsprechend die primäre Amino-Gruppe zur Verfügung. Zur Charakterisierung der 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikel werden die bereits etablierten und bewährten Methoden XRD, DLS, EDX, FT-IR und TEM zu Hilfe genommen.

Die Dispersionen weisen bei einem pH-Wert von 8,27 und einer Konzentration von $32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ sowie ein Zetapotential von $-25,3 \text{ mV} \pm 4,8 \text{ mV}$ auf.

Abbildung 7.10 zeigt ein Diffraktogramm von 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln. Wie anhand des Diffraktogramms zu erkennen ist, stimmen die Reflexe der beschichteten

MnZn-Ferrite mit denen der Kristalldatenbank überein. Das Vorhandensein von Fremdphasen kann ausgeschlossen werden und darüber hinaus liegen die Nanopartikel kristallin vor. Zur Berechnung der Kristallitgröße mittels der Scherrer-Theorie werden die signalintensivsten Reflexe (220), (311), (400), (422), (511) und (440) herangezogen.

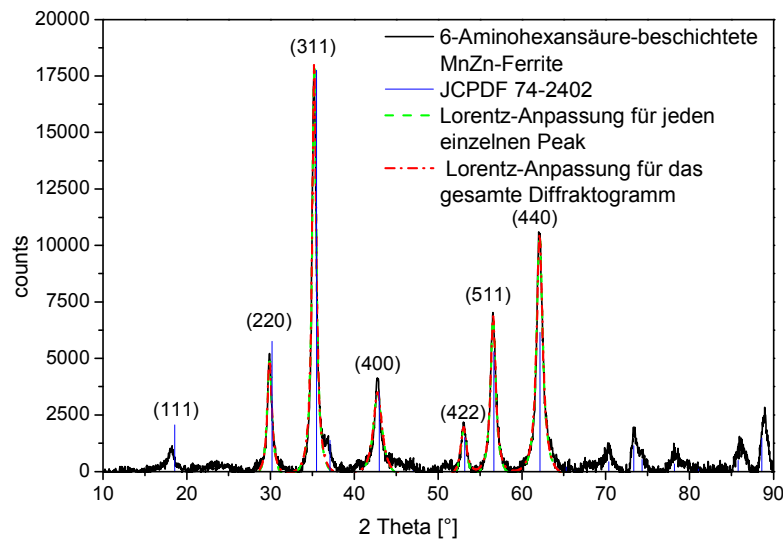


Abbildung 7.10: Darstellung eines basislinienkorrigierten Diffraktogramms von 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln mit den typischen Reflexen. Der Lorentz-Anpassung ist grün (jeder einzelne Peak) bzw. rot (gesamte Diffraktogramm) aufgetragen und die Referenzreflexe der Datenbank sind als blaue Linien dargestellt.

Die entsprechend ermittelten Größen sind in Tabelle 7.5 zusammengefasst. Für die 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikel ergibt sich eine Kristallitgröße von durchschnittlich $16,2 \text{ nm} \pm 1,2 \text{ nm}$.

Tabelle 7.5: Zusammenfassung der volumengemittelten Kristallitgröße (D_{vol}) sowie der Scherrer-Kalkulation für die signalintensivsten Reflexe der 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikel.

<i>hkl</i>	220	311	400	422	511	440
2θ [°]	29,898	35,216	42,781	53,044	56,563	62,114
<i>FWHM</i> [°]	0,683	0,591	1,293	0,863	0,755	0,863
L_{vol} [nm]	13,4	15,7	7,3	11,4	13,3	11,9
D_{vol} [nm]	17,9	20,9	9,7	15,2	17,7	15,9
$\emptyset D_{vol}$ [nm]	$16,2 \pm 1,2$					

Eine Größenverteilungskurve der beschichteten Partikel, die in Abbildung 7.11 graphisch dargestellt ist, wird mittels DLS bestimmt. Die beschichteten MnZn-Ferrite weisen einen hydrodynamischen Durchmesser von 116 nm und eine Polydispersität von 1,60 auf und zeigen nahezu den identischen Durchmesser wie die mit Alendronsäure beschichteten Partikel.

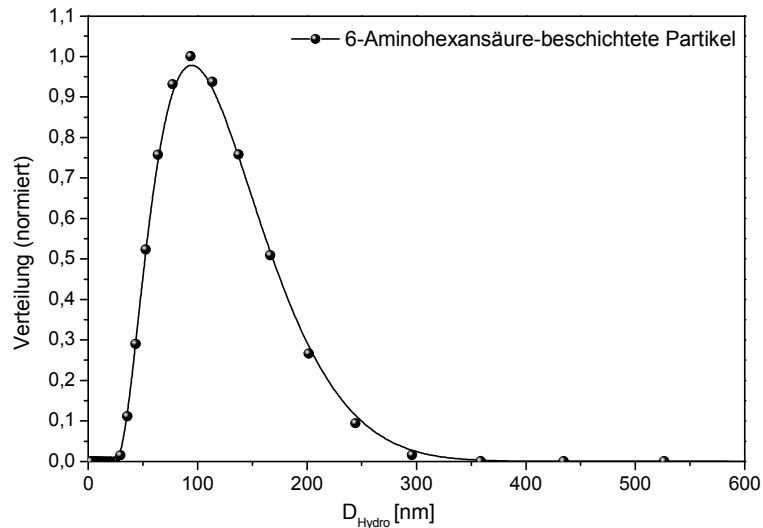


Abbildung 7.11: Darstellung einer Größenverteilungskurve von 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln. Der hydrodynamische Durchmesser beträgt 116 nm und der Polydispersitätswert liegt bei 1,60.

Die Elementaranalyse von 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln mittels EDX bestätigt durch die charakteristischen Linien das Vorhandensein von Eisen, Mangan und Zink. (siehe dazu Abbildung 7.12).

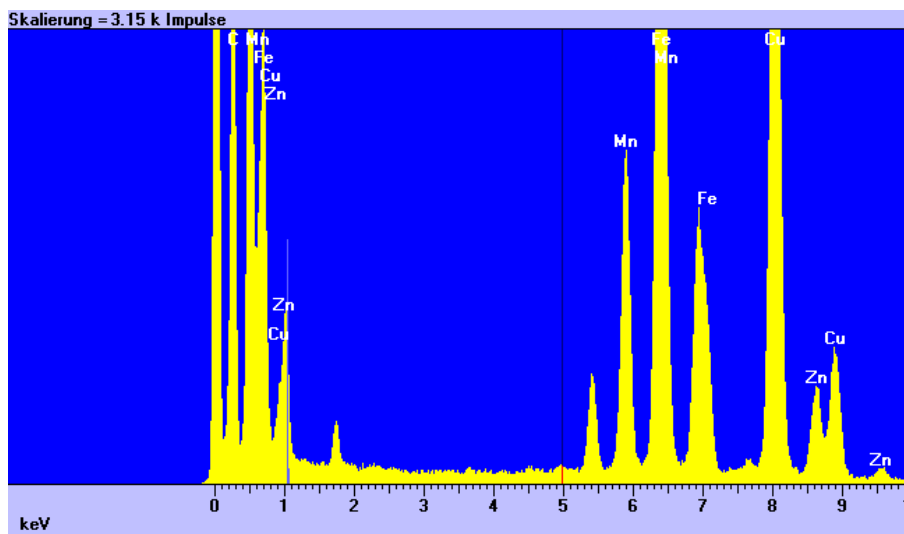


Abbildung 7.12: EDX-Analyse von 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln mit den charakteristischen Signalen der Elemente Eisen, Mangan und Zink.

Die Überprüfung, ob die 6-Aminohexansäure an die Nanopartikeloberfläche adsorbiert, wird durch FT-IR-Spektroskopie vorgenommen. Ein dazugehöriges Spektrum von beschichteten Partikeln ist in Abbildung 7.13 veranschaulicht. Die signifikanten Absorptionsbanden liegen bei den Wellenzahlen 3360 cm^{-1} , 2945 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} , 1330 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} und 900 cm^{-1} .

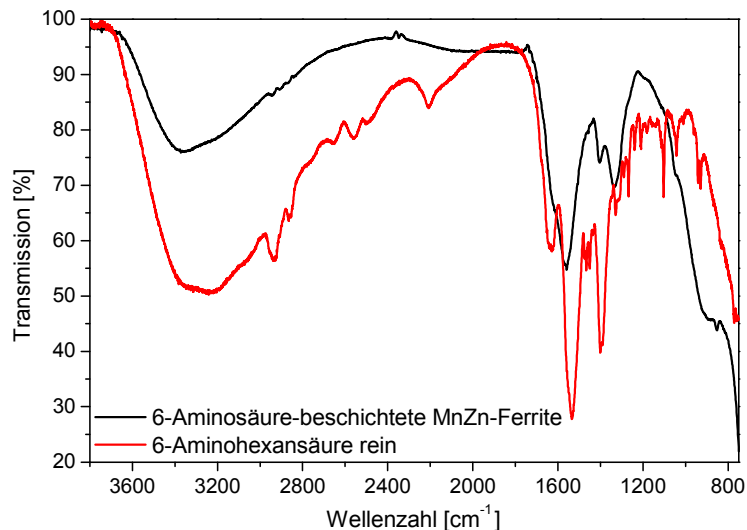


Abbildung 7.13: Darstellung eines FT-IR-Spektrums mit den kennzeichnenden Signalen von 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln im Vergleich zu einem FT-IR-Spektrum von reiner 6-Aminohexansäure.

Die breite Absorptionsbande bei 3360 cm^{-1} ist eine Kombination aus der O-H und N-H Valenzschwingung, wohingegen die C-H Valenzschwingung ein schwaches Signal bei 2945 cm^{-1} hat. Die Bande der deprotonierten Carboxyl-Gruppe erscheint bei 1625 cm^{-1} sowie bei 1411 cm^{-1} . Das erste Signal kommt auf Grund der asymmetrischen Valenzschwingung zustande und ist von der Intensität her stärker als das zweite Signal, welches der symmetrischen Valenzschwingung zugeordnet werden kann. Die N-H Deformationsschwingung der primären Amino-Gruppe liegt bei 1560 cm^{-1} und die C-N Valenzschwingung dieser Gruppe kann der Bande bei 1060 cm^{-1} zugeordnet werden. Beide Signale bei 1330 cm^{-1} und 900 cm^{-1} sind Banden, die auf Grund von Kombination aus C-H, C-O und N-H Schwingungen zustande kommen. Durch das Vorhandensein der charakteristischen Schwingungen kann von einer gelungenen Beschichtung der Partikel mit 6-Aminohexansäure ausgegangen werden.

Die Morphologie der mit 6-Aminohexansäure beschichteten Partikel wird anhand von TEM-Aufnahmen charakterisiert (vgl. Abbildung 7.14). Die beschichteten Partikel sind relativ monodispers, neigen aber leicht zur Agglomeration.

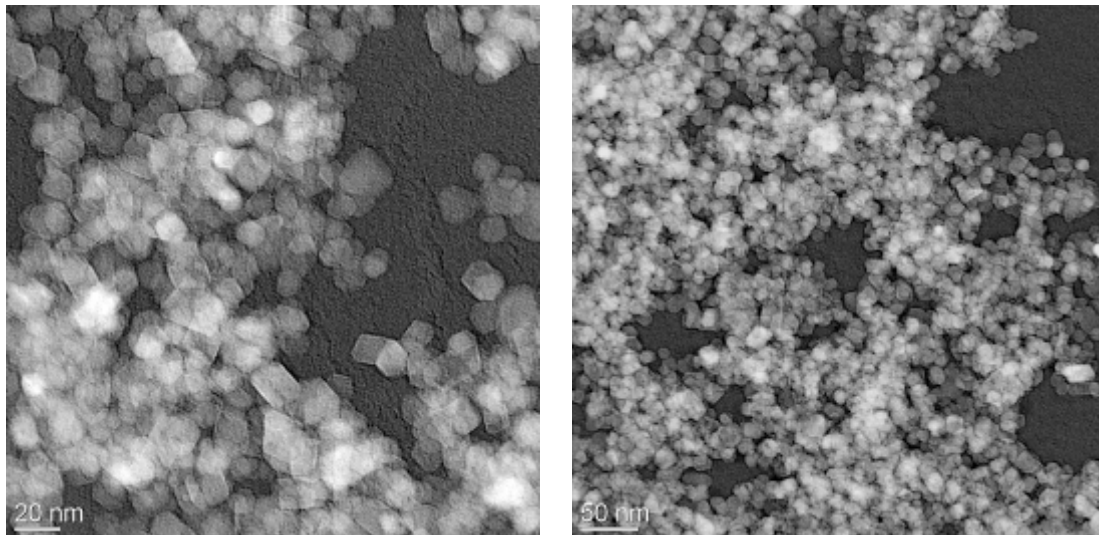


Abbildung 7.14: TEM-Aufnahmen von Partikeln, die mit 6-Aminohexansäure beschichtet sind. Der Aggregationsgrad ist leicht erhöht, dafür weisen diese Partikel eine relativ enge Größenverteilung auf.

7.1.3 KAPITELZUSAMMENFASSUNG

Die im Rahmen dieses Kapitels dargestellten Synthesen zur Beschichtung von Nanopartikeln zeichnen sich ausnahmslos durch sehr gute Reproduzierbarkeit aus. Zur Größenbestimmung von beschichteten Nanopartikeln werden drei verschiedene Verfahren eingesetzt. Diese Verfahren sind Röntgendiffraktometrie (XRD), dynamische Lichtstreuung (DLS) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

Die Bestimmung der Kristallitgröße der beschichteten Nanopartikel erfolgt mit XRD. Diese Messungen zeigen, dass die XRD-Reflexe der beschichteten Partikel mit den Reflexen aus der Literatur übereinstimmen. Die mit DPDC- bzw. mit 6-Aminohexansäure beschichteten Partikel liegen mit 17,6 nm bzw. 16,2 nm etwa im gleichen Größenbereich, die mit Alendronsäure beschichteten Partikel haben eine Kristallitgröße von 13,5 nm. Diese Größendifferenz kann aus der Fällungsmethode resultieren.

Im Anschluss an die XRD-Messungen wird mit Hilfe der DLS der hydrodynamische Durchmesser der beschichteten Partikel bestimmt. Die mit DPDC-beschichteten MnZn-Ferrite zeigen einen größeren hydrodynamischen Durchmesser, als die mit Alendronsäure oder 6-Aminohexansäure beschichteten Partikel. Bei letzteren liegt der Durchmesser um die 117 nm, wohingegen der Durchmesser der DPDC-beschichteten Partikeln 166 nm beträgt. Eine mögliche Ursache dafür kann in den vorhandenen Carboxyl-Gruppen von DPDC liegen. Diese gehen mit dem Suspensionsmedium Wasser eine stärkere Wechselwirkung ein, wodurch eine größere Solvathülle gebildet wird, als das es bei den

primären Amino-Gruppen der Fall ist. Eine andere denkbare Erklärung ist, dass nicht nur die Phosphonat-Gruppen an die Partikel adsorbieren, sondern auch ein Teil der Carboxyl-Gruppen. Dies klärt den erhöhten Aggregationsgrad, der in den TEM-Aufnahmen zu erkennen ist.

Die angefertigten TEM-Aufnahmen der beschichteten Partikel visualisieren in allen Fällen Partikel, die gut dispergiert vorliegen. Bei DPDC- sowie bei 6-Aminohexansäure-beschichteten MnZn-Ferriten kann ein leicht erhöhter Aggregationsgrad festgestellt werden. Die mit Alendronsäure beschichteten Partikel zeigen hingegen eine relativ enge Größenverteilung.

Die Beschichtung der Partikel wird mittels FT-IR-Spektroskopie charakterisiert. Bei Bisphosphonat- sowie bei 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln wird auf Grund der charakteristischen Absorptionbande eine erfolgreiche Beschichtung der Partikel angenommen. Bei den Partikeln mit Bisphosphonat wird die Fe-O-P Bindung im Spektrum nachgewiesen. Somit können die beschichteten Partikel mit den ausgewählten Fluoreszenzmarkern funktionalisiert werden.

7.2 MODIFIZIERUNG BESCHICHTETER NANOPARTIKEL MITTELS FLUORESZENZMARKERN

7.2.1 FUNKTIONALISIERUNG VON BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN MIT FITC

In der Fluoreszenz-Mikroskopie ist FITC einer der am häufigsten eingesetzten Fluoreszenzmarker. Diese Tatsache wird vor allem auf die Möglichkeit zur Verwendung eines Argon-Ionen-Lasers ($\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$) als Anregungsquelle zurückgeführt. Das Extinktionsmaximum von FITC liegt bei 494 nm und das entsprechende Emissionsmaximum bei 518 nm.

Weitere Vorteile von FITC sind die hohe Detektionsempfindlichkeit und die Fähigkeit, mit primären und sekundären Aminen zu reagieren. Somit kommen Alendronsäure und 6-Aminohexansäure-beschichtete Partikel für die Anbindung an FITC in Frage. Am Beispiel von Alendronsäure-beschichteten Partikeln ist in Abbildung 7.15 die Reaktion mit FITC schematisch dargestellt. Die analoge Reaktion läuft bei 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln ab.

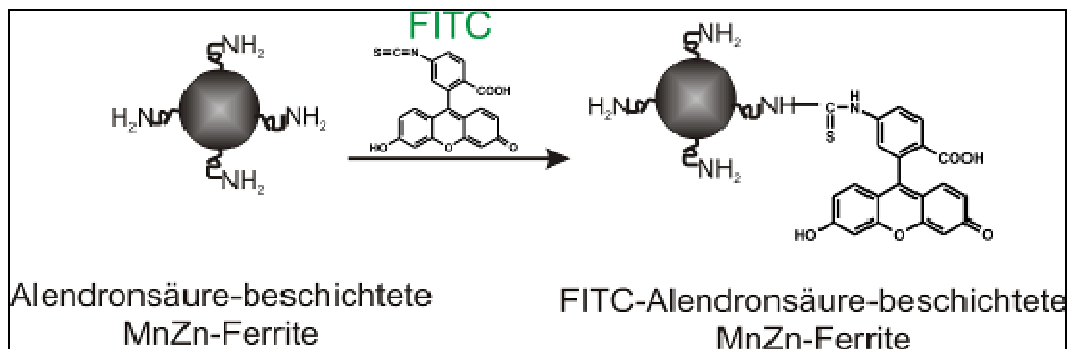


Abbildung 7.15: Schematische Darstellung der Anbindung von FITC an beschichtete MnZn-Ferrite.

Veranschaulicht ist diese Reaktion am Beispiel der Alendronsäure-beschichteten Partikeln. Dabei entstehen O-(fluoresceinylthiocarbamoyl)-Alendronsäure-beschichtete Partikel.

Der pH-Wert von FITC-Alendronsäure-funktionalisierten Partikeldispersionen liegt bei 7,40 und der der FITC-6-Aminohexansäure-funktionalisierten Partikeln bei 6,08. Somit liegen beide pH-Werte in einem für medizinische Anwendungen optimalen Bereich. In allen Fällen wird eine Partikelkonzentration von $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ verwendet.

Durch die Anbindung von FITC an beschichtete MnZn-Ferritpartikel kommt es zu einer Änderung des hydrodynamischen Durchmessers. Diese Änderung beruht auf einer Vergrößerung der Solvathülle. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der funktionalisierten Partikel werden DLS-Messungen durchgeführt. In Tabelle 7.6 sind die DLS-Ergebnisse zusammengefasst, die in Abbildung 7.16 dargestellt sind.

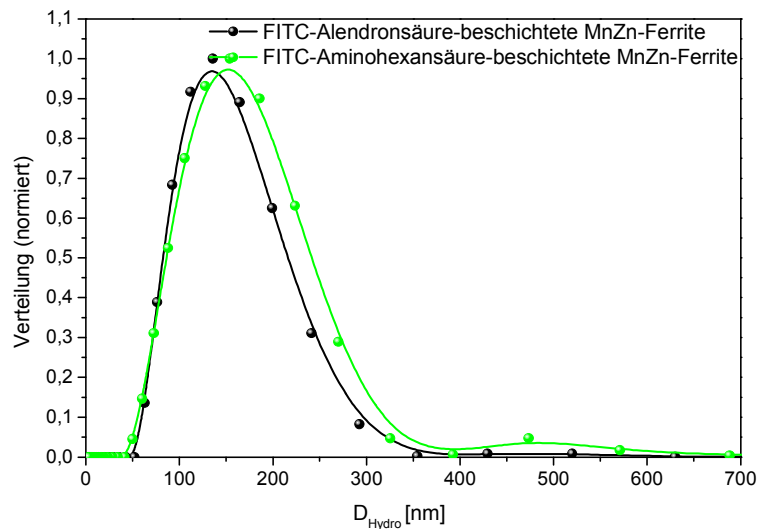


Abbildung 7.16: Darstellung der Größenverteilungskurven von FITC-markierten Nanopartikeln. Für beide funktionalisierten Partikel ist eine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers nach der Anbindung von FITC zu verzeichnen.

Wie aus den DLS-Ergebnissen (vgl. Tabelle 7.6) hervorgeht, nimmt der hydrodynamische Durchmesser nach FITC-Markierung zu. So ändert sich der Durchmesser von Alendronsäure-beschichteten Partikeln von 119 nm auf 154 nm vor und nach der FITC Markierung. Bei den 6-Aminohexansäure-beschichteten MnZn-Ferriten ist eine signifikante Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers nach der Fluoreszenzmarkierung zu beobachten. Hier steigt der Durchmesser von 117 nm für rein beschichtete Partikel auf 171 nm für FITC-markierte Partikel an. Beide Messkurven (siehe Abbildung 7.16) zeigen eine relativ enge Größenverteilung, der Wert für die Polydispersität liegt mit 1,50 in einem sehr guten Bereich.

Tabelle 7.6: Vergleich der DLS-Messergebnisse von FITC-markierten Partikeln und von unmarkierten Partikeln.

funktionalisierte Nanopartikel	D_{hydro} [nm] ± Standardfehler	σ ± Standardfehler
Alendronsäure-beschichtete MnZn-Ferrite	118,82 ± 0,77	1,62 ± 0,01
FITC-Alendronsäure-beschichtete MnZn-Ferrite	154,04 ± 0,81	1,47 ± 0,01
6-Aminohexansäure-beschichtete MnZn-Ferrite	116,53 ± 0,69	1,60 ± 0,01
FITC-6-Aminohexansäure-beschichtete MnZn-Ferrite	170,99 ± 1,58	1,52 ± 0,01

Mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie wird die Anbindung FITC an die beschichteten Partikel analysiert. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Abbildung 7.17 und 7.18 graphisch

visualisiert. Anhand dieser Ergebnisse kann in allen Fällen von einer erfolgreichen Fluoreszenzmarkierung ausgegangen werden. Die in Abbildung 7.17 dargestellten Spektren stammen von ausgewählten Untersuchungen von FITC-Alendronsäure-funktionalisierten MnZn-Ferriten. Durch Vergleich der Spektren von Alendronsäure-beschichteten Partikeln und zusätzlich mit FITC-markierten ist eindeutig erkennbar, dass die Anbindung von FITC an die Partikel erfolgreich verlaufen ist. Im Folgenden sollen die charakteristischen Schwingungen, die von der entstandenen NH-CS-NH-Bindung resultieren, im Detail erläutert werden. Die verbleibenden Schwingungen können in Kapitel 9.4 des Anhangs nachgelesen werden.

Die Absorptionsbanden bei 1630 cm^{-1} , 1590 cm^{-1} , 1485 cm^{-1} und 1460 cm^{-1} sind auf Grund der C=C Valenzschwingung des aromatischen Systems von FITC zurückzuführen. Die N-H Valenzschwingung liegt bei 1530 cm^{-1} . Die asymmetrische sowie die symmetrische N-C-N Valenzschwingung haben jeweils Absorptionsbanden bei 1315 cm^{-1} und bei 1205 cm^{-1} . Bei der Wellenzahl 2035 cm^{-1} erscheint in der Regel die asymmetrische N-C-S Valenzschwingung, allerdings kann bedingt durch die Breite des Peaks und die einzelnen Waschschritten davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser Bande um die Valenzschwingung der protonierten NH-CS-NH Bindung handelt. Protonierte sekundäre Amine haben eine Absorptionsbande zwischen 2200 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} . Die symmetrische Valenzschwingung dieser Bindung ist bei 1390 cm^{-1} vorzufinden.

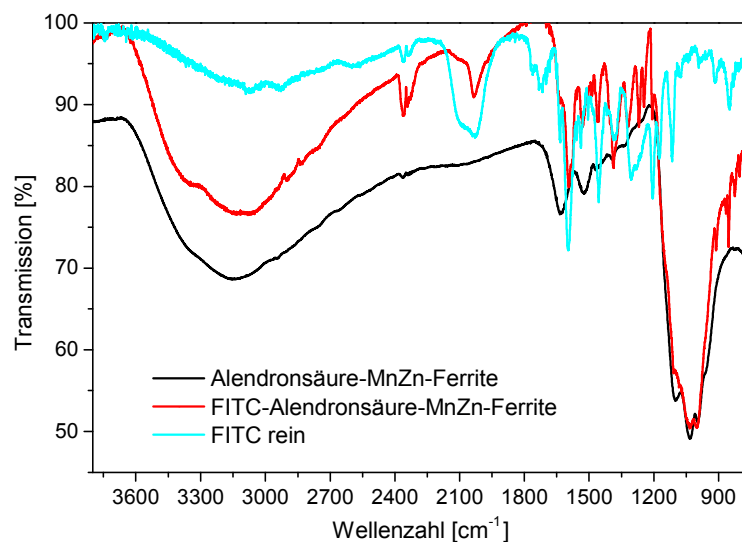


Abbildung 7.17: Darstellung eines FT-IR-Spektrums von Alendronsäure-beschichteten MnZn-Ferriten, die mit FITC markiert sind. Die Fluoreszenzmarkierung der beschichteten Partikel kann anhand der auftretenden Absorptionsbanden bestätigt werden. Zum Vergleich ist ebenfalls das Spektrum von nativem FITC aufgetragen.

Durch Vergleich der jeweiligen Spektren sowie durch die Anwesenheit der charakteristischen Absorptionsbanden kann von einer erfolgreichen Bindung von FITC an Alendronsäure-beschichtete Partikel ausgegangen werden.

Abbildung 7.18 visualisiert die FT-IR-spektroskopischen Analyseergebnisse von FITC-6-Aminohexansäure-funktionalisierten MnZn-Ferriten. Anhand der ausgewählten FT-IR-Spektren von 6-Aminohexansäure-beschichteten MnZn-Ferriten und von FITC kann von einer erfolgreichen Anbindung ausgegangen werden. Das Spektrum der 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikel unterscheidet sich eindeutig von dem der FITC-funktionalisierten MnZn-Ferrite. Im FT-IR-Spektrum von FITC-6-Aminohexansäure-beschichteten MnZn-Ferriten sind deutlich die signifikanten Banden des aromatischen Systems von FITC wiederzufinden. Des Weiteren ist die Absorptionsbande, die durch die Isothiocyanat-Gruppe hervorgerufen wird, gänzlich aus dem Spektrum der FITC-funktionalisierten Partikel verschwunden. Die intensiven Signale bei 1653 cm^{-1} und bei 1579 cm^{-1} stellen Kombinationen aus diversen Schwingungen dar. So ist die Absorptionsbande bei 1653 cm^{-1} der asymmetrischen COO^- Valenzschwingung und der $\text{C}=\text{C}$ Valenzschwingung der Aromaten zuzuordnen. Die Bande bei 1579 cm^{-1} basiert auf der N-H Valenzschwingung und der $\text{C}=\text{C}$ Schwingung des Aromatens.

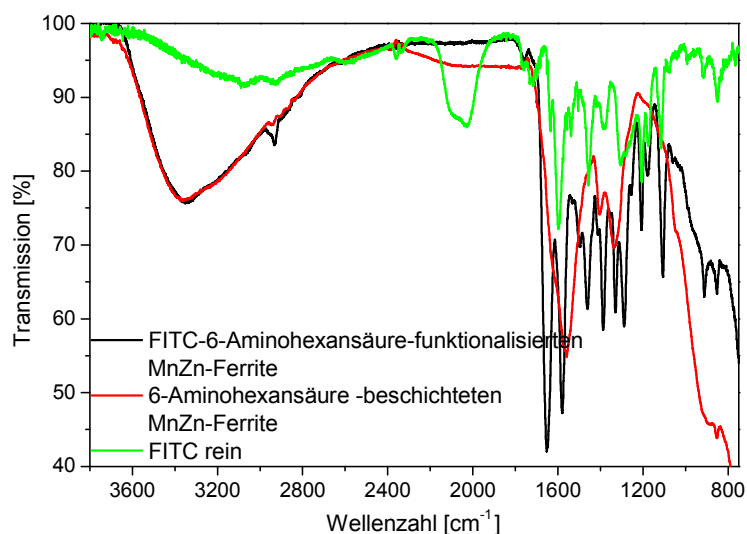


Abbildung 7.18: FT-IR-Spektrum von FITC-markierten Nanopartikeln, die mit 6-Aminohexansäure-beschichtet sind. Die erfolgreiche Markierung mittels FITC kann nachgewiesen werden. Als Vergleich dienen die Spektren von 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln und FITC.

In Abbildung 7.19 und Abbildung 7.20 sind UV / Vis-spektroskopischen Untersuchungen der FITC-markierten Nanopartikel wiedergegeben. Auch hier wird die Stabilität mittels automatisch aufeinanderfolgender Messungen überprüft. Die Zeit zwischen jeder Messung beträgt eine Stunde. Die in Abbildung 7.19 dargestellten Spektren zeigen FITC-Alendronsäure-funktionalisierten Partikel mit dem signifikanten Extinktionsmaximum

von FITC bei 493 nm. Die Zyklenmessungen beweisen, dass es sich um gut dispergierte und stabile Partikelsuspensionen handelt.

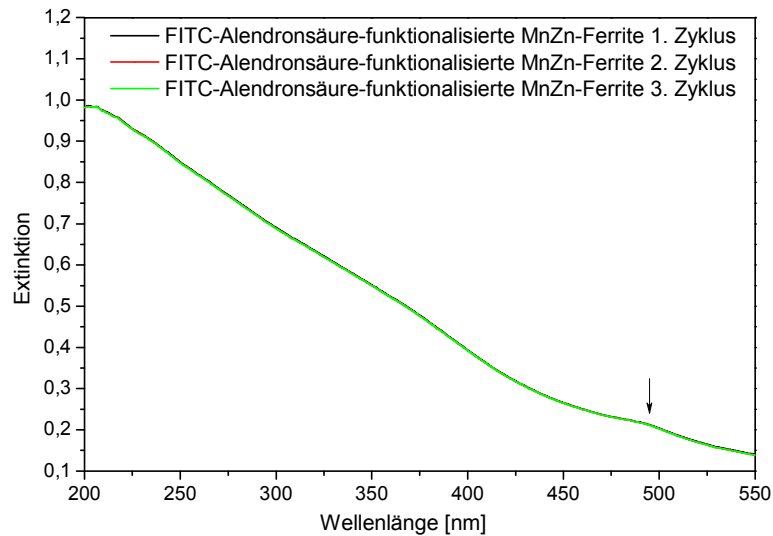


Abbildung 7.19: UV / Vis-Spektren von FITC-Alendronsäure-beschichteten MnZn-Ferriten zeigen die Extinktion von FITC bei 493 nm (siehe Pfeil). Es handelt sich hierbei um 3 hintereinander folgende Messungen. Die Zeitspanne zwischen jeder Messung beträgt eine Stunde.

In Abbildung 7.20 sind UV / Vis-Spektren von 6-Aminohexansäure-beschichteten Nanopartikeln, die mit FITC markiert sind, aufgezeigt. Das charakteristische Extinktionsmaximum von FITC kann bei der Wellenlänge 493 nm eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings ist eine leichte Verminderung der Stabilität der Partikelsuspension zu verzeichnen. Dies macht sich vor allem im Wellenlängenbereich von 200 nm bis 250 nm bemerkbar. Hier weichen die nacheinander aufgenommenen Spektren geringfügig voneinander ab. Dieser Trend ist im restlichen Spektrum nicht zu verzeichnen und geht wahrscheinlich auf das Sedimentieren vereinzelter Aggregate zurück, die auch anhand von TEM-Aufnahmen in Abbildung 7.26 nachgewiesen werden.

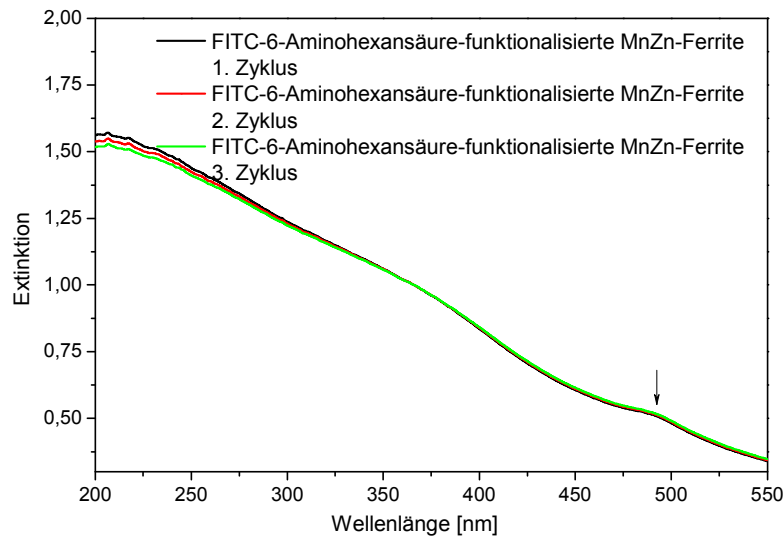


Abbildung 7.20: UV / Vis-Spektren von FITC-6-Aminohexansäure-funktionalisierten MnZn-Nanopartikeln zeigen die Extinktion von FITC bei 493 nm (siehe Pfeil). Die Zeitspanne zwischen jeder Messung beträgt eine Stunde.

Auf Grund der zusätzlich auftretenden Absorption und Streuung der Partikel ist eine eindeutige Bestimmung der Konzentration an FITC in der Suspension nicht möglich. Deshalb wird die Konzentration an FITC in dem dazugehörigen Dialysewasser bestimmt und von der eingesetzten Konzentration abgezogen, um so Rückschlüsse auf die Konzentration an gebundenem FITC in der Suspension zu erhalten. Ausgehend von einer Stammlösung der Konzentration $2,57 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, werden verschiedene Verdünnungen angesetzt, die mittels UV / Vis-Spektroskopie (siehe Abbildung 7.21) analysiert werden. Jede Messung wird dreimal wiederholt. Anschließend wird der Mittelwert aus den drei Intensitäten bei 485 nm gebildet und gegen die zugehörige Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 7.22).

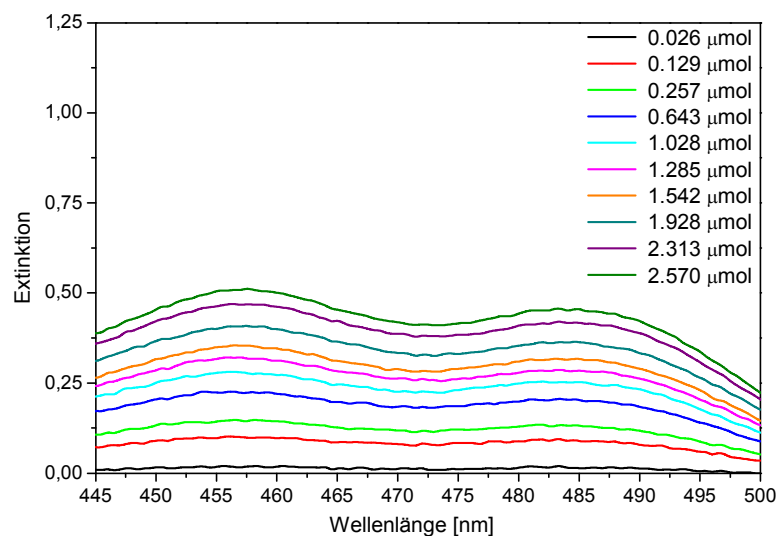


Abbildung 7.21: UV / Vis-Spektren angesetzter Verdünnungen von FITC im Bereich von 445 nm-500 nm. Mit steigender Konzentration nimmt auch die Intensität bei 485 nm zu.

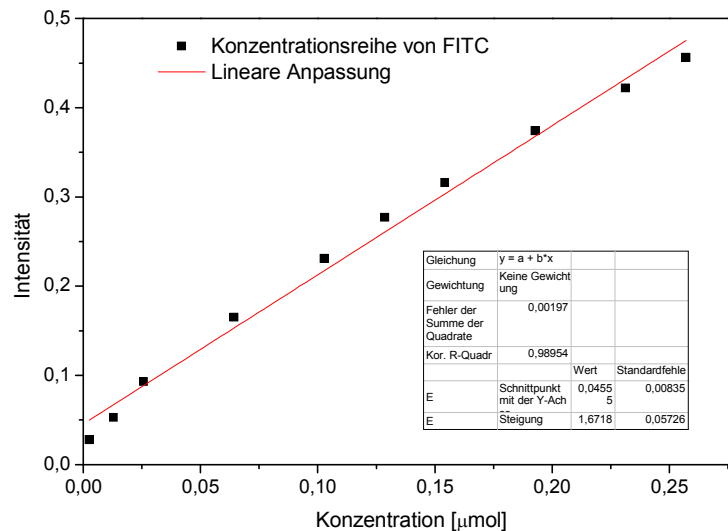


Abbildung 7.22: Graphische Darstellung der Kalibriergerade, erhalten aus den Intensitäten bei 485 nm.

Die berechnete Konzentration an FITC bei den FITC-Alendronsäure-beschichteten MnZn-Ferriten beläuft sich auf $1,83 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ und die der FITC-6-Aminohexansäure-beschichteten Partikel auf $2,06 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Abbildung 7.23 zeigt entsprechende Fluoreszenzspektren der FITC-funktionalisierten Partikel. In allen Spektren sind eindeutig die Extinktions- und Emissionsmaxima von FITC wiederzufinden. Das Maximum der Extinktion liegt bei der Wellenzahl 493 nm und das dazugehörige Emissionsmaximum bei 518 nm.

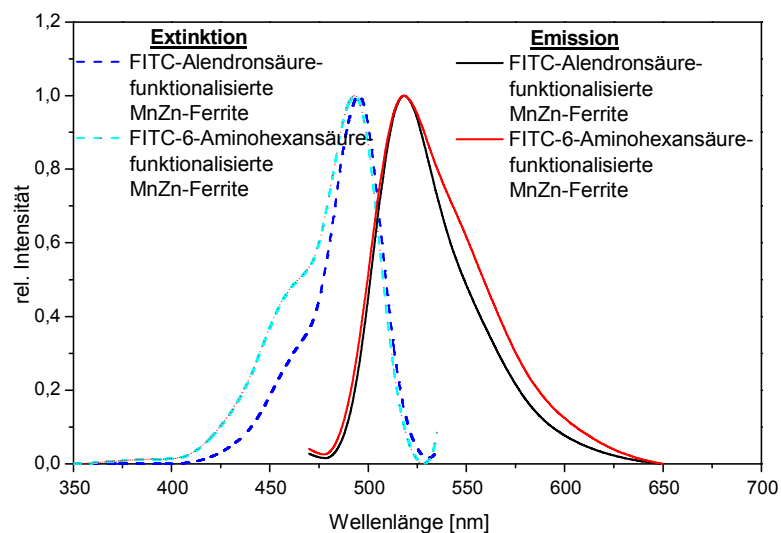


Abbildung 7.23: Extinktions- und Emissions-Spektren von FITC-Alendronsäure-funktionalisierten Partikeln und von FITC-6-Aminohexansäure-funktionalisierten Partikeln. In allen Spektren sind die charakteristischen Maxima ($\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 493 \text{ nm} / 518 \text{ nm}$) von FITC wiederzufinden.

Eine Aussage über die Fluoreszenzmarkierung der beschichteten Partikel kann ebenfalls durch die Zetapotential-Messungen getroffen werden. Hierzu erfolgt eine 5-fache Bestimmung des Potentials mit anschließender arithmetischer Mittlung. Auf Grund des positiven Charakters von FITC und der Tatsache, dass durch die Bindung von FITC an die Partikel ein Teil der Ladungen kompensiert wird, kommt es zur Änderung des Potentials.

So weisen zum Beispiel die Alendronsäure-beschichteten Partikel vor der Funktionalisierung ein Zetapotential von $-32,6$ mV auf, nach der FITC Markierung liegt das Potential bei $-29,4$ mV. Derselbe Effekt ist auch bei den FITC-6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln zu sehen. Hier ändert sich das Zetapotential von $-25,3$ mV auf $-2,4$ mV für FITC-markierte Partikel. Wie zu erkennen ist, ändert sich das Zetapotential bei den mit 6-Aminohexansäure beschichteten Partikeln am Stärksten. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die Tatsache sein, dass mehr FITC an die Partikel gebunden ist. Dies wird auch durch die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung und der DLS-Messungen unterstrichen.

Tabelle 7.7: Zusammenfassung der Zetapotential-Messungen und des isoelektrischen Punkts von FITC-markierten Partikeln. Zum Vergleich sind die Zetapotentiale der rein beschichteten Partikel mit dargestellt.

funktionalisierte Nanopartikel	Zetapotential ζ [mV]	isoelektrischer Punkt [pH-Wert]
Alendronsäure-beschichtete MnZn-Ferrite	$-32,6 \pm 2,6$	-
FITC-Alendronsäure-beschichtete MnZn-Ferrite	$-29,4 \pm 0,7$	4,25
6-Aminohexansäure-beschichtete MnZn-Ferrite	$-25,3 \pm 4,8$	-
FITC-6-Aminohexansäure-beschichtete MnZn-Ferrite	$-2,4 \pm 0,7$	4,75

Die Bestimmung des isoelektrischen Punkts der FITC-funktionalisierten Partikel ist in Abbildung 7.24 dargestellt. Der isoelektrische Punkt der FITC-Alendronsäure-beschichteten MnZn-Ferrite liegt bei einem pH-Wert von 4,25 und der von FITC-6-Aminohexansäure-funktionalisierten Partikeln bei 4,75. Somit weisen beide fluoreszenzmarkierten Partikeldispersionen einen isoelektrischen Punkt auf, der unter dem physiologischen pH-Wert des Blutes liegt.

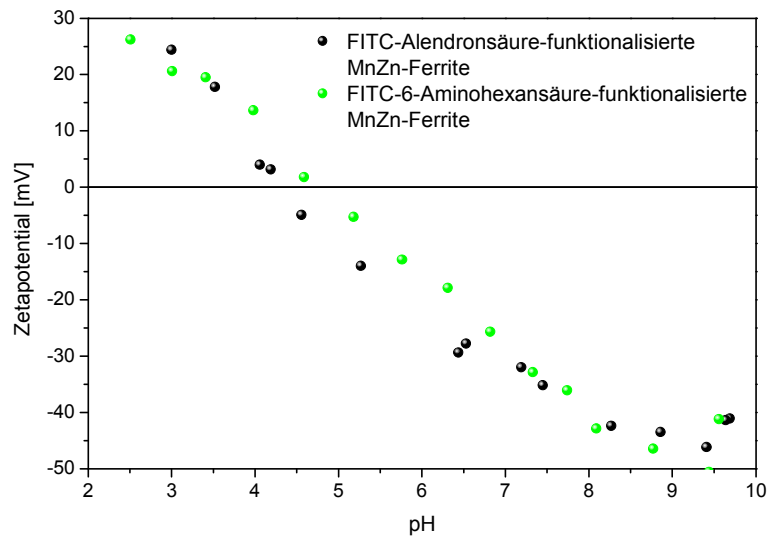


Abbildung 7.24: Bestimmung des isoelektrischen Punkts von FITC-markierten Partikeln. Beide Punkte liegen unter dem pH-Wert, der für medizinische Anwendungen erforderlich ist.

Mittels transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen wird die Morphologie der funktionalisierten Partikel eingehender charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Aufnahmen sind in Abbildung 7.25 und in Abbildung 7.26 visualisiert. Die in Abbildung 7.25 dargestellten TEM-Aufnahmen zeigen FITC-Alendronsäure-funktionalisierte Partikel. Diese funktionalisierten Partikel weisen eine relative monodisperse Größenverteilung mit einem geringen Aggregationsgrad auf.

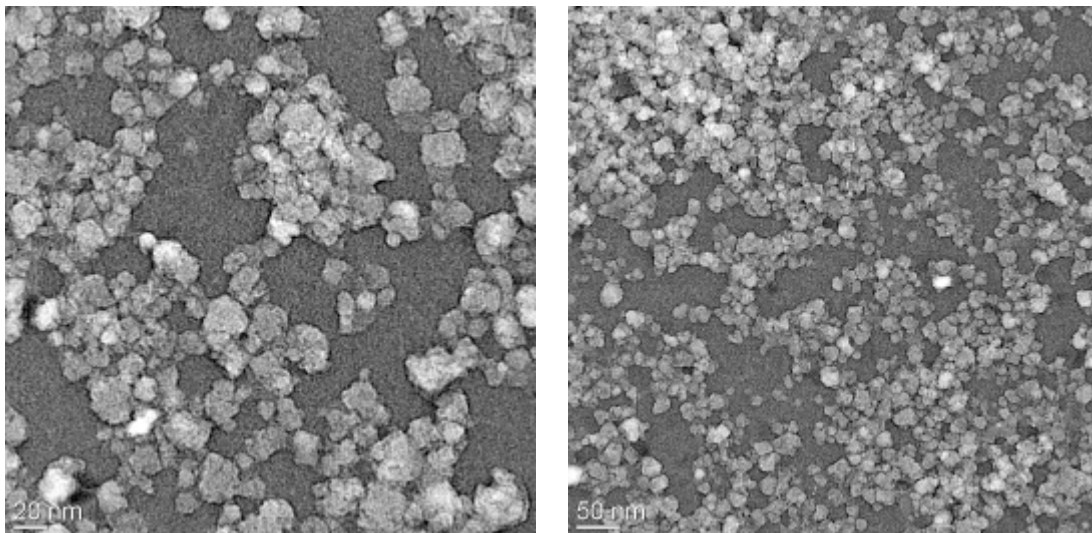


Abbildung 7.25: TEM-Aufnahmen von FITC-funktionalisierten Partikeln, die mit Alendronsäure beschichtet sind. Die funktionalisierten Partikel liegen relativ monodispers vor.

Abbildung 7.26 zeigt FITC-funktionalisierte Partikel, die mit 6-Aminohexansäure beschichtet sind. Anhand dieser Aufnahmen ist, im Vergleich zu den vorher gezeigten TEM-Aufnahmen

in Abbildung 7.25, ein leicht erhöhter Aggregationsgrad festzustellen, der sich aber auch bei den Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung abzeichnete.

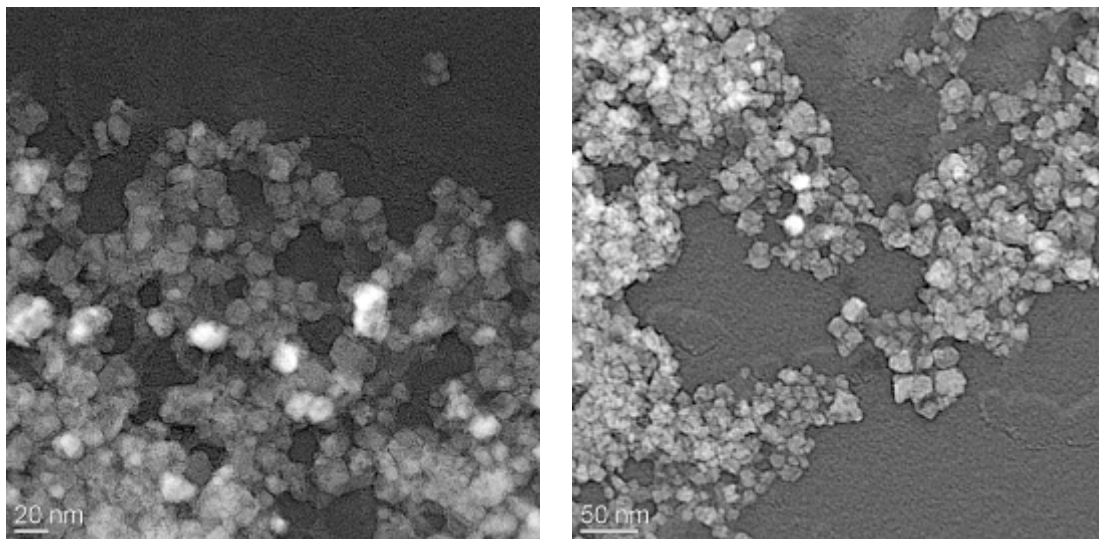


Abbildung 7.26: TEM-Aufnahmen von FITC-6-Aminohexansäure-funktionalisierten Partikeln weisen einen relativ enge Größenverteilung auf, aber einen leicht erhöhten Aggregationsgrad.

Die anschließenden FCS-Messungen sind in Abbildung 7.27 graphisch dargestellt. Die Diffusionszeit der mit FITC-Alendronsäure beschichteten Partikel beträgt $436 \mu\text{s}$ (Größe $30,36 \text{ \AA}$) und der FITC-6-Aminohexansäure-funktionalisierten Partikel $414 \mu\text{s}$ (Größe $28,82 \text{ \AA}$). Die Kontrolle von reinem FITC ergibt eine Diffusionszeit von $225 \mu\text{s}$ (Größe $15,66 \text{ \AA}$). Wie zu erkennen ist, weichen die Diffusionszeiten und die ermittelte Größe nicht signifikant von der Diffusionszeit von FITC ab. Eine detaillierte Beschreibung der auftretenden Effekte ist in Kapiteln 4.3.3 und 6.2.3 wiedergegeben.

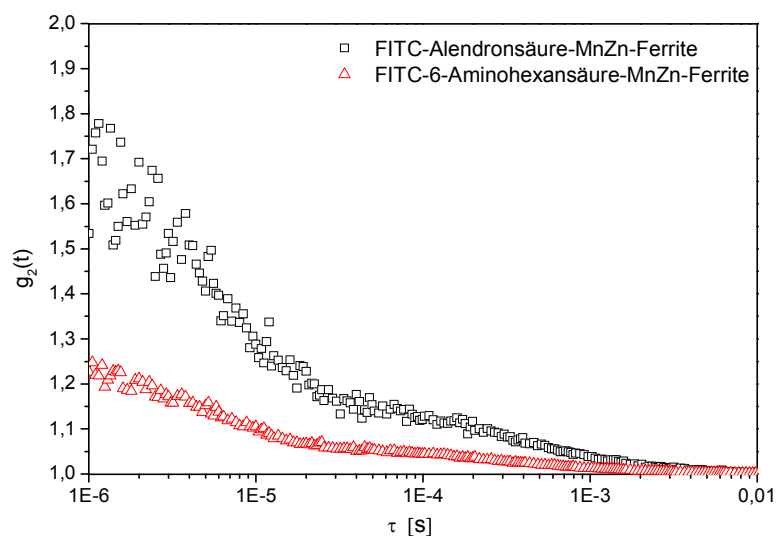


Abbildung 7.27: FCS-Messergebnisse der FITC-funktionalisierten Partikel. Beide Fluoreszenz-markierten Nanopartikel weisen ähnliche Diffusionszeiten auf.

7.2.2 FUNKTIONALISIERUNG VON BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN MIT DAPI

Der zweite Fluoreszenzmarker, der näher betrachtet werden soll, ist 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI). In wässriger Lösung liegt das Extinktionsmaximum bei 350 nm und das Emissionsmaximum bei 458 nm. Hingegen ändern sich die Maxima wenn DAPI zum Beispiel an der DNA gebunden vorliegt. In diesem Fall liegt die maximale Extinktion bei 358 nm und die maximale Emission bei 461 nm.^[180] Ein Vorteil von DAPI ist die Möglichkeit, gleichzeitig andere Fluoreszenzfarbstoffe an dasselbe Präparat zu binden, ohne dabei eine Überschneidung der Maxima zu erhalten.

Die funktionellen Gruppen, die die Anbindung von DAPI an beschichtete Partikel ermöglicht, sind die primären Amino-Gruppen. Dementsprechend eignen sich vor allem die DPDC-beschichteten Partikel für die Funktionalisierung mit DAPI. In Abbildung 7.28 ist die Anbindungsreaktion von DAPI an DPDC-beschichtete MnZn-Ferrite in Gegenwart von EDC und NHS schematisch wiedergegeben. Durch die Reaktion der primären Amino-Gruppe mit der Carboxyl-Gruppe von DPDC entsteht eine Säure-Amid-Bindung. Die Konzentration der DAPI-markierten Partikeldispersionen liegt bei $27 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ und der pH-Wert bei 6,37.

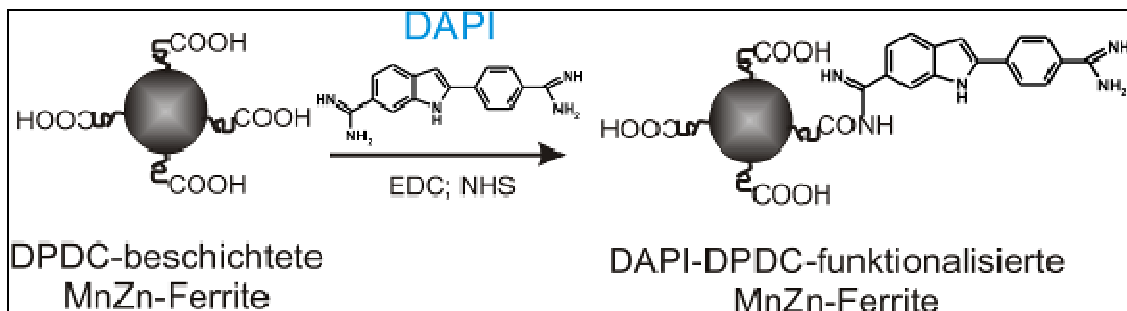


Abbildung 7.28: Schematische Darstellung der Reaktion von DAPI mit DPDC-beschichteten Partikeln in Gegenwart der Kupplungsreagenzien EDC und NHS.

Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung sind in Abbildung 7.29 dargestellt. Dabei beläuft sich der hydrodynamische Durchmesser DAPI-markierter Partikel auf 145 nm bei einer Polydispersität von 1,61. Durch Vergleich mit den DLS-Ergebnissen von DPDC-beschichteten Partikeln ($D_{hydro}=166 \text{ nm}$) fällt auf, dass der Durchmesser von DAPI-markierten Partikeln gesunken ist. Eine Erklärung dafür ist die Zunahme der Ladungsdichte, die auf Grund der Anbindung von DAPI an DPDC entsteht. Anhand des FT-IR-Spektrums (siehe Abbildung 7.30) wird deutlich, dass die Carboxyl-Gruppen deprotoniert vorliegen. Dadurch erhöht sich die Ladungsdichte und die Gruppen nehmen den maximalen Abstand ein. Durch diesen maximalen Abstand nimmt die Größe der Solvathülle zu und der hydrodynamische Durchmesser steigt. Bindet DAPI an diese Gruppen, ändert sich die Ladungsdichte und der maximale Abstand der freien Carboxyl-Gruppen. Demzufolge

nimmt die Größe der Solvathülle ab und der hydrodynamische Durchmesser sinkt. Des Weiteren liegen die primären und sekundären Amino-Gruppen von DAPI protoniert vor, d. h. DAPI selbst weist eine hohe Ladungsdichte auf, wodurch die Ladungen der Carboxyl-Gruppen kompensiert werden. Dies hat ebenfalls einen Einfluss auf die Ladungsdichte und damit auf den Durchmesser der Partikel.

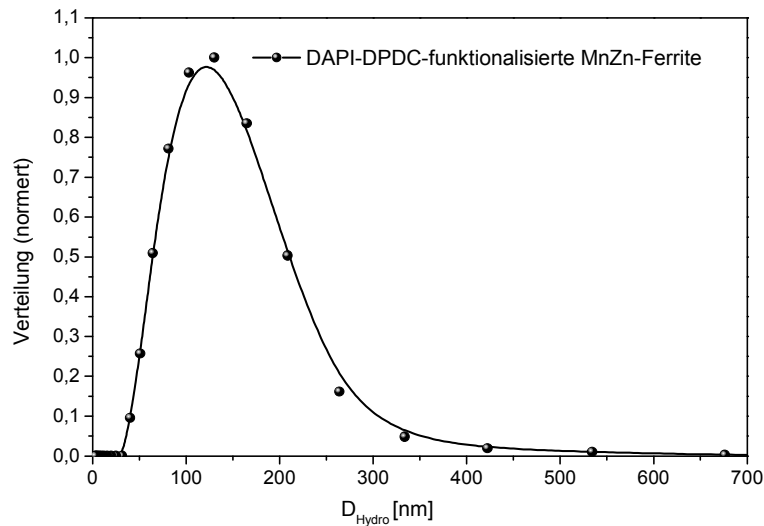


Abbildung 7.29: Darstellung einer Größenverteilungskurve von DAPI-markierten Partikeln. Der hydrodynamische Durchmesser liegt bei 145 nm und die Polydispersität bei 1,61.

Abbildung 7.30 fasst die Ergebnisse der FT-IR-spektroskopischen Analyse der DAPI-markierten Partikel zusammen. Der Vergleich des Spektrums von DAPI-markierten Partikeln mit dem von DPDC-beschichteten Partikeln zeigt die erfolgreiche Anbindung von DAPI an DPDC. Die Absorptionsbanden bei 2635 cm^{-1} , 2470 cm^{-1} und 2120 cm^{-1} deuten auf Valenzschwingungen hin, die durch protonierte primäre und sekundäre Amine sowie durch protonierte Imine hervorgerufen werden. Auf Grund der Tatsache, dass sowohl primäre und sekundäre Amino-Gruppen als auch Säure-Amid-Bindungen vorhanden sind, stellen manche Banden eine Kombination der Schwingungen dieser Gruppen dar. So liegen die asymmetrische und symmetrische N-H Deformationsschwingungen der primären Amino-Gruppe bei 1650 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} . Die N-H Deformationsschwingung hat nur ein Signal, welches bei 1650 cm^{-1} liegt. In diesem Bereich sind aber auch die N-H Deformationsschwingung und die C-N Valenzschwingung der Säure-Amid-Bindung. Die Schulter des intensiven Peaks bei 1650 cm^{-1} resultiert aus der C=O Valenzschwingung der Säure-Amid-Bindung. Ebenfalls in dem Spektrum vertreten sind die Schwingungen der Fe-O-P Bindung, die bei 1060 cm^{-1} liegen und die der P-C Bindung bei 1000 cm^{-1} . Es kann also von einer erfolgreichen Anbindung von DAPI an die Carboxyl-Gruppe von DPDC ausgegangen werden. Auf Grund der Tatsache, dass die Fe-O-P Schwingung im Spektrum

weiterhin nachgewiesen wird, kann die Adsorption von DPDC an Partikel angenommen werden.

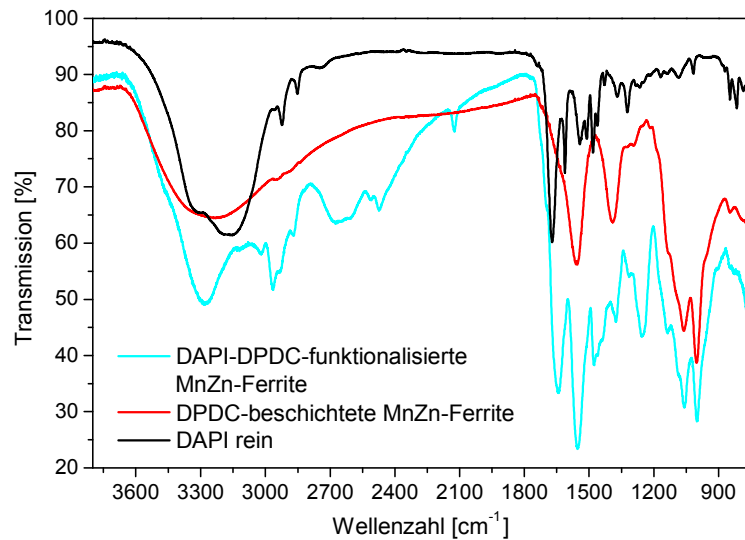


Abbildung 7.30: FT-IR-Spektrum von DAPI-DPDC-funktionalisierten Partikeln. Aus dem Spektrum geht die erfolgreiche Markierung mittels DAPI vor. Als Vergleich dienen die Spektren von DPDC-beschichteten Partikeln und DAPI.

Bei denen in Abbildung 7.31 dargestellten Spektren handelt es sich um UV / Vis-Analysen der DAPI-markierten Partikel. Das Extinktionsmaximum von gebundenem DAPI liegt bei 365 nm. Die Konzentration an DAPI wird anhand des Dialysewassers bestimmt und anschließend von der eingesetzten Konzentration ($2,855 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) abgezogen. Hierbei ergibt sich eine Konzentration an DAPI, welches an die DPDC-beschichteten Partikel gebunden ist, von $2,070 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$.

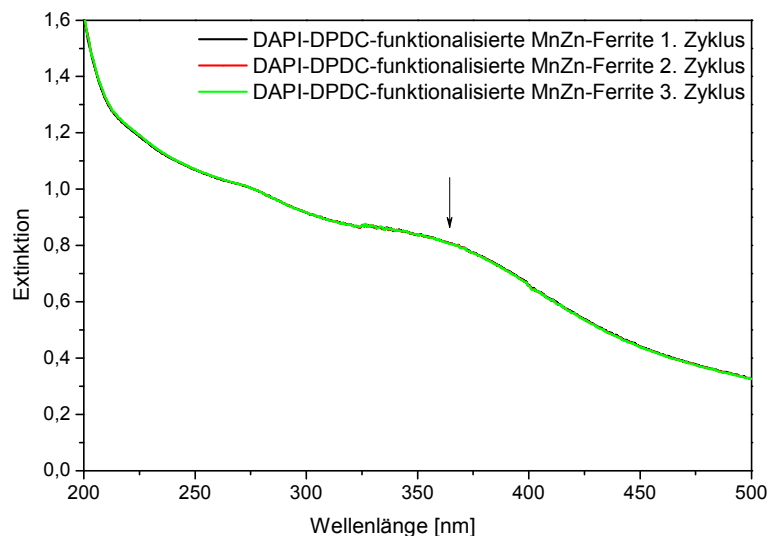


Abbildung 7.31: UV / Vis-Spektren von DAPI-markierten MnZn-Ferriten, die mit DPDC-beschichtet sind, zeigen die Extinktion von DAPI bei 365 nm (siehe Pfeil).

Die Stabilität der Partikel wird mit Hilfe von drei automatisch aufeinander folgenden Messungen untersucht. Es kann von einer optimal dispergierten und stabilen Suspension ausgegangen werden, da die nacheinander aufgenommenen Kurven nicht voneinander abweichen.

Die Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Analyse von DAPI-markierten Partikeln sind in Abbildung 7.32 dargestellt. Ein Anregungsspektrum von DAPI-funktionalisierten MnZn-Ferriten liegt bei 360 nm und ein Emissionsmaximum bei 458 nm.

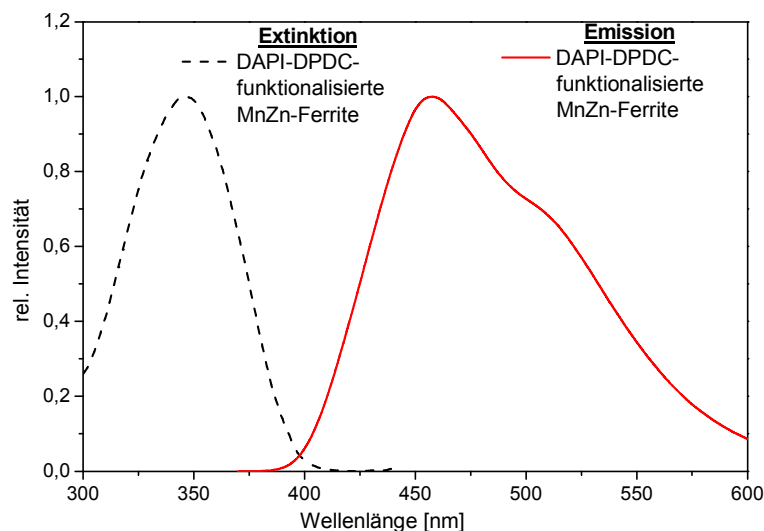


Abbildung 7.32: Extinktions- und Emissions-Spektrum von DAPI-DPDC-markierten MnZn-Ferriten.

Die Spektren weisen die charakteristischen Maxima ($\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 360 \text{ nm} / 458 \text{ nm}$) von DAPI auf.

Die Bestimmung des Zetapotentials von DAPI-markierten Partikeln liefert ein Potential von $-34,6 \text{ mV} \pm 1,8 \text{ mV}$. Hingegen weisen die DPDC-beschichteten Partikel ein Zetapotential von $-41,0 \text{ mV} \pm 0,3 \text{ mV}$ auf. Die Änderung des Potentials nach der Funktionalisierung mit dem Fluoreszenzmarker kann dadurch erklärt werden, dass die vorhandene negative Ladungsdichte durch die Bindung von DAPI an die deprotonierten Carboxyl-Gruppen verringert wird. Zusätzlich üben die protonierten Amino-Gruppen des Fluoreszenzfarbstoffs einen Einfluss auf die negative Oberflächenladung aus, wodurch das Zetapotential ebenfalls verändert wird.

Die Bestimmung des isoelektrischen Punkts der modifizierten Partikel, die graphisch in Abbildung 7.33 wiedergegeben ist, zeigt einen Wechsel der Oberflächenladung bei einem pH-Wert von 3,06. Dieser niedrige pH-Wert kann auf die vorhandenen Carboxyl-Gruppen zurückgeführt werden.

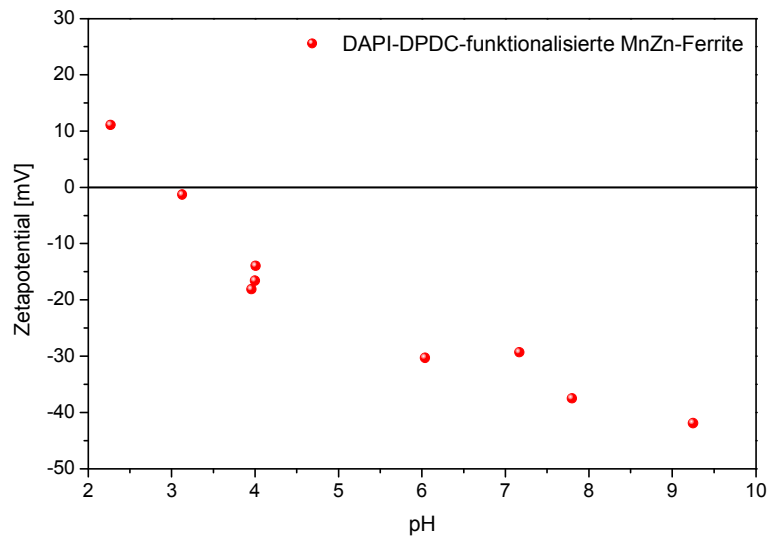


Abbildung 7.33: Bestimmung des isoelektrischen Punkts von DAPI-markierten Partikeln. Der Punkt liegt bei 3,06 und somit unter dem physiologischen pH-Wert, der für medizinische Anwendungen erforderlich sind.

Die Struktur sowie die Beschaffenheit von DAPI-DPDC-funktionalisierten MnZn-Ferriten werden mittels TEM charakterisiert. Entsprechende Aufnahmen sind in Abbildung 7.34 dargestellt und zeigen eine relativ enge Größenverteilung. Allerdings weisen die modifizierten Partikel einen erhöhten Aggregationsgrad auf, der sich anhand der Werte für die Polydispersität voraussagen ließ. Der Aggregationsgrad ist erhöht, aber die Stabilität der Partikelsuspension hat sich nicht geändert.

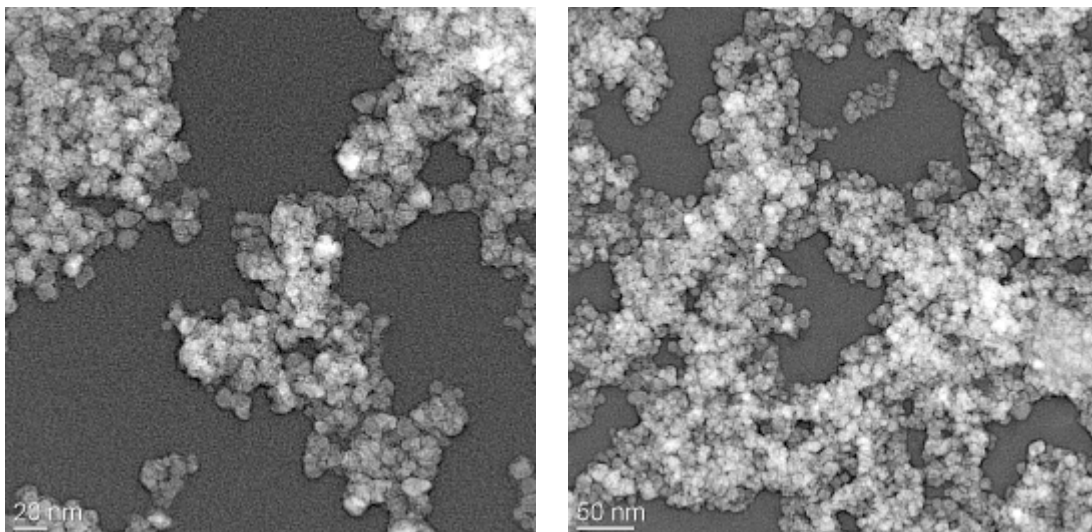


Abbildung 7.34: TEM-Aufnahmen von DAPI-DPDC-modifizierten MnZn-Ferriten weisen einen relativ engen Größenverteilung auf.

7.2.3 KAPITELZUSAMMENFASSUNG

In Kapitel 7.2 wird die Fluoreszenzmarkierung von beschichteten Nanopartikeln dargestellt. Dies wird erfolgreich mit den Fluoreszenzmarkern FITC und DAPI umgesetzt. Die angewandten Synthesen liefern sowohl sehr gute als auch reproduzierbare Ergebnisse.

So zeigt zum Beispiel die Charakterisierung der Partikel mittels DLS, dass der hydrodynamische Durchmesser von Alendronsäure- und 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikeln nach der Funktionalisierung mit FITC angestiegen ist. Hingegen verkleinert sich der hydrodynamische Durchmesser von DAPI-DPDC-funktionalisierten MnZn-Ferriten. Eine mögliche Ursache kann in der unterschiedlich vorliegenden Ladungsdichte liegen, die einen Einfluss auf die Größe der Solvathülle der Nanopartikel hat. So weisen die DPDC-beschichteten Partikel auf Grund der beiden deprotonierten Carboxyl-Gruppen vor der Funktionalisierung eine höhere Ladungsdichte auf, als die mit Alendronsäure oder 6-Aminohexansäure beschichteten Partikel. Nach der Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs an DPDC-beschichtete MnZn-Ferrite ändert sich die Ladungsdichte und das Ausmaß der Solvathülle nimmt ab. Durch die Änderung der Solvathüllegöße verkleinert sich auch der hydrodynamische Durchmesser der Partikel.

Die Funktionalisierung der Partikel wird ebenfalls durch die Änderung des Zetapotentials nachgewiesen. Bei allen gemessenen Potentialen ist eine Abnahme der Oberflächenladung der Partikel nach der Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff zu verzeichnen. So ändert sich das Zetapotential von DPDC-beschichteten Partikeln von -41,0 mV vor der Funktionalisierung auf -34,6 mV nach der DAPI-Funktionalisierung. Dieser Trend setzt sich auch bei den FITC-markierten Nanopartikeln fort. Hier ändert sich das Zetapotential der Alendronsäure-beschichteten Partikel von -32,6 mV auf -29,4 mV und das Potential der 6-Aminohexansäure-beschichteten Partikel von -25,3 mV auf -2,4 mV. Eine Messung des isoelektrischen Punktes ergibt für alle Messungen einen pH-Wert, der unter dem Wert liegt, der für medizinische Anwendungen relevant ist. Die DAPI-DPDC-modifizierten MnZn-Ferrite weisen hierbei einen pH-Wert von 3,06 auf. Der pH-Wert von FITC-6-Aminohexansäure-funktionalisierten Partikeln liegt mit 4,75 etwas höher als der von FITC-Alendronsäure-beschichteten Partikeln, der bei 4,25 ist.

Weiterhin wird die erfolgreiche Anbindung der Fluoreszenzfarbstoffe an die beschichteten Nanopartikel in allen aufgenommenen FT-IR-Spektren nachgewiesen. Es werden sowohl die Absorptionsbanden der Farbstoffe und der Oberflächenbeschichtung der Partikel, als auch die charakteristischen Banden der neu entstandenen Bindungen identifiziert. Die anschließenden UV / Vis- und Fluoreszenz-Analysen zeigen die charakteristischen Extinktions- und Emissionsmaxima der entsprechenden Fluoreszenzmarker. Anhand von UV / Vis-Messungen wird mit Hilfe von nacheinander aufgenommenen Spektren die Stabilität

der Partikelsuspensionen aufgezeigt. Die Wartezeit zwischen jeder neuen Messung derselben Partikelsuspension beträgt eine Stunde.

Die Bestimmung der Diffusionszeit mittels FCS ergibt für die mit FITC-Alendronsäure-beschichteten MNP einen Wert von $436 \mu\text{s}$ und für die mit FITC-6-Aminohexansäure funktionalisierten Partikel einen Wert von $414 \mu\text{s}$. Beide Zeiten unterscheiden sich kaum, wodurch keine eindeutige Aussage über die Bindungsstärke getroffen werden kann. Die Diffusionszeiten von FITC-markierten Partikeln sind um das zweifache langsamer als die von ungebundenem FITC ($225 \mu\text{s}$). Allerdings müsste die erwartete Diffusionszeit von gebundenem FITC um das 10-fache größer. Auf Grund der Reinigungsschritte kann davon ausgegangen werden, dass kein ungebundenes FITC mehr in Lösung ist. Somit handelt es sich bei den gemessenen Diffusionszeiten, um FITC, welches gebunden an das entsprechende Beschichtungsmaterial vorliegt (siehe Kapitel 4.3.3 und 6.2.3). Eine Bestimmung der Diffusionszeit mittels FCS ist von DAPI-funktionalisierten Partikeln nicht möglich, da kein geeigneter Bandpassfilter vorhanden ist. Allerdings wird anhand der FT-IR-Spektren die Fe-O-P Bindung eindeutig nachgewiesen und basierend auf diesen Messergebnissen kann von einer erfolgreichen Bindung von DPDC auf die Nanopartikeloberfläche ausgegangen werden.

8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese und Charakterisierung von verschiedenen Drug-Delivery Systemen. Dies kann mit Hilfe von diversen Verfahren erfolgreich umgesetzt werden. Als Transportsysteme für die Wirkstoffe werden Ferrofluide der Zusammensetzung $Mn_{0,8}Zn_{0,2}Fe_2O_4$ eingesetzt. Diese magnetischen Nanopartikel werden durch Fällung der korrespondierenden Metallchloride in Natronlauge hergestellt. Die anschließende Protonierung der Partikeloberfläche erfolgt mit Nitrat-Ionen. Für die Oberflächenstabilisierung der Partikel werden jedoch Citrat-Ionen verwendet, um ein Ferrofluid zu erhalten, welches bei einem pH-Wert von 7 stabil ist.

Ausgehend von Citrat-stabilisierten Ferrofluiden werden verschiedene Oberflächenbeschichtungen durchgeführt. Für die Beschichtung der magnetischen Nanopartikel wird zuerst ein Biopolysaccharid, das Dextran verwendet. Bevor allerdings Dextran zur Oberflächenbeschichtung herangezogen werden kann, muss durch Einführung bestimmter funktioneller Gruppen die Möglichkeit geboten werden, den Wirkstoff kovalent an das modifizierte Dextran und damit auch an die Partikel binden zu können. Aus diesem Grund wird Dextran durch Einführung diverser funktioneller Gruppen aktiviert. So werden beispielsweise mit PAD und CMD Dextran-Derivate synthetisiert, welche die Anbindung eines Wirkstoffs über eine primäre Amino-Gruppe ermöglichen. Allerdings existieren auch Wirkstoffe oder Biomoleküle, die über keine freien Amino-Gruppen verfügen. Um diese Stoffe ebenfalls an Dextran binden zu können, wird, ausgehend vom CMD, eine primäre Amino-Gruppe mittels Ethylendiamin bzw. Hydrazin eingeführt. So können Wirkstoffe bzw. Biomoleküle mit vorhandener Keto- oder Carboxyl-Gruppen an diese Dextran-Derivate anbinden. Alle dargestellten Dextran-Derivate können mit Hilfe der in Kapitel 4.2 beschriebenen Synthesen reproduzierbar hergestellt werden. Nach der erfolgten Synthese der Dextran-Derivate werden diese zur Beschichtung der MnZn-Ferrofluide verwendet.

Da es für medizinische Anwendungen notwendig ist, stabile Partikelsuspensionen zu verwenden, werden diverse Langzeitstabilitätsuntersuchungen von MnZn-Ferrofluiden und CMD-beschichteten MnZn-MNP durchgeführt. Die Stabilität von Ferrofluid-Suspensionen wird vor allem vom Agglomerationsverhalten der Partikel bestimmt, d. h. je größer die Agglomeratenbildung ist, desto instabiler wird die Partikelsuspension. Das Entstehen und Wachstum solcher Agglomerate kann mit Hilfe der DLS analysiert werden. Für diesen Zweck werden MnZn-MNP und CMD-MnZn-MNP derselben Herstellungs-Charge über einen Zeitraum von 6 Monaten mittels DLS überprüft. Dabei stellt sich heraus, dass die Stabilität der Partikelsuspension über 3 Monate hinweg gewährleistet werden kann. Die Ursache für die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers der CMD-beschichteten MnZn-MNP liegt an dem Biopolymer selbst. Dieses wird im wässrigen Medium nach einer längeren Zeit

abgebaut, wodurch die stabile Struktur verloren geht. Dieser Abbau geschieht auf Kosten der Partikelsuspensionsstabilität, wodurch verstärkt Agglomerate gebildet werden. Deshalb soll nach Ablauf von 3 Monaten die CMD-beschichteten MnZn-MNP neu synthetisiert werden, um den Aggregationsgrad so gering wie möglich zu halten und die damit verbundene Emboliegefahr im Körper, hervorgerufen durch eine mögliche Agglomeratenbildung der Partikel.

Nach erfolgreicher Beschichtung der MnZn-MNP mit den hergestellten Dextran-Derivaten und einer nachgewiesenen Suspensionsstabilität über einen Zeitraum von 3 Monaten wird die Anbindung des Wirkstoffs an die beschichteten MnZn-MNP näher betrachtet. Der Wirkstoff, der Wahl für diese Arbeit, ist Doxorubicin. Auf Grund der Autofluoreszenz ist der Einsatz von Doxorubicin in der Forschung weit verbreitet. In der Medizin hingegen wird Doxorubicin vor allem bei Brustkrebspatienten eingesetzt. Die erfolgreiche Anbindung des Doxorubicins an beschichtete MnZn-MNP wird bei allen Dextran-Derivaten realisiert. Dabei erfolgt die Anbindung von Doxorubicin entweder durch die primäre Amino-Gruppe oder durch die vorhandene Keto-Gruppe (vgl. Abbildung 2.8). Als Charakterisierungsmethoden dienen unter anderem FT-IR- und Raman-Spektroskopie, mit deren Hilfe die signifikanten Schwingungen, hervorgerufen durch entstandene Anbindung des Doxorubicins an das entsprechende Dextran-Derivat, nachgewiesen werden können (vgl. Kapitel 4.3). Durch die Anbindung des Doxorubicins an Hy-CMD-beschichtete MnZn-MNP entsteht eine Hydrazon-Bindung. Diese Hydrazon-Bindung ist pH-sensitiv und wird in einem pH-Bereich von 4 bis 5 gespalten. Da in den Endosomen der Zellen ein saurer pH-Wert vorliegt, kann diese Tatsache ausgenutzt werden, um eine Abspaltung des Wirkstoffs in der Zelle zu realisieren. Aus diesem Grund werden verschiedene Versuche durchgeführt, um die Bindungsspaltung der Dox-Hy-CMD-MnZn-MNP zu überprüfen. Schlussfolgernd wird festgestellt, dass die Partikelsuspension bei einem pH-Wert von 7,2 sehr stabil ist und es zu keiner Abspaltung von Doxorubicin innerhalb von 24 Stunden kommt. Die Abspaltung des Doxorubicins von Dox-Hy-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP, die einen pH-Wert von 5,0 aufweist, erfolgt innerhalb von 10 Stunden nach Ansäuern. Zur Konzentrationsbestimmung des abgespaltenen Doxorubicins wird UV / Vis-Spektroskopie eingesetzt. So kann die vollständige Abspaltung von Doxorubicin von den funktionalisierten Partikeln nachgemessen werden.

Das Einsatzgebiet der Doxorubicin-funktionalisierten Partikel stellt die T-Zell-vermittelte Krebstherapie dar. Diese Therapie beruht darauf, dass T-Zellen als biokompatible „Drug-Carrier“ eingesetzt werden. Dabei spielt der natürliche zytotoxische T-Zell-Effekt eine entscheidende Rolle. Der Einsatz des bispezifischen Antikörpers (bsAb) HEA125xOKT3 fördert zusätzlich die Bindung der T-Zellen an die verwendete Brustkrebszelllinie MCF-7. Durch Bindung dieses bispezifischen Antikörpers an die T-Zellen erfolgt die Ausschüttung

der zytotoxischen Granulen in Richtung der Krebszelle und dies wiederum führt zum Zelltod der Krebszelle. Für die Beladung von T-Zellen werden Doxorubicin-PAD- bzw. Dox-CMD-funktionalisierte MnZn-MNP verwendet und mit Hilfe diverser Verfahren näher untersucht.

Die Aufnahme der Doxorubicin-PAD- / -CMD-funktionalisierten MnZn-MNP in T-Zellen wird erfolgreich mit bildgebender Verfahren gezeigt. So zeigen verschiedene TEM-Aufnahmen von fixierten T-Zellen, die mit Doxorubicin-PAD-funktionalisierten MnZn-MNP beladenen sind, die Aufnahme dergleichen in Form von endozytotischen Vesikeln. Im Falle der Dox-CMD-funktionalisierten MnZn-MNP erfolgt die Aufnahme wahrscheinlich ebenfalls über die Endozytose, allerdings liegen die funktionalisierten Partikel ohne erkennbare Struktur im Zellcytosol vor. Die Überlebensrate der Doxorubicin-beladenen T-Zellen wird mit MTT-Assays analysiert. Diese zeigen, dass nach 24 Stunden ca. 50 % der mit Dox-CMD-MnZn-MNP inkubierten T-Zellen, überleben. Somit ergibt sich ein Zeitfenster von 24 Stunden, in dem die beladenen T-Zellen ihren Wirkungsort erreicht haben müssen. Mit Hilfe von SRB-Assay wird im Anschluss die Überlebensrate von MCF-7-Zellen untersucht. Die T-Zellen, inkubiert mit Dox-CMD-funktionalisierten Nanopartikeln, senkten die Überlebensrate der Krebszellen erheblich. Nach 48 Stunden sind bereits 93 % der MCF-7-Zellen abgestorben. Anhand dieser Ergebnisse kann von einer guten chemotherapeutischen Wirkung der Partikel ausgegangen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass Doxorubicin-funktionalisierte MnZn-MNP ein großes Potential für die zukünftige Behandlung von Krebs aufweisen. Jedoch müssen noch Versuche zur Optimierung der funktionalisierten Partikel durchgeführt werden, um die Monodispersität der magnetischen Nanopartikel zu verbessern. Des Weiteren muss die Überlebensrate der T-Zellen gesteigert werden, damit diese auch über einen längeren Zeitraum hinweg die Krebszellen bekämpfen können, ohne vorher die zytotoxische Wirkung des Doxorubicins zu verlieren. Durch Steigerung der Überlebensrate besteht die Möglichkeit, die Wirkstoffdosis und unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren. Des Weiteren müssen diverse Assays mit den Dox-Hy- bzw. -Ed-CMD-funktionalisierte MnZn-MNP durchgeführt werden, um einerseits deren Einfluss auf die Überlebensrate der T-Zellen festzustellen und um andererseits die Mortalität der MCF-7-Zellen zu überprüfen.

Um die kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs aus den T-Zellen weiter zu verbessern, können die ferromagnetischen Eigenschaften der MnZn-MNP genutzt werden. Die Nanopartikel können mittels eines Magnetens an einem bestimmten Ort im Körper fixiert werden und durch Hochfrequenzfelder (HF) erwärmt werden. Der dadurch ausgelöste Hyperthermie-Effekt kann die Wirkung des Chemotherapeutikums erhöhen und so die Effizienz der medikamentösen Behandlung verbessern. Zusätzlich können dadurch

Nebenwirkungen weiter reduziert werden. Die ersten Versuche zu einer kontrollierten Freisetzung des Wirkstoffs mittels HF sind bereits im Gange.

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Effektivität von beladenen T-Zellen stellt die Verkapselung von Doxorubicin-funktionalisierten Partikeln dar. Hierbei soll das Verkapselungsmaterial so gewählt sein, dass die Abgabe des Wirkstoffs kontinuierlich über einen längeren Zeitraum hin erfolgt. Dazu liefert das LbL-Verfahren einen gute Ansatzmöglichkeit.

Die Layer-by-Layer-Technik wird zum Aufbau eines Multischichtsystems auf der Partikeloberfläche angewandt. Zum Einsatz kommen ausgewählte Polymere wie Polycarbonsäure, Poly(4-Styrolsulfonsäure-co-Maleinsäure), Polyethylenimin und Polyallylamin. Die maximale Schichtanzahl beläuft sich in den ersten Versuchen auf 6. Hierbei kristallisiert sich das Multischichtsystem, bestehend aus PAH und PAA, als optimales Drug-Delivery System heraus. Des Weiteren bieten PAH und PAA den Vorteil, im sauren pH-Bereich abgebaut zu werden, wodurch eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs appliziert werden kann. Ein weiteres Schichtsystem, bestehend aus PEI und PSSa-co-MA, wird auf Grund des Protonenschwamm-Effekts von PEI als Drug-Delivery System ausgewählt. Mittels des LbL-Verfahrens ist somit möglich ein Multischichtsystem, bestehend aus 6 Schichten diverser Polymere auf die Partikeloberfläche zu adsorbieren. Dieses Verfahren stellt einen reproduzierbaren Syntheseprozess dar, der es erlaubt, durch Änderung von Polymeren deren Eigenschaften so zu nutzen, dass verschiedene Drug-Delivery Systeme hergestellt werden können. Durch die Möglichkeit, die äußere Schicht und damit die funktionellen Gruppen zu variieren, können diverse Wirkstoffe oder Biomoleküle in das gleiche Multischichtsystem eingebaut werden. Anschließend wird die Anbindung von Doxorubicin an die beiden vielversprechendsten Multischichtsysteme charakterisiert. Hierbei kann auf Grundlage der eingesetzten Analysemethoden die erfolgreiche Anbindung des Doxorubicins an die verschiedenen Schichten sowie Polymere nachgewiesen werden. Bei den verwendeten Synthesen zur Doxorubicin-Funktionalisierung der Multischichtsysteme auf Partikeloberflächen handelt es sich ausnahmslos um reproduzierbare Prozesse. Die funktionalisierten Partikelsuspensionen zeigen bei einem pH-Wert von um die 6,5 eine sehr gute Stabilität auf und neigen kaum zur Bildung von Agglomeraten. Somit sind die ersten Versuche abgeschlossen und die Drug-Delivery Systeme können in die zweite Phase übergehen, d. h. die Überprüfung der Aufnahme und Wirkungsweise der Partikel auf T-Zellen und nicht zuletzt auf Krebszellen. Weiterführende Versuche richten sich somit nach den Ergebnissen der Zelltests.

Eine Ansatzmöglichkeit ist hierbei der Einbau von Wirkstoffen in die einzelnen Schichten. Als Schichtmaterial bietet sich in dem Fall die Polymere PAH und PAA an. Durch die funktionellen Gruppen, die das Doxorubicin aufweist, und die zusätzlich vorhandene

Autofluoreszenz, kann dieser Wirkstoff auch weiterhin verwendet werden. Alternativ könnten auch zwei Wirkstoffe, Biomoleküle oder Antikörper in die Schichten mit eingebaut werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, Fluoreszenzfarbstoffe zusammen mit nicht fluoreszierenden Wirkstoffen in die Schichten einzubauen. So kann die Aufnahme der funktionalisierten Partikel mittels Fluoreszenz-Mikroskopie weiterhin charakterisiert werden. Die LbL-Technik liefert auf diese Weise eine Reihe von Möglichkeiten, unterschiedliche Drug-Delivery Systeme herzustellen. Weiterhin soll der Protonenschwamm-Effekt, der durch die hohe Ladungsdichte von PEI in den Zellen hervorgerufen wird, näher untersucht werden. Dazu können die Doxorubicin-funktionalisierten MnZn-MNP mit dem Polymer PEI verkapselt werden, um anschließend den Effekt auf Krebszellen zu untersuchen. Durch die Kombination aus LbL-Technik, magnetischen Nanopartikeln und Immunzellen entsteht eine neue Art von Drug-Delivery Systemen. Diese Systeme weisen gleichzeitig, durch die T-Zellen, eine hohe Affinität zu Krebszellen auf und implizieren durch die Verkapselung mit den entsprechenden Polymeren eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung. Dadurch kann die Dosis, bei gleichbleibender zytotoxischer Wirkung, verringert und die Nebeneffekte minimiert werden. Der Ferromagnetismus der Nanopartikel kann zusätzlich genutzt werden, um eine magnetisch gesteuerte Wirkstoffpositionierung von in Immunzellen befindlichen funktionalisierten Nanopartikeln an Krebszellen oder Tumoren zu erzielen.

Eine andere Ansatzmöglichkeit stellen die Partikel dar, die mit ausgewählten Bisphosphonaten und synthetischen Aminosäuren beschichtet werden. Als Bisphosphonate kommen Alendronsäure und 1,1 Diphosphonatpropan-2,3-Dicarbonsäure zum Einsatz und bei den synthetisch hergestellten Aminosäuren wird 6-Aminohexansäure verwendet. Die Synthese der beschichteten magnetischen Nanopartikel erfolgt in Gegenwart der entsprechenden Substanz. Dies kann deshalb durchgeführt werden, da die verwendeten Oberflächenbeschichtungsmaterialien im Gegensatz zum Dextran thermisch stabil sind. Die beschichteten Partikel können alle erfolgreich und reproduzierbar hergestellt werden. Allerdings zeigt sich, dass diese synthetisierten Partikel, verglichen mit Dextran-Derivat-beschichteten MnZn-MNP, einen größeren hydrodynamischen Durchmesser und einen erhöhten Aggregationsgrad aufweisen. Eine mögliche Ursache dafür kann die negative Oberflächenladung sein, die die Nanopartikel direkt nach der Fällung im alkalischen Medium aufweisen. Durch die anschließende Stabilisierung mit Säure wird somit die Agglomeratbildung gefördert. Deshalb ist es für weitere Versuche sinnvoll, denselben Syntheseweg einzuschlagen, wie bei Dextran-Derivat-beschichteten MnZn-MNP, d. h. ausgehend von Citrat-stabilisierten MnZn-MNP werden diese mit den entsprechenden Bisphosphonaten oder Aminosäuren beschichtet. Dadurch wird die Stabilität der Suspension verbessert und der Aggregationsgrad verringert. Diese beschichteten Partikel werden im Anschluss erfolgreich mit Fluoreszenzfarbstoffen wie FITC bzw. DAPI markiert. Die

Fluoreszenz-markierten MnZn-Ferrite werden zur Synthese von multifunktionalen magnetischen Nanocarriers verwendet. Dazu werden beispielsweise FITC-markierten Partikel, die mit 6-Aminohexansäure beschichtet sind, zusammen mit einem Wirkstoff (Idarubicin) in einer Polymermatrix verkapselt. Anschließend wird die Aufnahme dieser Polymerpartikel in Krebszellen mit und ohne Einfluss eines äußeren Magnetfeldes in einem definierten Zeitraum untersucht.^[181, 182] Hierbei kann gezeigt werden, dass die zytotoxische Wirkung der verkapselten Partikel auf Krebszellen mit äußerem Magnetfeld erhöht werden können. Diese Transportsysteme stellen somit einen vielversprechenden Ansatz für Drug-Delivery Systeme dar.

Bedingt durch die starke Bindungsaffinität der Bisphosphonate an das Hydroxylapatit in Knochen, liegt das Potential von Bisphosphonat-beschichteten Partikeln vor allem in der Therapie von Knochenkrebs. Alendronsäure wird beispielsweise in der Medizin als Wirkstoff zum Knochenaufbau eingesetzt. Zur näheren Charakterisierung der Bindungsaffinität an die Knochen könnten diese Fluoreszenz-markierten Bisphosphonat-beschichteten MnZn-Ferrite verwendet werden. Anschließend besteht die Möglichkeit, zusätzlich zu den Fluoreszenzmarkern einen Wirkstoff mit an die beschichteten Partikel zu binden. So ist beispielsweise Herceptin (Trastuzumab), ein monoklonaler Antikörper, der bei Knochenkrebs eingesetzt wird, ein möglicher Kandidat. Da dieser keine eigene Fluoreszenz aufweist, wäre eine Charakterisierung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nur durch den Einsatz von FITC oder DAPI denkbar.

Des Weiteren kann durch FCS-Messungen nicht gezeigt, welche der verschiedenen mit Doxorubicin- bzw. FITC-funktionalisierten Beschichtungsmaterialien, seien es Dextran-Derivate, Polyelektrolyten oder Bisphosphonate, stärker an die MnZn-MNP binden. Auf Grund des auftretenden Förster-Resonanzenergietransfers kommt es zur Fluoreszenzlöschung sowohl von Doxorubicin als auch von FITC. Dieser Transfer basiert auf dem geringen Abstand zwischen magnetischen Nanopartikeln (Akzeptor) und Fluoreszenzfarbstoffen (Donor) und tritt vor allem in einem Abstandsbereich zwischen Akzeptor und Donor von 1 nm bis 10 nm auf. Durch diesen Effekt ist es nicht möglich die Fluoreszenz von Doxorubicin bzw. FITC zu detektieren, welches an beschichtete Partikel gebunden vorliegt. Es wird somit die Fluoreszenz gemessen, bei der Doxorubicin an das entsprechende Beschichtungsmaterial, bei dem der Abstand zwischen Doxorubicin bzw. FITC und MnZn-MNP mehr als 10 nm beträgt, gebunden ist. Dieser Abstand kann auf Grund des starken Verdünnungs-Verhältnisses mit dem Suspensionsmedium Wasser entstanden sein. Dadurch tritt eine verstärkte Wechselwirkung zwischen Wasser und Beschichtungsmaterial auf, die zu einer Vergrößerung des selbigen führt. Ebenfalls übt die Temperatur einen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit aus, d. h. je höher die Temperatur ist, desto schneller ist die Diffusion. Es kann somit keine Aussage über die

einzelnen Bindungen zwischen Beschichtungsmaterial und Eisen getroffen werden. Allerdings impliziert das nicht, dass die funktionalisierten Beschichtungsmaterialien nicht an die Partikel gebunden vorliegen. Auf Grund der Reinigungsschritte wird die Anwesenheit von freiem, ungebundenem Wirkstoff bzw. Marker ausgeschlossen. Da die Messungen bei keiner konstanten Temperatur durchgeführt werden und die Probe auf Grund des Lasers und der magnetischen Partikel erhitzt wird, bietet es sich an, die nachfolgenden Messungen in einer thermostatisierten Apparatur durchzuführen.

Es ist noch ein weiter Weg bis Drug-Delivery Systeme in der Krebstherapie zum Einsatz kommen können. Dennoch weisen alle vorgestellten Drug-Delivery Systeme, welche die physiko-chemischen Eigenschaften der magnetischen Nanopartikel mit der therapeutischen Aktivität des Wirkstoffs verbinden, hohe Potentiale auf, die letztendlich für medizinische Anwendungen noch weiter entwickelt und optimiert werden müssen.

9. ANHANG

9.1 APPARATIVER TEIL

9.1.1 RAMAN-SPEKTROMETER

Die Raman-Spektren wurden mit einem Multiramsystem Nummer 4 der Firma Bruker Optics aufgenommen (vgl. Abbildung 9.1). Da die Fluoreszenz, die vor allem bei organischen Substanzen infolge der Anregung im UV - oder sichtbaren Bereich zu beobachten ist, die vergleichsweise schwachen Raman-Bandenintensitäten überdecken würde, wird zur Anregung der Raman-Streustrahlung ein Laser verwendet, der im nahen infraroten Bereich emittiert. Als Anregungslaser dient ein Neodym dotierter Yttrium-Aluminium-Granat Laser (Nd:YAG), der polarisiertes, monochromatisches Licht der Wellenlänge 1064 nm emittiert und eine maximale Ausgangsleistung von bis zu 1000 mW liefert. In Abbildung 9.2 ist der schematische Aufbau des Raman-Spektrometers dargestellt.

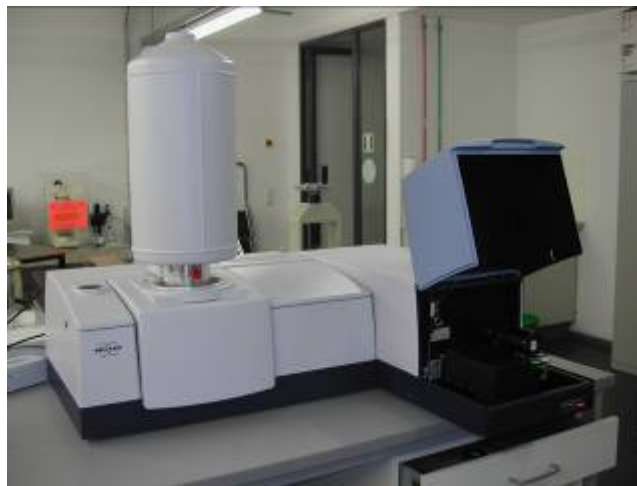


Abbildung 9.1: Bild des Multiramsystems von Bruker Optics mit geöffnetem Probenraumdeckel.

Nachdem der Laserstrahl in den Probenraum gelenkt wird, findet Streuung und gegebenenfalls Transmission statt. Die gestreute Strahlung wird über einen Rayleigh-Filter (dominierende Rayleigh-Streustrahlung und Anti-Stokes werden herausgefiltert) in ein RockSolid[®] Interferometer (Messfrequenz 2,2 kHz bis 50 kHz) gelenkt. Die Detektion der Streustrahlung erfolgt mit Hilfe eines hochempfindlichen Germanium-Detektors (Messbereich 1073,4 nm bis 1755,4 nm), der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird.^[146] Bei der Verwendung eines Nd:YAG-Lasers kann es auf Grund der starken Bestrahlung und Absorption im NIR-Bereich zur Erwärmung der Probe kommen, wodurch die Probe selbst zerstört oder die Messung durch Schwarzkörperstrahlung stark beeinflusst wird. Die Charakterisierung

beschichteter, magnetischer Nanopartikel mittels Raman-Spektroskopie gestalte sich somit sehr schwierig.

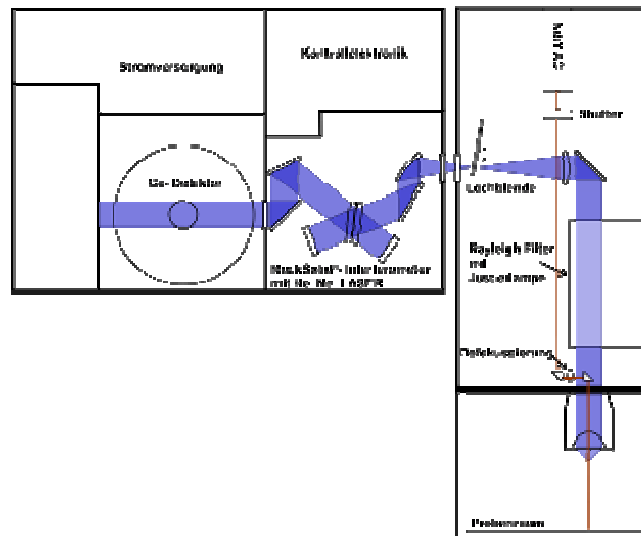


Abbildung 9.2: Schematische Darstellung des Multirams mit dazugehörigem Lichtweg des NIR-Lasers (rote Linie) und des Streulichts (blaue Linie).^[146]

9.1.2 FT-IR-SPEKTROMETER

Die in der Arbeit dargestellten FT-IR-Spektren wurden mit Hilfe eines Spectrum 1000 der Firma Perkin Elmer aufgenommen (siehe Abbildung 9.3). Dazu wird die flüssige Probe auf einer ZnSe-Platte (H-ATR Prisma) im Stickstoffstrom getrocknet. Zur Vermessung der Probe wird ein Infrarotbereich von 3800 cm^{-1} bis 750 cm^{-1} gewählt. Als Strahlenquelle dient eine glühende Wolframwendel, die elektromagnetische Strahlungen im Bereich von 4500 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} emittiert. Der Strahlenverlauf ist in Abbildung 9.3 rechts dargestellt.

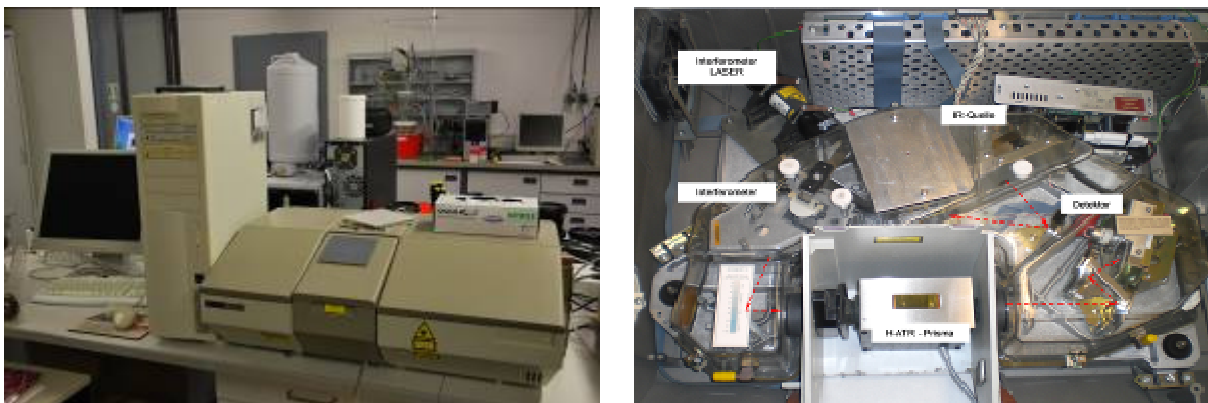


Abbildung 9.3: Bild des verwendeten FT-IR-Spektrometers im geschlossenen (links) und im geöffneten Zustand (rechts), die gestrichelte rote Linie simuliert den Strahlengang.^[146]

Tabelle 9.1: Zusammenfassung der Daten des verwendeten FT-IR-Spektrometers.

Model	Spectrum 1000
Hersteller	Perkin Elmer
Serien Nummer	45778
Software Version	2.15
Detektor	DTGS
Strahlenquelle	MIR (mid-infrared)
Strahlenteiler	KBr
OPD-Geschwindigkeit	0,3 cm·s ⁻¹
Messbereich	4500-400 cm ⁻¹

9.1.3 UV / Vis-SPEKTROMETER

Die ersten UV / Vis-Spektren wurden mit einem UV 500 Visible Spektrometer der Firma Unicam (s. Abbildung 9.4) bei RT aufgenommen. Es handelt sich bei diesem Gerät um ein Zweistrahlphotometer. Als Referenzprobe dient destilliertes Wasser. Bei diesem Zweistrahlgerät wird die Absorption des Lösungsmittels und der Küvette durch eine Referenzprobe herausgemittelt. Als Lichtquelle dienen eine Wolframlampe (Wellenlänge > 325 nm) und eine Deuteriumlampe (Wellenlänge < 325 nm). Die aus der Probe und der Referenz austretenden Lichtstrahlen werden durch einen Photomultiplier verstärkt und detektiert. Bei dem zweiten UV / Vis-Spektrometer handelt es sich um ein Cary 50 UV / Vis der Firma Varian. Im Gegensatz zu dem Spektrometer der Firma Unicam ist dieses Gerät ein Einstrahlphotometer. Das Varian Cary® 50 besitzt eine Xenon-Blitzlampe als Lichtquelle und wird direkt über einen Computer mit der Cary Win UV-Software gesteuert. Ein Vergleich der beiden verwendeten Spektrometer befindet sich in Tabelle 9.2.



Abbildung 9.4: Graphische Darstellung der verwendeten UV / Vis-Spektrometer;
links: UV / Vis-Spektrometer der Firma Unicam, rechts: der Firma Varian.

Tabelle 9.2: Zusammenfassung der Daten von den beiden verwendeten UV / Vis-Spektrometern.

UV / Vis-Spektrometer	Unicam	Varian
Modus	Absorbance	Absorbance
Start λ	200 nm	200 nm
Stopp λ	600 nm	600 nm
Bandbreite	0,5 nm	1,5 nm
Scan-Geschwindigkeit	60-600 nm·min ⁻¹	600 nm·min ⁻¹
Datenintervall	0,5 nm	1,0 nm
Lichtquelle	D ₂ / W-Lampe	Xenon-Blitzlampe
Zyklen	1 bzw. 3	1 bzw. 3
Zeit zw. den jeweiligen Zyklen	3 min	3 min

9.1.4 FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER (FACS) UND FLUORESCENZMIKROSKOP

Bei dem Gerät handelt es sich um den FACS Calibur Durchflusszytometer der Firma BD Biosciences (KIST, siehe Abbildung 9.5 und 9.6). Die Auswertungen werden mit dem dazugehörigen Programm Cell Quest Pro durchgeführt. Im Kanal FL2-H (λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : 585 ± 21 nm) wird die Autofluoreszenz des Doxorubicins gemessen. Die genaue Probenvorbereitung befindet sich im Anhang Kapitel 7.2.1.



Abbildung 9.5: links: Bild des verwendeten Durchflusszytometers der Firma BD Biosciences (KIST); rechts: Bild des Olympus IX 71 Fluoreszenzmikroskops (KIST).

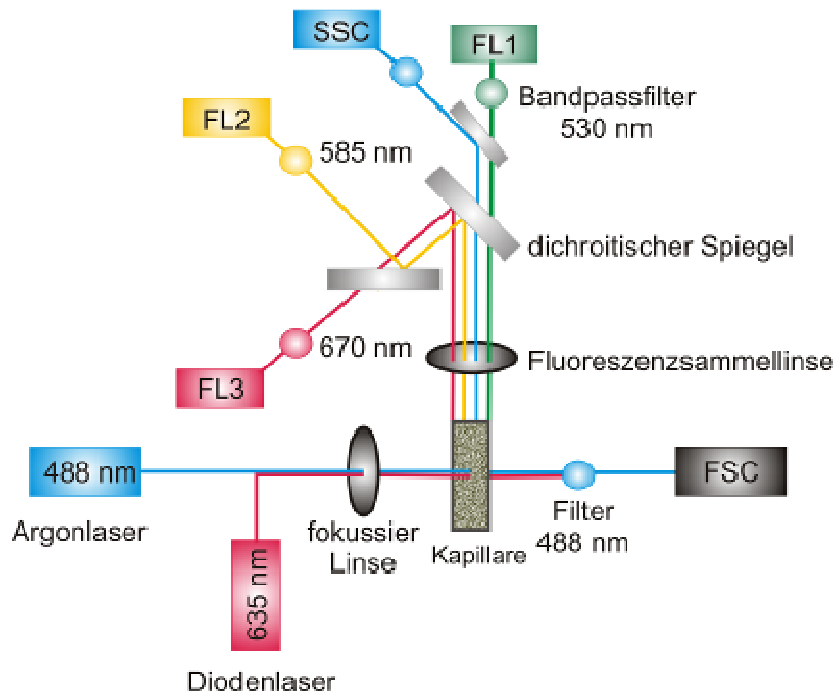


Abbildung 9.6: Schematischer Aufbau des in der Arbeit verwendeten Durchflusszytometers, mit den Detektoren FH1 (grünes Licht), FH2 (gelbes Licht) und FH3 (rotes Licht).
Der Argonlaser dient als Anregungsquelle.

Zur Visualisierung der T-Zellen, inkubiert mit Doxorubicin-funktionalisierten Partikeln, kam das Olympus IX 71 Fluoreszenzmikroskop zum Einsatz (vgl. Abbildung 9.5; rechts). Die Doxorubicin-Autofluoreszenz wird mit einem Filter WG (λ_{ex} : 510 nm-550 nm; λ_{em} : > 590 nm) aufgenommen.

Ein Teil der Fluoreszenzaufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. K. Pachmann am Institut für Innere Medizin II der Friedrich-Schiller-Universität in Jena durchgeführt. Bei diesem Fluoreszenzmikroskop handelte es sich um ein Zeiss Axioplan 2 imaging 100-fach (HB050_{/AC} / HAL100). Die Bilder werden mit einer AxioCam HR_c Kamera aufgenommen und mit dem Programm Axiovision ausgewertet.

9.1.5 FLUORESZENZSPEKTROMETER

Alle Anregungs- und Emissionsspektren wurden mit dem Fluoreszenzspektrometer FP-6500 der Firma Jasco an der Universität des Saarlandes im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Jung vermessen. Folgende Geräteparameter wurden für die Aufnahme der Spektren verwendet, die je nach Detektionsintensität variieren können:

Tabelle 9.3: Tabellarische Darstellung der Geräteparameter.

Auflösung	1 nm
Anregungsbandbreite	3 nm
Emissionsbandbreite	3 nm
Scan-Geschwindigkeit	1000 nm·min ⁻¹
Detektorantwort	0,2 s

9.1.6 FLUORESZENZ-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (FCS)

Die FCS-Messungen wurden mit einer fertigen konfokalen Apparatur im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Jung durchgeführt (siehe Abbildung 9.7). Bei dem Laser (Picarro, Soliton) handelt es sich um einen frequenzverdoppelnden Diodenlaser mit der Emissionswellenlänge von $\lambda = 488$ nm und einem Strahlendurchmesser von 0,7 nm. Des Weiteren besteht der Aufbau aus einem invertierten Mikroskop Axiovert 200 der Firma Zeiss und aus zwei Avalanche-Fotodioden (APD) SPCM-14-AQR der Firma Perkin Elmer Optoelectronics. Die Laser werden direkt in das Mikroskop geleitet und mittels eines dichroitischen Spiegels 495 DRLP von der Firma Omega in ein Wasserimmersionsobjektiv (63 x, NA (numerische Apparatur) 1,2 WI) der Firma Zeiss geführt. Der dichroitische Spiegel reflektiert das Laserlicht (488 nm) und lässt alle Wellenlängen > 495 nm passieren. Das Objektiv fokussiert den Laser in einen beugungslimitierten Punkt oberhalb eines dicken korrigierten Deckglases ($0,17 \pm 0,01$ nm). Die Fluoreszenz wird mit demselben Objektiv gesammelt, durch den dichroitischen Spiegel geleitet und auf eine 50 μ m Lochblende fokussiert. Nachdem das Licht durch einen Bandpassfilter (HQ 525 / 50, AHF Analysetechnik) geleitet wird, splittet ein Teiler den Strahl in zwei gleiche Strahlengänge. Die zwei APDs detektieren die Photonensignale. Die gemessenen Daten werden mittels eines Korrelators (FLEX 02D, Correlator.com) in die Intensitätsautokorrelationsfunktion überführt.

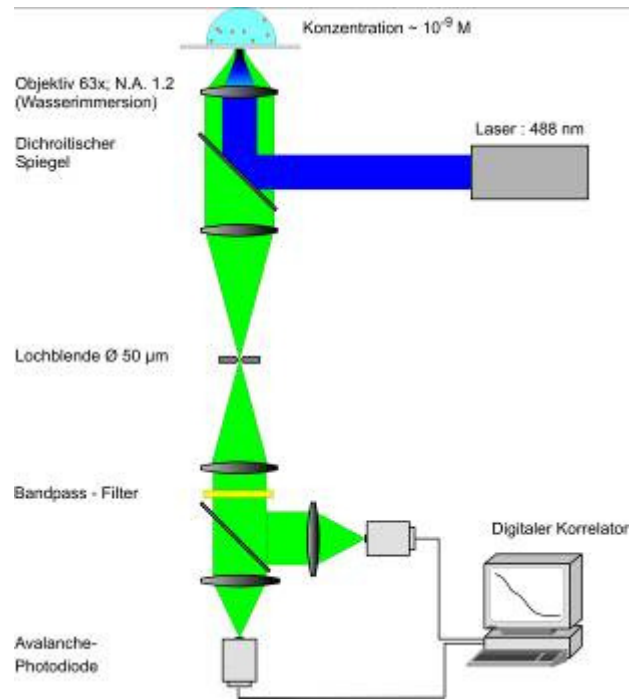


Abbildung 9.7: Schematischer Aufbau des verwendeten Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometers.

9.1.7 DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG (DLS)

Die Lichtstremessungen wurden mit Hilfe eines Goniometersystem ALV-5000E Spektrometers durchgeführt (siehe Abbildung 9.7).

Als monochromatische kohärente Lichtquelle dient ein frequenzverdoppelnder Neodym YAG-Laser ($\lambda = 532 \text{ nm}$) mit einem senkrecht polarisierten Strahl. Ein Teil des Primärstrahls wird mit Hilfe eines halbdurchlässigen Spiegels geteilt und auf eine Photodiode projiziert. Dies detektiert mögliche Intensitätsschwankungen des Lichtstrahls. Der andere Teil des Strahls wird über ein Linsen- und Spiegel-System auf eine Probe mit geeigneter Konzentration geleitet. Diese Probe befindet sich in einer zylindrischen Quarzglas-Küvette.

Um unerwünschte Reflexionen des Lichtstrahls beim Eintritt in die Probe zu vermeiden, ist die Küvette von einem racemischen Gemisch aus *cis-* / *trans*-Decalin umgeben. Dieses Gemisch weist nahezu den identischen Brechungsindex wie die Quarz-Küvette auf und dient ebenfalls zur Temperierung. Die Temperaturparameter werden über ein Thermostat reguliert. Die Detektion des Streulichts erfolgt durch zwei Photomultiplier, die durch ein schrittgesteuertes Goniometersystem (ALV 125) zwischen den Winkeln von 20° und 155° variiert werden können. Die Proben werden alle bei einem Winkel von 90° vermessen. Zur Minimierung des Untergrunds werden nur Signale gezählt, die beide Detektoren gleichzeitig erfassen können. Die eingehenden Signale wertet ein Multitau-Korrelator ALV-5000E aus und

leitet diese an einen angeschlossenen Computer weiter. Die Pseudo-Kreuzkorrelation dient zur Unterdrückung des elektronischen Rauschens der beiden Detektoren.



Abbildung 9.8: Bild des DLS-Messapparatur-Aufbaus.

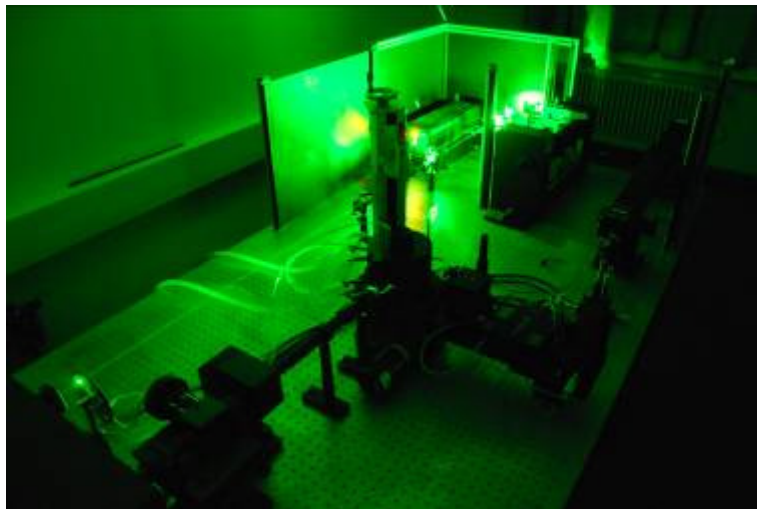


Abbildung 9.9: Bild der DLS-Apparatur mit angeschaltetem Neodym YAG-Laser.

9.1.8 RÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE (XRD)

Die Phasenanalyse der synthetisierten magnetischen Nanopartikel erfolgt mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie. Bei dem Diffraktometer handelt es sich um einen X'Pert Pro MPD (Cu $K_{\alpha 1,2}$ Strahlung, $\lambda_{K\alpha 1} = 1,5406 \text{ \AA}$, $\lambda_{K\alpha 2} = 1,5444 \text{ \AA}$) der Firma PANalytical B. V. (siehe Abbildung 9.10) mit Bragg-Brentano-Geometrie und X'Celerator Detektor („Real-Time-Multiple-Strip“-Detektor). Die Messungen werden im step-scan-mode

durchgeführt. Gemessen wird mit einer Scan-Zeit von 1 min 11 s und einer Step-Größe von $0,02626^\circ$ (vgl. Tabelle 9.4). Die Steuerung des Gerätes sowie die Aufzeichnung der generierten Daten erfolgt durch die Software X'Pert Data Collector. Die kalzinierten und gemörserten Proben werden auf entsprechenden Probenträgern arretiert und aufgebracht.



Abbildung 9.10: Graphische Darstellung des verwendeten Pulverdiffraktometers.

Tabelle 9.4: Zusammenfassung der Messparameter.

Model	X'Pert Pro MPD
Hersteller	PANalytical B. V.
Messbereich 2 Theta [°]	10-90
Spannung [kV]	45
Stromstärke [mA]	40
Schrittweite [°]	0,02626
Scan-Zeit [s]	1 min 11 s
Messzeit [h]	4
Blendensystem	Programmiert auf 3 mm
Filter	Nickel

9.1.9 ZETAPOTENTIAL-MESSUNG

Mit Hilfe des Zetasizers 3000 HS_A der Firma Malvern Instruments (siehe Abbildung 9.11) wurden die Zetapotential-Messungen durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine heterodyne Lichtstreuungselektrophorese-Messanordnung. Durch den an den Pumpkreislauf angeschlossenen Titrator kann der pH-Wert der Suspension durch Zugabe äquivalenter Mengen an Natronlauge bzw. Salzsäure nach Belieben eingestellt werden. Dies hat den Vorteil einer automatischen pH-Wert abhängigen Messung des Zetapotentials.



Abbildung 9.11: links: Bild des verwendeten Zetasizers; rechts: graphische Darstellung der Messzelle mit den Durchflusselektroden.

9.1.10 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM) UND ENERGIEDISPERSIVE RÖNTGENSPEKTROSKOPIE (EDX)

In einem Elektronenmikroskop werden, im Gegensatz zu einem herkömmlichen Lichtmikroskop, hochenergetische Elektronen benutzt, um ein Objekt bildhaft wiederzugeben. Hierzu werden die Materialwelleneigenschaften von Elektronen zur Erzeugung eines Durchlichtelektronenbildes einer Probe genutzt.

Mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (*engl.* **E**nergy **E**ispersive **X**-ray Spectroscopy) wird die Elementarzusammensetzung einer Probe ermittelt. Diese Methode wird häufig mit anderen elektronenmikroskopischen Untersuchungen (hier: TEM) gekoppelt. Durch einen auftreffenden Röntgenstrahl werden die Atome in der Probe angeregt, wodurch ein Elektron aus einer der inneren Schalen herausgeschlagen wird. Der entstandene Zustand ist instabil und wird sofort durch ein energiereicheres Elektron aus einem höheren Orbital aufgefüllt. Bei diesem Übergang wird ein elementspezifisches Röntgenquant freigesetzt. Je nachdem, aus welcher Schale das Elektron nachrückt, können

unterschiedliche Röntgenquanten ($K\beta$, $K\alpha$ und $L\alpha$) emittiert werden. Die Intensität der Linie hängt von der Konzentration des Elementes innerhalb der Probe ab.

Die in dieser Arbeit vorgestellten TEM- sowie die EDX-Aufnahmen wurden am Institut für Neue Materialien (INM) in Saarbrücken angefertigt. Bei dem verwendeten Mikroskop handelt es sich um ein Jeol JEM 2010 und als EDX Detektor dient der Link ISIS Oxford (siehe Abbildung 9.12). Hierfür werden die in Wasser dispergierten Proben auf ein mit Graphit bedampftes Kupfernetz ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) aufgebracht und durch Verdampfen des Dispersionsmittels wird die Probenhaftung auf der Trägeroberfläche realisiert.



Abbildung 9.12: Bild des Jeol JEM 2010 Mikroskops mit gekoppeltem EDX Detektor Link ISIS Oxford.

9.1.11 VIBRATING SAMPLE MAGNETOMETER (VSM)

Mittels eines Vibrating Sample Magnetometers der Firma Lakeshore wurden an der Universität des Saarlandes im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Birringer die magnetischen Eigenschaften der MnZn-MNP charakterisiert. Das Magnetometer besitzt ein konventionelles Helmholtz-Spulenpaar mit einem externen Magnetfeld von -2 T bis 2 T. Das Messgerät wird von einem Computer über einen Lakeshore-VSM Controller 735 gesteuert. Zur Messung des externen statischen Magnetfeldes wird ein Lakeshore-Gaußmeter 450 verwendet. Der verbaute Schwinger wurde von EG Park bezogen, der Magnet von Drusch.

9.1.12 PH-MESSUNG UND DIALYSE

Die pH-Messungen wurden direktpotentiometrisch mit einem Lab 860 der Firma Schott Instruments sowie mit einer protonenselektiven Glaselektrode durchgeführt.

Die Dialyse dient zur Abtrennung von niedermolekularen Teilchen, wie z. B. Salzen, ungebundenen Fluoreszenzmarkern oder Wirkstoffen. Die Trennung erfolgt durch Diffusion der zu entfernenden Teilchen aus der Dispersion durch eine semipermeable Membran in das reine Dispersionsmedium (hier: Wasser). Die Membran wird dabei so gewählt, dass die zu reinigende Probe im Dialyseschlauch zurückgehalten wird. Dialysiert wurde gegen destilliertes Wasser mit Dialyseschläuchen der Trenngröße MWCO 12 bis 14 kDa der Firma Medicell International Ltd. Das Wasser wurde täglich erneuert.

9.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Chemikalie	Formel	Molare Masse [g·mol ⁻¹]	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
6-Aminohexan- säure	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,17	60-32-2	99 + %	Acros
Dextran	[(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n]	60.000-90.000 Da	9004-54-0	high fraction	Acros
Natriumperiodat	NaIO ₄	213,89	7790-28-5	99,8 + %	Acros
N-Hydroxy- succinimid	C ₄ H ₅ NO ₃	115,09	6066-82-6	98 + %	Acros
Natriumhydroxid	NaOH	40	1310-73-2	≥ 99 %; p.a.	Carl Roth
Zinkchlorid	ZnCl ₂	136,28	7646-85-7	≥ 97 %, p.a.	Carl Roth
Dextran from Leuconostoc spp.	[(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n]	15.000-25.000 Da	9004-54-0	/	Fluka
Eisen(III)-Nitrat Nonahydrat	Fe(NO ₃) ₃ ·9 H ₂ O	404	7782-61-8	puriss. p.a., ≥ 98 %	Fluka
Fluorescein 5(6)- isothiocyanat	C ₂₁ H ₁₁ NO ₅ S	389,38	27072-45-3	~90 % (HPLC)	Fluka
Mangan(II)-Chlorid Tetrahydrat	MnCl ₂ ·4H ₂ O	197,91	13446-34-9	≥ 99 % (KT)	Fluka
1,1 Diphosphono- propan 2,3-dicarbonensäure	C ₅ H ₆ O ₁₀ P ₂	288,04	/	/	MCS (Micro Carrier Systems GmbH)
Eisen(II)-Chlorid Tetrahydrat	FeCl ₂ ·4H ₂ O	198,83	13478-10-9	≥ 99%	Merk
Eisen(III)-Chlorid Hexahydrat	FeCl ₃ ·6H ₂ O	270,3	10025-77-1	99 %	Riedel-de Haën
Natriumcitrat (tribasisch Dihydrat)	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2 H ₂ O	294,1	6132-043	≥ 99 %	Riedel-de Haën
4',6-Diamidin-2- phenylindol Dihydrochlorid	C ₁₆ H ₁₅ N ₅ ·2HCl	350,24	28718-90-3	≥ 95 % (HPLC)	Sigma-Aldrich
Doxrubicin Hydrochlorid	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁ ·HCl	579,98	25316-40-9	≥ 98% (TLC)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamin dihydrochlorid	C ₂ H ₆ N ₂ ·2HCl	133,02	333-18-6	98 %	Sigma-Aldrich
EDC Hydrochlorid	C ₈ H ₁₇ N ₃ ·HCl	297,18	22572-40-3	98 + %	Sigma-Aldrich
Natriumcyan- borhydrid	NaBH ₃ CN	62,84	25895-60-7	95 %	Sigma-Aldrich
Poly(allylamin hydrochlorid)	[(C ₃ H ₇ N) _n]	~ 15.000	71550-12-4	Pulver	Sigma-Aldrich
Poly(acrylsäure)	[(C ₃ H ₄ O ₂) _n]	~ 1800	9003-104	Pulver	Sigma-Aldrich
Poly(ethylenimin)	[(C ₂ H ₅ N) _n]	~ 1800	9002-98-6	50 Gew.-% in H ₂ O	Sigma-Aldrich

Chemikalie	Formel	Molare Masse [g·mol ⁻¹]	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
Poly (4-styrolsulfon- säure-co- maleinsäure)- Natrium-salzlösung	$[C_9H_7O_3SR]_x[C_4H_2O_4R_2]_y$, R=H or Na	~ 20.000	68037-40-1	25 Gew.-% in H ₂ O	Sigma-Aldrich
Alendronsäure	C ₄ H ₁₃ NO ₇ P ₂	249,1	66376-36-1	> 98 %	TCI Europe
Salpetersäure 65 %	HNO ₃	63,01	7697-37-2	reinst	VWR
Salzsäure 37 %	HCl	36,46	7647-01-0	zur Analyse	VWR

9.3 SYNTHESEVORSCHRIFTEN

9.3.1 HERSTELLUNG VON BIOMEDIZINISCH FUNKTIONALISIERTEN MnZn-MNP

Synthese von $\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$

Es werden 10,81 g (0,04 mol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 40 mL dest. Wasser gelöst und auf 70°C erwärmt. In einem Kolben werden 3,16 g (0,016 mol) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ und 0,55 g (0,004 mol) ZnCl_2 in 2 mL $\text{HCl}_{\text{conz.}}$ und 8,8 mL dest. Wasser (Milli-Q Wasser, $18,4\text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) gelöst und auf 70°C gebracht. In einem separaten Becherglas werden 200 mL einer 0,2525 mol / L Natronhydroxid-Lösung auf 90°C erhitzt. Kurz vor dem Fällungsprozess werden die beiden Metall-Precursor-Lösungen vereinigt und unter starkem Rühren zur Natronhydroxid-Lösung gegeben. Im Anschluss wird 90 min bei 90°C gerührt. Die ausgefallenen Partikel werden mit Hilfe eines Permanentmagnetens sedimentiert und mehrmals mit dest. Wasser gewaschen, bis ein pH von 10 erreicht wird. Die anschließende Stabilisierung der Nanopartikel mit NO_3^- -Ionen erfolgt durch die Zugabe von 60 mL 2 M Salpetersäure. Diese Suspension rührt 6 min bei Raumtemperatur (RT). Anschließend erfolgt die Zugabe von 8,482 g (0,021 mol) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ gelöst in 60 mL dest. Wasser und 1,584 g (0,008 mol) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sowie 0,277 g (0,002 mol) ZnCl_2 , gelöst in 8,5 mL dest. Wasser. Kurz vor der Zugabe zu der Suspension werden die beiden Metall-Precursor-Lösungen vereint. Diese Suspension wird 30 min bei 80°C gerührt und anschließend unter Rühren auf RT abgekühlt.

Mit einem Permanentmagneten wird das Produkt sedimentiert und in 200 mL dest. Wasser aufgenommen. Zum Austausch Nitrat-Ionen durch Citrat-Ionen erfolgt eine 7-tägige Dialyse gegen 0,01 M Natriumcitrat-Lösung. Zur Reinigung des Produkts wird 7 Tage eine Dialyse gegen dest. Wasser durchgeführt. Das Ferrofluid wird im Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 60 mL bis 80 mL eingeengt. ^[74]

Das synthetisierte Ferrofluid liegt in einem pH-Bereich von 6,5 bis 7,2 und hat einen Feststoffgehalt zwischen 4,5 % und 5,5 % bezogen auf 10 mL.

Synthese von Carboxymethyl-Dextran (CMD)

In 425 mL *Iso-Propanol* werden 20 g (0,12 mol) Dextran (15-20 kDa) gelöst und mit 75 mL Natronlauge (14,3 M) versetzt. Diese Lösung rührt 60 min bei RT. Es folgt die Zugabe von 29,2 g (0,31 mol) Chloressigsäure. Diese Mischung wird 1,5 Stunden bei 60°C weitergerührt. Nach Abkühlung auf RT und Abdekantieren des Lösemittels wird 150 mL Methanol zugegeben. Nachdem diese Mischung 15 min bei RT rührt, wird das überschüssige Methanol abdekantiert. Der Rückstand wird in 150 mL dest. Wasser aufgenommen und mittels 1 molarer HCl wird die Lösung auf einen pH-Wert von 1,3 eingestellt. Es folgt die viertägige Dialyse gegen dest. Wasser und die anschließende Gefriertrocknung des

Produkts. Durch analoge Wiederholung der Synthese wird ein höherer Substitutionsgrad (DS) des CMDs erhalten.

Ausbeute: 1) 24,4 g (95 %, Literatur^[183] 25,8 g; 100 %), Substitutionsgrad: 0,80
2) 22,1 g (86 %, Literatur^[183] 25,8 g; 100 %), Substitutionsgrad: 1,25

Die Bestimmung des Substitutionsgrads von CMD erfolgt mittels Rücktitration. Dazu wird eine entsprechende Menge an CMD in 1 M Natronlauge gelöst und gegen eine 1 M HCl-Lösung zurücktitriert. Als Indikator fungiert Phenolphthalein.

Synthese von Polyaldehyd-Dextran (PAD)

7,50 g (~ 0,11 mmol) Dextran (60-90 kDa) werden in 100 mL dest. Wasser gelöst und mit 3,250 g (0,015 mol) Natriumperiodat versetzt. Unter N₂-Atmosphäre und Lichtausschluss wird diese Lösung 24 Stunden bei RT untergerührt. Die Reinigung des Produkts erfolgt mittels einer 3-tägigen Dialyse gegen dest. Wasser. Das gereinigte Produkt wird anschließend gefriergetrocknet. Durch Wiederholung der Synthese wird ein höherer Umsetzungsgrad von PAD erlangt.

Ausbeute: 5,90 g bis 7,00 g

Synthese von Ethylendiamin-Carboxymethyl-Dextran (Ed-CMD)

2,50 g CMD (DS = 1,25) werden in 25 mL dest. Wasser gelöst und mit 1,00 g EDC·HCl sowie einer Spatelspitze NHS versetzt. Die Zugabe von EDC erfolgt über eine Stunde. Danach wird die Mischung 30 min im Ultraschallbad inkubiert (zum besseren Lösen von EDC). Nach vollständiger Auflösung werden 35 mL einer 2 M Ethylendiamin-Lösung hinzugegeben. Mittels einer 0,1 M NaOH-Lösung wird der pH auf 4,8 eingestellt. Unter Lichtausschluss wird diese Lösung 24 Stunden bei RT gerührt. Anschließend erfolgt eine 3-tägige Dialyse gegen dest. Wasser. Das Produkt wird durch Gefrier Trocknung aufgearbeitet.

Ausbeute: 2,745 g (weißer Feststoff)

Synthese von Hydrazin-Carboxymethyl-Dextran (Hy-CMD)

2,500 g CMD (DS = 1,25) werden in 25 mL dest. Wasser gelöst und mit 0,750 g EDC·HCL sowie einer Spatelspitze NHS versetzt. Die Zugabe von EDC erfolgt über eine Stunde. Nach vollständiger Auflösung werden 2 mL Hydrazin hinzugegeben und die Lösung unter

Lichtausschluss 24 Stunden bei RT gerührt. Anschließend erfolgt eine 3-tägige Dialyse gegen dest. Wasser. Das Produkt wird durch Gefrierdrying aufgearbeitet.

Ausbeute: 2,950 g (weißer Feststoff)

Synthese von Dextran-Derivat-beschichteten Nanopartikeln

500 mg des jeweiligen Dextran-Derivates werden in 9 mL dest. Wasser gelöst und zu der äquivalenten Menge an Ferrofluid gegeben. Diese so erhaltene Suspension wird 20 min im Ultraschallbad inkubiert und anschließend 24 Stunden bei 45°C unter Lichtausschluss weitergerührt. Es folgt eine 3-tägige Dialyse (Dialysewasser: 200 mL) gegen dest. Wasser.

PAD-beschichtete MnZn-MNP: pH-Wert ~ 6,80; 39 mg / mL

CMD-beschichtete MnZn-MNP: pH-Wert ~ 5,80; 36 mg / mL

Ed-CMD-beschichtete MnZn-MNP: pH-Wert~ 6,4; 32 mg / mL

Hy-CMD-beschichtete MnZn-MNP: pH-Wert ~ 4,80; 33 mg / mL

Synthese von Doxorubicin-funktionalisierten Nanopartikeln (PAD-, Hy-CMD-, Ed-CMD-beschichtete MnZn-MNP; Amin-Bindung)

2 mL der Dextran-Derivat-beschichteten MnZn-MNP werden mit 2 mg (3,45 µmol) Doxorubicin versetzt. Zu dieser Suspension werden 1-2 Tropfen Essigsäure gegeben und 24 Stunden bei 37°C unter Lichtausschluss gerührt (Hy-CMD nur bis hier). Anschließend werden die gebildeten Imine mittels 2 mg (31,83 µmol) NaBH₃CN 24 Stunden bei 37°C unter Lichtausschluss zu den entsprechenden Aminen reduziert. Die Reinigung des Produkts erfolgt mittels einer 2-tägigen Dialyse gegen dest. Wasser bei 4°C. Die funktionalisierten Partikel werden bei 4°C gelagert.

Synthese von Doxorubicin-CMD-funktionalisierten Nanopartikeln (Säure-Amid-Bindung)

2 mL CMD-NP (36 mg·mL⁻¹) werden mit 70,05 mg (0,365 mmol) ECD-HCL und einigen Körnchen NHS versetzt und 5 Stunden bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend werden 70,05 mg (0,365 mmol) ECD-HCL und einige Körnchen NHS hinzugegeben. Hinterher werden 2 mg (3,45 µmol) Doxorubicin zugegeben und 24 Stunden bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Die Reinigung des Produkts erfolgt mittels einer 2-tägigen Dialyse gegen dest. Wasser bei 4°C. Die funktionalisierten Partikel werden bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

9.3.2 BELADUNGEN VON T-ZELLEN MIT DOXORUBICIN-FUNKTIONALISIERTEN NANOPARTIKELN

Vorbereitung der T-Zellen

Die T-Zellen werden aus Buffy Coat mit RosetteSep[®] Human T Cell Enrichment Cocktail, StemCell Technologies isoliert und mit MACS T-Cell Activation / Expansion Kit human, Miltenyi Biotec (1:3) aktiviert. Anschließend werden die Zellen mit dem Medium (RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Pen / Strep) bei 37°C und 5 % CO₂ für mindestens 3 Tage kultiviert.

Beladung von T-Zellen mit Doxorubicin-funktionalisierten Nanopartikeln

Die T-Zellen werden mit dem Medium [RPMI 1640 (Gibco BRL; Eggenstein) + 10 % FKS (Gibco BRL; Eggenstein + 1 % Pen / Strep] gewaschen (300 xg; 8 min; RT) und auf eine Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen·mL⁻¹ eingestellt. Die mit Doxorubicin-funktionalisierten Partikel werden mit der 25fachen Menge an RPMI 1640 versetzt (Endkonzentrationen von 0,1 µg·mL⁻¹ bis 30 µg·mL⁻¹; 3-facher Ansatz) und auf Eis gesetzt. 0,5 mL der T-Zellsuspension werden mit jeweils 20 µL an Partikel-Lösung versetzt und vorsichtig vorgetext. Die Inkubation findet mittels Rotator bei 04 / 08, 37°C und 60 min oder auf einem Drehrad im Kühlraum bei 4°C 60 min statt. Durch Eis wird die Inkubation gestoppt.

Probenvorbereitung für FACS-Messungen

Die Proben werden gewaschen (400 xg; 8 min bei RT) und im FACS-Puffer (PBS; 5 % FKS; 0,1 % Natriumazid) aufgenommen. Die Autofluoreszenz von Doxorubicin wird in Kanal FL2-H (ex.: 488 nm; em.: 585 ± 21 nm) gemessen. Die Auswertung erfolgt mit Cell Quest Pro; BD.

Probenvorbereitung für Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen mit Olympus IX 71

Die Zellen werden in 4%-igem (w / v) Paraformaldehyd / PBS 10 min bei RT fixiert und in Mounting Medium Mowiol (enthält 1 µg·mL⁻¹ DAPI für Kernfärbung) eingebettet. Die Autofluoreszenz von Doxorubicin wird mit dem Filter WG aufgenommen (ex.: 510 nm bis 550 nm; em.: > 590 nm).

Probenvorbereitung für Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen mit Zeiss Axioplan 2 imaging 100-fach (HB050_{AC} / HAL100)

1 mL Serum wird mit 9 mL Erythrocyte-Lysis-Puffer (Gibco BRL; Eggenstein) versetzt und 10 min bei RT lysiert. Die Lösung wird 10 min bei RT und 1200 U·min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zentrifugat in 500 µL Medium (RPMI 1640 ohne Phenolrot

+ 10 % FKS) aufgenommen. Die Lösung wird mit 2,5 μL EpCAM (Anti-HEA) und 1,0 μL CD-45-PE versetzt und anschließend 15 min im Kühlschrank inkubiert. 3,75 μL an Dox-funktionalisierten MnZn-MNP werden zu der Zellsuspension gegeben und über Nacht auf einem Magneten bei 37°C inkubiert.

9.3.3 HERSTELLUNG VON MULTIFUNKTIONALEN MNZN-MNP MITTELS LBL-TECHNIK

Synthese von Multischichtsystemen

9 mL eines Citrat-stabilisierten Ferrofluids werden langsam zu einer Lösung aus 50 mg des Polykations, gelöst in 9 mL dest. Wasser, getropft. Vorher wird die Polymer-Lösung 20 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Lösung wird 12 Stunden bei RT unter Lichtausschluss weitergerührt. Es folgt eine 2-tägige Dialyse gegen dest. Wasser.

Anschließend werden 9 mL von Polykation-beschichteten MnZn-MNP langsam zu einer Lösung bestehend aus 25 mg Polyanion, gelöst in 9 mL dest. Wasser, getropft. Vorher wird die Polyanion-Lösung 20 min im Ultraschallbad inkubiert. Danach wird die Lösung 2 Stunden bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Es folgt eine 2-tägige Dialyse gegen dest. Wasser.

Die einzelnen Syntheseschritte werden so oft wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an Schichten erreicht wird.

Synthese von Doxorubicin-funktionalisierten Nanopartikeln → Amin-Bindung

2 mL von PAH oder PEI-beschichteten MnZn-MNP-Suspensionen ($30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) werden mit 2 mg (3,45 μmol) Doxorubicin versetzt. Zu dieser Suspension werden 1-2 Tropfen Essigsäure gegeben und 24 Stunden bei 37°C unter Lichtausschluss gerührt. Die gebildeten Imine werden mittels 2 mg (31,83 μmol) NaBH_3CN 24 Stunden bei 37°C unter Lichtausschluss zu den entsprechenden Aminen reduziert. Die Reinigung des Produkts erfolgt durch eine 2-tägige Dialyse gegen dest. Wasser bei 4°C. Die beschichteten Partikel werden bei 4°C aufbewahrt.

Synthese von Doxorubicin-funktionalisierten Nanopartikeln → Säure-Amid-Bindung

2 mL von PAA oder PSSa-co-MA-beschichteten Partikelsuspensionen ($30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) werden mit 70,05 mg (0,365 mmol) ECD-HCL und einer Spatelspitze NHS versetzt und 5 Stunden bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Nach Ablauf der Zeit werden weitere 70,05 mg (0,365 mmol) ECD-HCL sowie eine Spatelspitze NHS hinzugegeben. Es folgt die Zugabe von 2 mg (3,45 μmol) Doxorubicin und das Weiterrühren der Suspension 24 Stunden bei RT

unter Lichtausschluss. Die Reinigung des Produkts erfolgt mittels einer 2-tägigen Dialyse gegen dest. Wasser bei 4°C. Die LbL-beschichteten Partikel werden bei 4°C aufbewahrt.

9.3.4 HERSTELLUNG VON FLUORESZENZ-MARKIERTEN NANOPARTIKELN

Synthese von beschichteten $\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ Nanopartikeln

Es werden 0,04 mol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 40 mL dest. Wasser gelöst und auf 70°C erwärmt. In einem anderen Kolben werden 0,016 mol $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ und 0,004 mol ZnCl_2 in 2 mL $\text{HCl}_{\text{conz.}}$ und 8,8 mL dest. Wasser gelöst und auf 70°C gebracht. In einem separaten Becherglas wird eine 200 mL Natronhydroxid-Lösung (0,2525 mol) auf 90°C erhitzt. Kurz vor dem Fällungsprozess werden die Metall-Lösungen vereinigt, unter starkem Rühren zur Natronhydroxid-Lösung gegeben und 60 min bei 30°C gerührt (abkühlen auf RT). Die ausgefallenen Partikel werden mit Hilfe eines Permanentmagnetens sedimentiert und 3-mal mit 200 mL dest. Wasser gewaschen, bis ein pH-Wert von 10 erreicht wird. Danach werden die Partikel erneut in etwa 200 mL Wasser aufgenommen. Zur Suspension werden unter starkem Rühren 0,250 g Stabilisator gegeben und für 90 min auf 90°C erhitzt. Anschließend folgt eine 3-tägige Dialyse gegen dest. Wasser.

In beiden Fällen fungieren folgende Verbindungen als Stabilisatoren der Partikel:

- Phosphonate: 1) Alendronsäure
- 2) 1,1 Diphosphonopropan 2,3-dicarbonensäure
- synth. Aminosäure: 6-Aminohexansäure

Modifizierung von beschichteten Partikeln mit DAPI

3 mL der beschichteten Partikel werden mit 70,05 mg (0,365 mmol) ECD-HCL und ein paar Körnchen NHS versetzt und 5 Stunden bei RT im Dunkeln gerührt. Nach Ablauf der Zeit werden noch einmal 70,05 mg (0,365 mmol) ECD-HCL und eine Spatelspitze NHS hinzugegeben. Anschließend werden 2 mg ($n = 5,71 \mu\text{mol}$) DAPI, gelöst in 0,5 mL Ethanol, zugegeben und 24 Stunden bei RT im Dunkeln gerührt. Die Reinigung des Produkts erfolgt mittels einer 2-tägigen Dialyse gegen dest. Wasser bei 4°C. Die funktionalisierten Partikel werden im Kühlschrank aufbewahrt.

Modifizierung von beschichteten Partikeln mit FITC

FITC wird in Ethanol gelöst (Endkonzentration $2\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) und zu 3 mL der Probelösung gegeben. Diese Partikelsuspension wird 16 Stunden bei 45°C im Dunkeln gerührt. Die Reinigung der Suspension erfolgt mittels einer 2-tägigen Dialyse gegen dest. Wasser unter Lichtausschluss und bei 4°C. Die funktionalisierten Partikel werden bei 4°C aufbewahrt.

9.4 TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER VERSCHIEDENEN SCHWINGUNGSARTEN

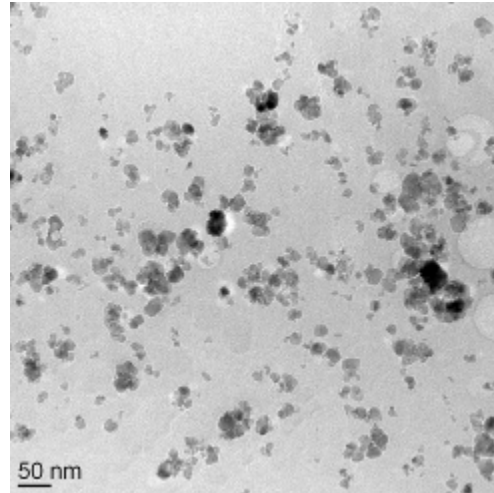
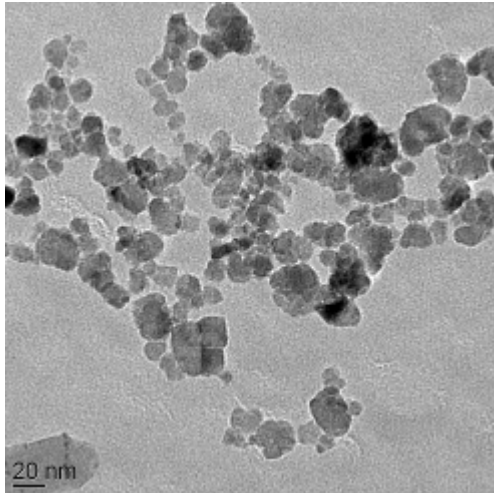
Wellenzahl [cm ⁻¹]	Gruppe	Schwingungsart	IR / Raman Intensität	Literatur ^[15] [cm ⁻¹]
3500-3100	O-H	Valenzschwingung Hydroxyl- & Carboxyl-Gruppen sowie von H...O-H (Wasserstoffbrücken)	m-s / w	3550-3230
3340 / 3320	N-H	Valenzschwingung v. sekundären Amininen, Aufspaltung bei <i>cis</i> / <i>trans</i> -Isomerie	m-s / m-w	3350 / 3200
3200	N-H	Valenzschwingung von protonierten prim. Amininen -NH ₃ ⁺ , in verdünnten Lösung zwei Banden	m / w	3350-3100
3120	C-H	Valenzschwingung v. aromatischen =CH-Gruppen	m / s	3105-3000
3020	C-H	asymmetrische Valenzschwingung v. CH ₃ -Gruppen (Ar-O-CH ₃)	w-m / m-s	3030-2950
2900-2700	N-H	Valenzschwingung v. protonierten sek. Amininen -NH ₂ ⁺	s / m	3000-2700
2950	C-H	asymmetrische Valenzschwingung v. CH ₃ -Gruppen (Ar-O-CH ₃)	w-m / m-s	2975-2935
2915	C-H	asymmetrische Valenzschwingung v. CH ₂ -Gruppen	m-s / m-s	2940-2915
2870	C-H	symmetrische Valenzschwingung v. CH ₂ -Gruppen	m / m-s	2870-2840
2835	C-H	symmetrische Valenzschwingung v. CH ₃ -Gruppen (Ar-O-CH ₃)	m / m	2860-2815
2760	C-H	Wechselwirkung zwischen fundamentalen Schwingungen und Methyl-Gruppen	w-m / -	2980-2700
2710	C-H	Oberton der Deformationsschwingung v. Methyl-Gruppen	w-m / -	2980-2700
2700-2330	N-H	Valenzschwingung von protonierten Iminen -C=NH ⁺ , eine oder mehrer Banden	s / m	2700-2330
2200-1800	N-H	Valenzschwingung v. protonierten tertiären Amininen -NH ⁺	w-m / -	2700-2330
2100-1990	N-C-S	asy. Valenzschwingung v. Isothiocyanat (breite Bande)	s / m	2100-1990
1730	C=O	Valenzschwingung v. Carboxyl-Gruppen	s / w-m	1700-1665
1695-1540	COO ⁻	asymmetrische Valenzschwingung v. deprotonierten Carboxyl-Gruppen	m / w	1695-1540
1600	C=C	Valenzschwingung v. C=C-Gruppen/ Aromaten	variable / m	1620-1590
-	N-H	Biegeschwingung von Iminen	m / w	1590-1500

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Gruppe	Schwingungsart	IR / Raman Intensität	Literatur ^[15] [cm ⁻¹]
1520	N-H	Deformationsschwingung v. Säure-Amiden (-CO-NH-) <i>trans</i> -Form	s / w	1570-1515
1550	N-H	Deformationsschwingung v. sek. Aminen	m -s / m	1580 - 1490
1445	N-H	Biegeschwingung von v. Säure-Amiden (-CO-NH-) <i>cis</i> -Form	m / w	1450-1440
1445	C-H	asymmetrische Deformationsschwingung v. CH ₃ -Gruppe (Ar-O-CH ₃)	m / m-w	1485-1440
-	C-H	Kombination aus versch. Deformationsschwingungen, wie Kipp-, Torsions- und Pendelschwingung v. CH ₂ -Gruppen	w / m	1430-715
1420	COO ⁻	symmetrische Valenzschwingung v. deprotonierten Carboxyl-Gruppen	m / w	1440-1335
1340	C-N	Valenzschwingung v. Säure-Amiden (-CO-NH-) <i>cis</i> -Form	w-m / s	1350-1310
1340	C-H	Deformationsschwingung v. sekundären Alkoholen	w / m	1350-1290
-	C-H	Kombination: OH in-plane Deformationsschwingung & CH-Kippschwingung v. sek. Alkoholen	m-s / m -w	1310-1250
1270	C-O	Valenzschwingung v. Carboxyl-Gruppen	m-s / w-s	1320-1210
1260	C-N	Valenzschwingung v. Säure-Amiden (-CO-NH-) <i>trans</i> -Form	w-m / s	1305-1200
1133	C-O	Valenzschwingung v. sekundären Alkoholen	s / m-s	1150-1075
1100	C-O-C	asym. Valenzschwingung	s / m	1110-1090
1090	C-C	Valenzschwingung	w / m-s	1090-1005
1070	C-H	in-plane Deformationsschwingung v. Aromaten	m / s	1290-990
990	C-C-O	Valenzschwingungen v. sek Alkoholen	m / s	1000-800
917	O-H...O	out-of-plane Deformationsschwingung v. Carbonsäuren	m-s / m	955-915
850	COO ⁻	Scherschwingung v. deprotonierten Carboxyl-Gruppen	m / -	860-615
660	N-H	out-of-plane Deformationsschwingung v. CONH-Gruppen (<i>trans</i> -Form)	m / m	770-620
620	O=C-N-	out-of-plane Biegeschwingung v. CONH-Gruppen	m-s / m	695-550
-	COO ⁻	Pendelschwingung v. deprotonierten Carboxyl-Gruppen	m / -	700-450
540	C-O	out-of-plane Deformationsschwingung CONH- oder COOH-n	m-w / m-w	680-480
450	C-C=O	Deformationsschwingung		500-450

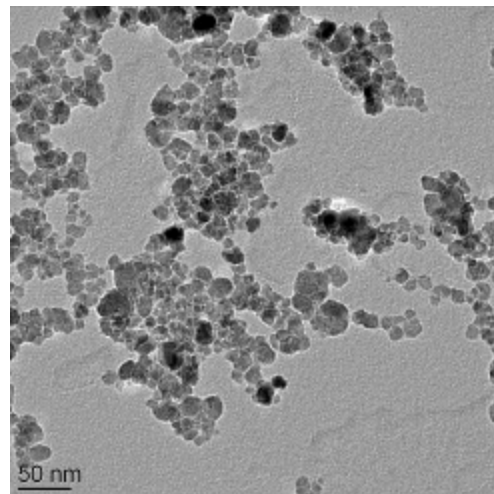
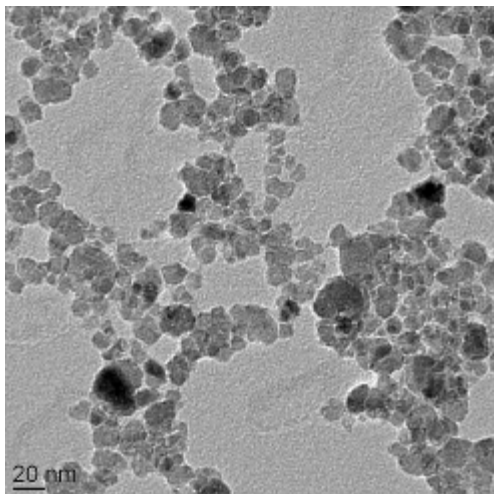
9.5 ZUSÄTZLICHE ABBILDUNGEN

9.5.1 TEM-AUFNAHMEN VON DEXTRAN-DERIVAT-MNZN-MNP (KAPITEL 4.3)

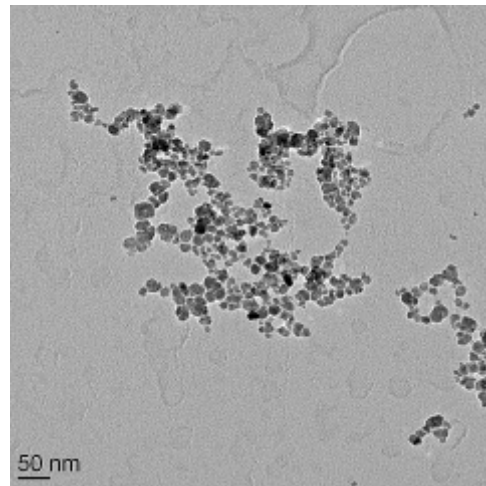
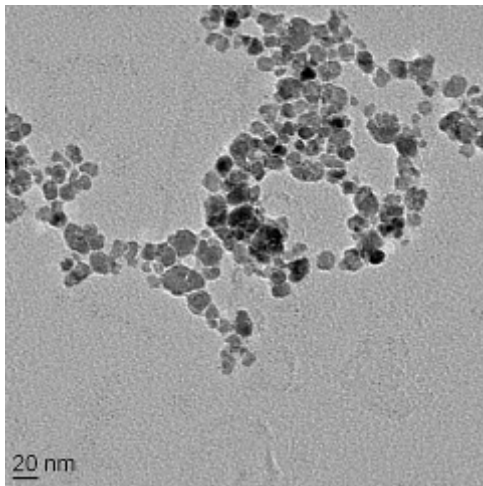
PAD-beschichtete MnZn-MNP



Ed-CMD-beschichtete MnZn-MNP

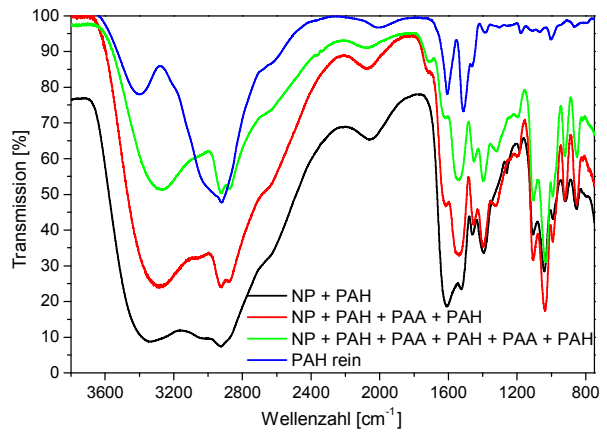
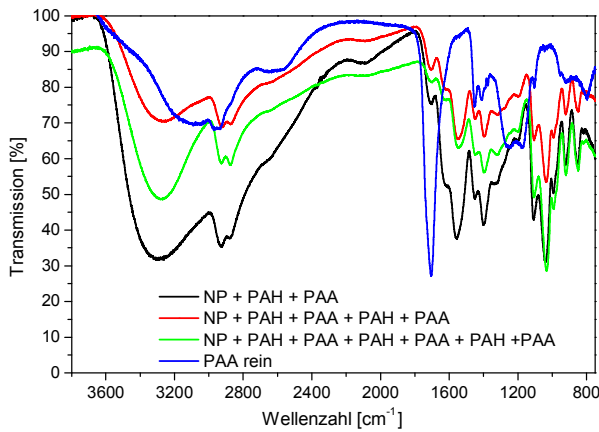


Hy-CMD-beschichtete MnZn-MNP

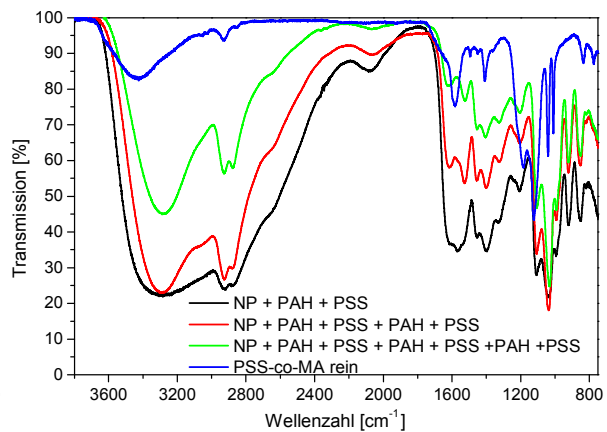
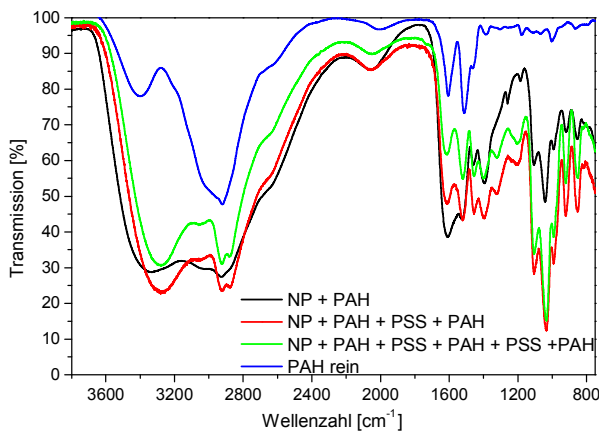


9.6 WEITERE FT-IR-ABBILDUNGEN ZU KAPITEL 6.1

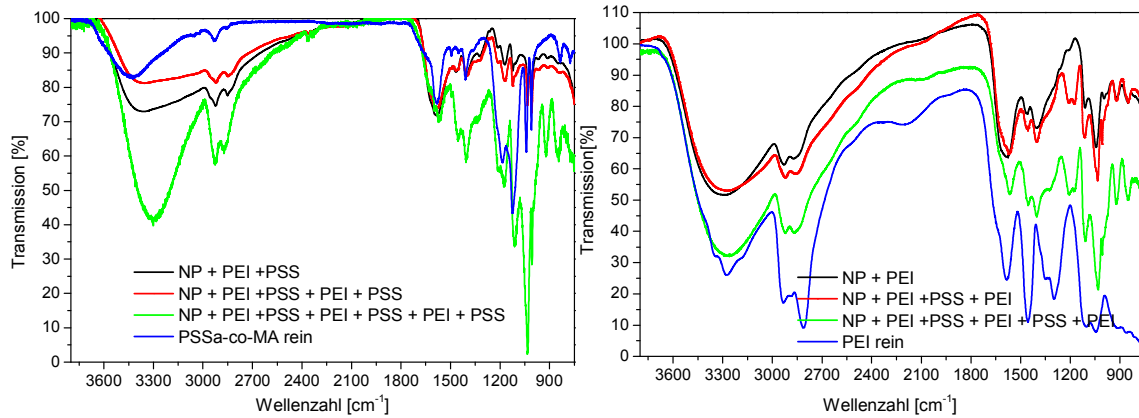
(PAH / PAA)-Multischichtsysteme



(PAH / PSSa-co-MA)-Multischichtsysteme

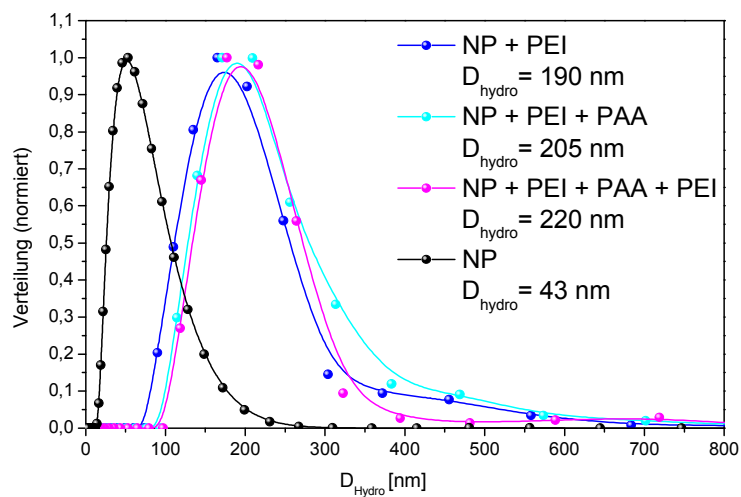


(PEI / PSSa-co-MA)-Multischichtsysteme

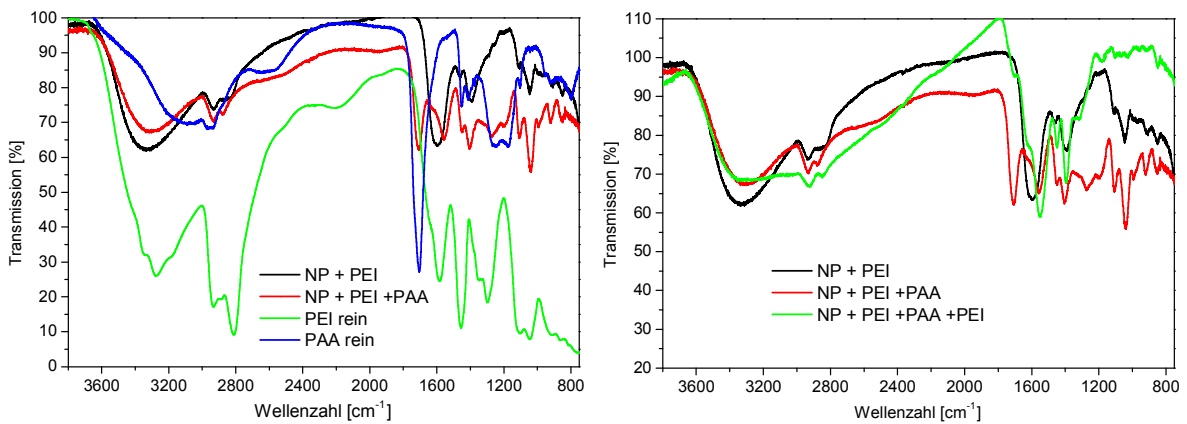


9.6.1 ZUSATZINFORMATIONEN ZU (PEI / PAA)-MULTISCHICHTSYSTEMEN

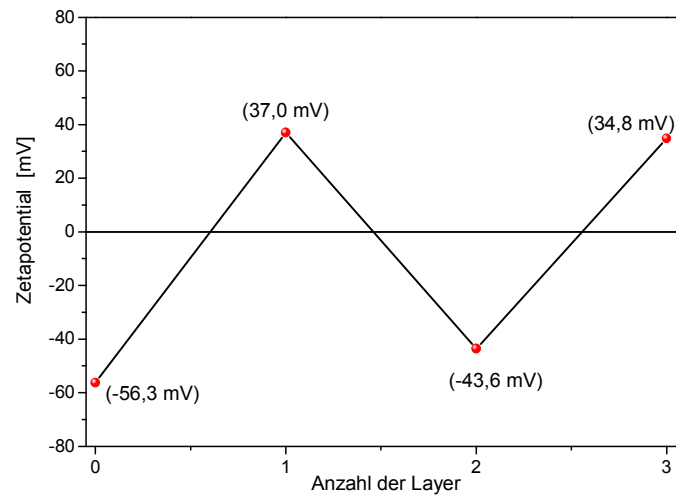
DLS-Messergebnis



FT-IR-Abbildungen



Zetapotential-Bestimmung



9.7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] V. B. B. Berkovski, *Magnetic fluids and applications handbook*, Begell House, New York, **1996**.
- [2] H. H. Landolt, R. Börnstein, *Zahlenwerte und Funktionen aus Naturwissenschaften und Technik: Neue Serie, Magnetische Eigenschaften und andere Eigenschaften von Oxiden und verwandten Verbindungen, Gruppe III, Band 4 Teil B*, Springer., **1970**.
- [3] R. Feynman, *Engineering and Science* **1960**, 23, 22.
- [4] N. Taniguchi, *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering* **1974**.
- [5] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, 1362.
- [6] H. Paschen, C. Coenen, T. Fleischer, R. Grünwald, D. Oertel, C. Revermann, in *Nanotechnologie*, Springer Berlin Heidelberg, **2004**, pp. 27.
- [7] D. G. Castner, B. D. Ratner, *Surface Science* **2002**, 500, 28.
- [8] U. Behrens, M. Ringpfeil, D. Brückner, M. Fröhlich, K. Krüger, H. Thiel, W. Torporski, *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* **1961**, 3, 199.
- [9] Römpp Lexikon Chemie, 2. ed., Georg Thime Verlag, Stuttgart/New York.
- [10] H. Fleisch, *Breast Cancer Research* **2002**, 4, 30
- [11] J. A. Allen, R. A. Halverson-Tamboli, M. M. Rasenick, *Nature Reviews Neuroscience* **2007**, 8, 128.
- [12] P. Dokouhaki, M. Han, B. Joe, M. Li, M. R. Johnston, M.-S. Tsao, L. Zhang, *Cancer Letters*, 297, 126.
- [13] B. Alberts, *Molekularbiologie der Zelle*, 2. Auflage ed., Wiley-VCH, **2004**.

- [14] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biochemical Journal* **2004**, 377, 159.
- [15] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, 422, 37.
- [16] S. Kornfeld, I. Mellman, *Annual Review of Cell Biology* **1989**, 5, 483.
- [17] I. Mellman, R. Fuchs, A. Helenius, *Annual Review of Biochemistry* **1986**, 55, 663.
- [18] M. Dass, Dissertation, Universität Ulm, Ulm **2010**.
- [19] M. Busse, Dissertation, Ernst-August-Arndt-Universität, Greifswald, **2007**.
- [20] T. Sharav, Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin, Berlin **2004**.
- [21] J. Neumann, *Immunbiologie: Eine Einführung*, Springer, **2008**.
- [22] S. Janssens et al., *The Lancet* **2006**, 367, 113.
- [23] E. Küstermann, W. Roell, M. Breitbach, S. Wecker, D. Wiedermann, C. Buehrle, A. Welz, J. Hescheler, B. K. Fleischmann, M. Hoehn, *NMR in Biomedicine* **2005**, 18, 362.
- [24] D. L. Kraitchman, A. W. Heldman, E. Atalar, L. C. Amado, B. J. Martin, M. F. Pittenger, J. M. Hare, J. W. M. Bulte, *Circulation* **2003**, 107, 2290.
- [25] D. H. Kim, K. N. Kim, K. M. Kim, Y. K. Lee, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2009**, 88A, 1.
- [26] M. Namdeo, S. Saxena, R. Tankhiwale, M. Bajpai, Y. M. Mohan, S. K. Bajpai, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2008**, 8, 3247.
- [27] L.-Y. Zhang, H.-C. Gu, X.-M. Wang, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, 311, 228.
- [28] A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, 26, 3995.
- [29] A. K. Gupta, R. R. Naregalkar, V. D. Vaidya, M. Gupta, *Nanomedicine* **2007**, 2, 23.
- [30] K. J. Widder, A. E. Senyei, S. D. Reich, D. F. Ranney, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **1978**, 19, 17.
- [31] F. Benyettou, I. Chebbi, L. Motte, O. Seksek, *Journal of Materials Chemistry* **2011**, 21, 4813.
- [32] T.-Y. Liu, H.-H. Huang, Y.-J. Chen, Y.-J. Chen, *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, 578.
- [33] H. Pinto-Alphandary, A. Andremont, P. Couvreur, *International Journal of Antimicrobial Agents* **2000**, 13, 155.
- [34] R. M. Sawant, J. P. Hurley, S. Salmaso, A. Kale, E. Tolcheva, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Bioconjugate Chemistry* **2006**, 17, 943.
- [35] W. Cao, J. Zhou, Y. Wang, L. Zhu, *Biomacromolecules* **2007**, 11, 3680.
- [36] H. Gao, M. Li, Y. Wu, *Journal of Applied Polymer Science* **2011**, 120, 2448.
- [37] Q. Neng, et al., *Vol. 5*, p. 065006.
- [38] J.-H. Park, G. von Maltzahn, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, M. J. Sailor, *Angewandte Chemie* **2008**, 120, 7394.

- [39] C. Dufès, I. F. Uchegbu, A. G. Schätzlein, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, 57, 2177.
- [40] E. H. M. Lempens, M. Merckx, M. Tirrell, E. W. Meijer, *Bioconjugate Chemistry*, 22, 397.
- [41] R. Tong, J. Cheng, Vol. 47, Taylor & Francis, **2007**, pp. 345
- [42] G. Orive, E. Anitua, J. L. Pedraz, D. F. Emerich, *Nature Reviews Neuroscience* **2009**, 10, 682.
- [43] S. Moro, G. L. Beretta, D. Dal Ben, J. Nitiss, M. Palumbo, G. Capranico, *Biochemistry* **2004**, 43, 7503.
- [44] A. S. Luebbe, *Cancer Research* **1997**, 57, 3064.
- [45] A. S. Luebbe et al., *Cancer Research* **1996**, 56, 4686.
- [46] T. Neuberger, B. Schopf, H. Hofmann, M. Hofmann, B. von Rechenberg, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, 293, 483.
- [47] R. D. K. Misra, *Materials Science and Technology* **2008**, 24, 1011.
- [48] S. H. Hu, S. Y. Chen, D. M. Liu, C. S. Hsiao, *Advanced Materials* **2008**, 20, 2690.
- [49] M. Marengo, F. Bonomi, S. Iametti, E. Prinz, R. Hempelmann, M. Boye, H. Frokiaer, *accepted by J. Molecular Nutrition and Food Research* **2011**.
- [50] M. Marengo, Dissertation, Universität von Mailand, Mailand (Italien), **2009**.
- [51] K. X. Chenjie Xu, Hongwei Gu, Rongkun Zheng, Hui Liu, Xixiang Zhang, Zhihong Guo, and Bing Xu, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 9938.
- [52] L. X. Chen, T. Liu, M. C. Thurnauer, R. Csencsits, T. Rajh, *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106, 8539.
- [53] G. Oberdoerster, E. Oberdoerster, J. Oberdoerster, *Environ Health Perspect* **2005**, 113, 823.
- [54] H. F. Krug, P. Wick, *Angewandte Chemie* **2011**, 123, 1294.
- [55] S. Zhu, E. Oberdörster, M. L. Haasch, *Marine Environmental Research* **2006**, 62, S5.
- [56] M. Roller, *Inhalation Toxicol.* **2009**, 21, 144.
- [57] R. Landsiedel, L. Ma-Hock, A. Kroll, D. Hahn, J. Schnekenburger, K. Wiench, W. Wohlleben, *Advanced Materials* **2010**, 22, 2601.
- [58] Z. Yu, W. Xiaoliang, W. Xuman, X. Hong, G. Hongchen, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008**, 85A, 582.
- [59] T. K. Jain, M. K. Reddy, M. A. Morales, D. L. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, *Molecular Pharmaceutics* **2008**, 5, 316.
- [60] W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke, J. r. Seitz, W. Scymczak, A. Wenk, P. Mayer, S. Takenaka, G. Oberdoerster, *Inhalation Toxicol.* **2009**, 21, 55.
- [61] D. B. Warheit, T. R. Webb, K. L. Reed, S. Frerichs, C. M. Sayes, *Toxicology* **2007**, 230, 90.

- [62] J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere, *Toxicol. Sci* **2006**, *91*, 159.
- [63] D. D. Stark, R. Weissleder, G. Elizondo, P. F. Hahn, S. Saini, L. E. Todd, J. Wittenberg, J. T. Ferrucci, *Radiology* **1988**, *168*, 297.
- [64] R. Weissleder, P. F. Hahn, D. D. Stark, G. Elizondo, S. Saini, L. E. Todd, J. Wittenberg, J. T. Ferrucci, *Radiology* **1988**, *169*, 399.
- [65] R. E. Rosensweig, Ferrohydrodynamics, Dover Publications, inc., N.Y, **1997**.
- [66] S. Elmore, *Physical Review* **1938**, *54*, 309.
- [67] S. Papell, in *US Patent 3 3.215.572*, **1965**.
- [68] A. H. Lu, E. L. Salabas, F. Schueth, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 1222.
- [69] S. Sun, C. B. Murray, D. Weller, L. Folks, A. Moser, *Vol. 287*, **2000**, pp. 1989.
- [70] E. V. Shevchenko, D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 13958.
- [71] G. W. R. S.E. Khallafalla, in *US Patent, Vol. 3.764.540*, **1973**.
- [72] R. Massart, *IEEE Transactions on Magnetics* **1981**, *17*, 1247.
- [73] E. Auzans, Université Pierre et Marie Curie, Paris (Frankreich), **1999**.
- [74] E. Auzans, D. Zins, E. Blums, R. Massart, *Journal of Materials Science* **1999**, *34*, 1253.
- [75] F. Meyer, Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, **2000**.
- [76] S. H. Sun, H. Zeng, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 8204.
- [77] S. H. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, G. X. Li, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 273.
- [78] D. Farrell, S. A. Majetich, J. P. Wilcoxon, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 11022.
- [79] N. R. Jana, Y. F. Chen, X. G. Peng, *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 3931.
- [80] A. C. S. Samia, K. Hyzer, J. A. Schlueter, C. J. Qin, J. S. Jiang, S. D. Bader, X. M. Lin, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 4126.
- [81] Y. Li, M. Afzaal, P. O'Brien, *Journal of Materials Chemistry* **2006**, *16*, 2175.
- [82] X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, Y. Li, *Nature* **2005**, *437*, 121.
- [83] S. Odenbach, *Magnetic fluids, Vol. 71*, Springer Berlin / Heidelberg, **2002**.
- [84] S. Odenbach, *Magnetoviscous effects in ferrofluids*, Springer, **2002**.
- [85] Müller, *Anorganische Strukturchemie, Vol. 4. Auflage*, Teubner Studienbücher Chemie, **2004**.
- [86] E. Riedel, *Anorganische Chemie, Vol. 3*, de Gruyter, Berlin, N.Y, **1994**.
- [87] D. Meschede, *Gerthsen Physik*, 21. völlig überarbeitete Auflage, Springer, Germany, **2002**.

- [88] P. A. Atkins, *Physikalische Chemie, Vol. 3*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, **2001**.
- [89] S. Chikazumi, S. Taketomi, M. Ukita, M. Mizukami, H. Miyajima, M. Setogawa, Y. Kurihara, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1987**, 65, 245.
- [90] H. Lueken, *Magnetochemie*, Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart, **1999**.
- [91] C. Kittel, *Introduction to solid state physics*, Wiley, **2005**.
- [92] E. Rezlescu, N. Rezlescu, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, 193, 501.
- [93] W. Heisenberg, *Institut für theoretische Physik der Universität, Leipzig* **1928**, 619.
- [94] V. Schultze, Germany, **1997**,
www.anphy.uni-duesseldorf.de/veroff/Diplome/Volker.Solinus/node3.phtml.
- [95] M. Franzreb, *Magnettechnologie in der Verfahrenstechnik wässriger Medien*, Forschungszentrum Karlsruhe, **2003**.
- [96] C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *Journal of Physics D-Applied Physics* **2003**, 36, R198.
- [97] R. Hiergeist, W. Andra, N. Buske, R. Hergt, I. Hilger, U. Richter, W. Kaiser, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, 201, 420.
- [98] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, P. Veverka, G. Goglio, A. Demourgues, J. Portier, E. Pollert, E. Duguet, *Progress in Solid State Chemistry* **2006**, 34, 237.
- [99] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fahling, J. Krause, W. Wlodarczyk, B. Sander, T. Vogl, R. Felix, *International Journal of Hyperthermia* **1997**, 13, 587.
- [100] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Schirra, S. Thomas, H. Schmidt, R. Felix, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, 194, 185.
- [101] A. Jordan, P. Wust, H. Fahling, W. John, A. Hinz, R. Felix, *International Journal of Hyperthermia* **1993**, 9, 51.
- [102] A. Jordan, P. Wust, R. Scholz, B. Tesche, H. Fahling, T. Mitrovics, T. Vogl, J. CervosNavarro, R. Felix, *International Journal of Hyperthermia* **1996**, 12, 705.
- [103] C. Sun, J. S. H. Lee, M. Zhang, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, 60, 1252.
- [104] J. P. Fortin-Ripoche, M. S. Martina, F. Gazeau, C. Menager, C. Wilhelm, J. C. Bacri, S. Lesieur, O. Clement, *Radiology* **2006**, 239, 415.
- [105] B. R. Jarrett, M. Frendo, J. Vogan, A. Y. Louie, *Nanotechnology* **2007**, 18.
- [106] N. Kohler, C. Sun, A. Fichtenholtz, J. Gunn, C. Fang, M. Q. Zhang, *Small* **2006**, 2, 785.
- [107] B. A. Schueler, T. B. Parrish, J. C. Lin, B. E. Hammer, B. J. Pangrle, E. R. Ritenour, J. Kucharczyk, C. L. Truwit, *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **1999**, 9, 596.
- [108] J. Weaver, A. Rauwerdink, C. Sullivan, I. Baker, *Medical Physics* **2007**, 34, 2361.
- [109] Y. H. Xu, H. M. Bai, J. P. Wang, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, 311, 131.
- [110] J. P. Hornak, Copyright © **1996-2008**; <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/>.

- [111] G. Decher, *Science* **1997**, *277*, 1232.
- [112] G. Decher, J.-D. Hong, *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia* **1991**, *46*, 321.
- [113] E. Seyrek, G. Decher, in *Layer-by-layer assembly for multifunctional hybrid materials and nanoscale devices, Comprehensive Polymer Science, 2nd ed.*, **2011**, p. in press.
- [114] T. Serizawa, S. Kamimura, N. Kawanishi, M. Akashi, *Langmuir* **2002**, *18*, 8381.
- [115] H. Zhang, Z. Wang, Y. Zhang, X. Zhang, *Langmuir* **2004**, *20*, 9366.
- [116] G. K. Such, A. P. R. Johnston, F. Caruso, *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 19.
- [117] J. H. Rouse, P. T. Lillehei, J. Sanderson, E. J. Siochi, *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 3904.
- [118] Y. Zhang, W. Cao, *Langmuir* **2001**, *17*, 5021.
- [119] T. Serizawa, Y. Nagasaka, H. Matsuno, M. Shimoyama, K. Kurita, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18*, 355.
- [120] F. Boulmedais, V. Ball, P. Schwinte, B. Frisch, P. Schaaf, J.-C. Voegel, *Langmuir* **2002**, *19*, 440.
- [121] B. Schoeler, E. Poptoshev, F. Caruso, *Macromolecules* **2003**, *36*, 5258.
- [122] S. S. Shiratori, M. F. Rubner, *Macromolecules* **2000**, *33*, 4213.
- [123] G. Ladam, P. Schaad, J. C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher, F. Cuisinier, *Langmuir* **1999**, *16*, 1249.
- [124] R. A. McAloney, M. Sinyor, V. Dudnik, M. C. Goh, *Langmuir* **2001**, *17*, 6655.
- [125] J. B. Schlenoff, S. T. Dubas, *Macromolecules* **2001**, *34*, 592.
- [126] V. Maheshwari, R. F. Saraf, *Science* **2006**, *312*, 1501.
- [127] A. A. Antipov, G. B. Sukhorukov, Y. A. Fedutik, J. Hartmann, M. Giersig, H. Moehwald, *Langmuir* **2002**, *18*, 6687.
- [128] W. S. Choi, H. Y. Koo, J.-H. Park, D.-Y. Kim, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 16136.
- [129] S. Joly, R. Kane, L. Radzilowski, T. Wang, A. Wu, R. E. Cohen, E. L. Thomas, M. F. Rubner, *Langmuir* **1999**, *16*, 1354.
- [130] K. S. Mayya, D. I. Gittins, F. Caruso, *Chemistry of Materials* **2001**, *13*, 3833.
- [131] D. Wang, F. Caruso, *Chemistry of Materials* **2002**, *14*, 1909.
- [132] K. T. Nam, D.-W. Kim, P. J. Yoo, C.-Y. Chiang, N. Meethong, P. T. Hammond, Y.-M. Chiang, A. M. Belcher, *Science* **2006**, *312*, 885.
- [133] J. L. Lutkenhaus, P. T. Hammond, *Soft Matter* **2007**, *3*, 804.
- [134] A. D. Taylor, M. Michel, R. C. Sekol, J. M. Kizuka, N. A. Kotov, L. T. Thompson, *Advanced Functional Materials* **2008**, *18*, 3003.
- [135] H. Xu, S. Melle, K. Golemanov, G. Fuller, *Langmuir* **2005**, *21*, 10016.

- [136] Y. Su, W. Huang, R. Hu, H. Ding, K. Hu, *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 2665.
- [137] Z. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo, N. A. Kotov, *Advanced Materials* **2006**, *18*, 3203.
- [138] S.-F. Chong, A. Sexton, R. De Rose, S. J. Kent, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5178.
- [139] X. Zhang, K. K. Sharma, M. Boeglin, J. Ogier, D. Mainard, J.-C. Voegel, Y. Mély, N. Benkirane-Jessel, *Nano Letters* **2008**, *8*, 2432.
- [140] B.-S. Kim, S. W. Park, P. T. Hammond, *ACS Nano* **2008**, *2*, 386.
- [141] B. Thierry, F. Al-Ejeh, A. Khatri, Z. Yuan, P. J. Russell, S. Ping, M. P. Brown, P. Majewski, *Chemical Communications* **2009**, 7348.
- [142] J. W. Cui, Y. J. Wang, A. Postma, J. C. Hao, L. Hosta-Rigau, F. Caruso, *Advanced Functional Materials* **2010**, *20*, 1625.
- [143] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, C. W. Brown, *Introductory Raman spectroscopy*, Academic Press, **2003**.
- [144] J. M. Hollas, *Modern spectroscopy*, J. Wiley, **2004**.
- [145] G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*, Wiley, **2004**.
- [146] M. Schmitt, Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, **2009**.
- [147] A. Smekal, *Die Naturwissenschaften* **1923**, *11*, 873.
- [148] C. V. Raman, *Ind. J. Phys.* **1928**, *2*, p. 387.
- [149] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, **2004**.
- [150] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 3, Springer, **2006**.
- [151] L. Edman, *Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 6165.
- [152] K. Hasler, O. Panke, W. Junge, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13759.
- [153] S. T. Hess, S. H. Huang, A. A. Heikal, W. W. Webb, *Biochemistry* **2002**, *41*, 697.
- [154] U. Kettling, A. Koltermann, P. Schwille, M. Eigen, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 1416.
- [155] A. Koltermann, U. Kettling, J. Bieschke, T. Winkler, M. Eigen, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 1421.
- [156] H. Qian, *Biophysical Chemistry* **1990**, *38*, 49.
- [157] J. Schuler, J. Frank, U. Trier, M. Schafer-Korting, W. A. Saenger, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8402.
- [158] A. Gennerich, Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen, **2003**.
- [159] E. Haustein, P. Schwille, *Current Opinion in Structural Biology* **2004**, *14*, 531.
- [160] G. Jung, in *FORMATEX, Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, Vol. 2: 855-862, **2007**.

- [161] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, P. Kask, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **1993**, 22, 169.
- [162] P. Schulle, *Cell Biochemistry and Biophysics* **2001**, 34, 383.
- [163] J. Widengren, U. Mets, R. Rigler, *Chemical Physics* **1999**, 250, 171.
- [164] U. Sack, A. Tárnok, G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Karger, **2006**.
- [165] L. A. Herzenberg, D. Parks, B. Sahaf, O. Perez, M. Roederer, L. A. Herzenberg, *Clinical Chemistry* **2002**, 48, 1819.
- [166] R. H. Mueller, G. E. Hildebrand, *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis : Einführung in die Theorie Praktische Messdurchführung Dateninterpretation : Colloidal Drug Carriers 1st Expert Meeting, Berlin 15.-17. 6. 1995*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, **1996**.
- [167] I. Skornyakov, V. Komar, *Journal of Applied Spectroscopy* **1996**, 63, 309.
- [168] R. Schulte-Ladbeck, R. Lindahl, J. O. Levin, U. Karst, *Journal of Environmental Monitoring* **2001**, 3, 306.
- [169] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, Spektrum Akad. Verl., **2004**.
- [170] J. M. Lee, H. H. L. Edwards, C. A. Pereira, S. I. Samii, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **1996**, 7, 531.
- [171] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chemical Reviews* **2008**, 108, 2064.
- [172] R. Haag, F. Kratz, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 1198.
- [173] B. Valeur, *Molecular fluorescence: principles and applications*, Wiley-VCH, **2002**.
- [174] T. Cosgrove, *Colloid science: principles, methods and applications*, Blackwell Pub., **2005**.
- [175] S. Zhang, Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu, Z. Li, *Journal of Controlled Release* **2004**, 100, 165.
- [176] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *PNAS* **1995**, 92, 7297.
- [177] H. A. Staab, T. Saupe, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1988**, 27, 865.
- [178] N. D. Sonawane, F. C. Szoka, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 44826.
- [179] B. Sahoo, S. K. Sahu, P. Pramanik, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, 95.
- [180] J. Kapuscinski, *Biotechnic & Histochemistry* **1995**, 70, 220.
- [181] Q. Lian, E.-M. Prinz, M. Schnabel, R. Hempelmann, G. Wenz, B. Loretz, M. Schneider, "Smart amphiphilic polyester leading to switchable fabrication of

- surfactant-free hydrophobic/ hydrophilic magnetic materials loaded nanoparticles.*" (in Bearbeitung) **2011**.
- [182] Q. Lian, E.-M. Prinz, M. Schnabel, R. Hempelmann, G. Wenz, C. Lehr, B. Loretz, M. Schneider, „*Near-infrared Light-triggered Drug Release of Idarubicin from Multifunctional Magnetic Nanoparticles.*" (in Bearbeitung) **2011**.
- [183] K. Wagner, A. Kautz, M. Roder, M. Schwalbe, K. Pachmann, J. H. Clement, M. Schnabelrauch, *Applied Organometallic Chemistry* **2004**, 18, 514.

9.8 VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONFERENZBEITRÄGE

9.8.1 WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

- 1) E.-M. Prinz, R. Eggers, U. Steinfeld, H.-H. Lee, R. Hempelmann, Synthesis of drug loaded magnetic nanoparticles and their uptake into immune cells, **2010** J. Phys.: Conf. Ser. 200 122009.
- 2) E.-M. Prinz, R. Eggers, H.-H. Lee, U. Steinfeld, R. Hempelmann, Biomedical Functionalization of Magnetic Nanoparticles and their uptake into T lymphocytes, **2010** European Cells and Materials, Vol. 20, Suppl. 3, 207, ISSN 1473-2262.
- 3) M. Marengo, F. Bonomi, S. Iametti, E. Prinz, R. Hempelmann, H. Frokiaer, Recognition and uptake of nanoparticle-conjugated food allergens by human monocytes, **2011**, *FEBS JOURNAL*, 278, Suppl. 1, 439-439.
- 4) M. Marengo, F. Bonomi, S. Iametti, E. Prinz, R. Hempelmann, H. Frokiaer, Recognition and uptake of free and nanoparticle-bound betalactoglobulin - food allergens - by human monocytes. (eingereicht und akzeptiert bei Journal Molecular Nutrition and Food Research)
- 5) X. Le Guével, E. Prinz, R. Müller, R. Hempelmann, M. Schneider, Synthesis and characterization of superparamagnetic nanoparticles coated with fluorescent gold nanoclusters. (eingereicht bei Journal of Nanoparticles Research)
- 6) Q. Lian, E.-M. Prinz, M. Schnabel, R. Hempelmann, G. Wenz, C. Lehr, B. Loretz, M. Schneider, Smart amphiphilic polyester leading to switchable fabrication of surfactant-free hydrophobic/ hydrophilic magnetic materials loaded nanoparticles. (in Bearbeitung)
- 7) Q. Lian, E.-M. Prinz, M. Schnabel, R. Hempelmann, G. Wenz, C. Lehr, B. Loretz, M. Schneider, Near-infrared Light-triggered Drug Release of Idarubicin from Multifunctional Magnetic Nanoparticles. (in Bearbeitung)
- 8) E.-M. Prinz, R. Eggers, H.-H. Lee, U. Steinfeld, R. Hempelmann, Synthesis of Doxorubicin loaded magnetic nanoparticles and their uptake into T-lymphocytes. (in Bearbeitung)
- 9) E.-M. Prinz, R. Szamocki, R. Hempelmann, Synthesis and characterization of layer-by-layer composition of nanoparticles coated with doxorubicin for Drug-Delivery applications. (in Bearbeitung)
- 10) E.-M. Prinz, R. Hempelmann, Synthesis of fluorescence dye loaded bisphosphonate coated magnetic nanoparticles for Drug-Delivery applications. (in Bearbeitung)

9.8.2 KONFERENZBEITRÄGE

Vorträge

- 1) E.-M. Prinz, K. Kochinke, H. Hohmann, H.-H. Lee, U. Steinfeld, R. Hempelmann, Biomedical Functionalisation of Magnetic Nanoparticles, Ferrofluid Workshop 2008 in Mainz.
- 2) E.-M. Prinz, K. Kochinke, H. Hohmann, H.-H. Lee, U. Steinfeld, R. Hempelmann, Ferrofluid Rundgespräch 2008 in Benediktbeuern.
- 3) E.-M. Prinz, R. Eggers, H.-H. Lee, U. Steinfeld, R. Hempelmann, Synthesis of drug loaded magnetic nanoparticles and their uptake into immune cells, International Conference on Magnetism (ICM) 2009 in Karlsruhe.
- 4) T. Krämer, K. Ettmüller, E.-M. Prinz, H.-J. Maurer, J. Wilske, Roadside drug testing in oral fluid-the Saarland experience, 44th International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2006 in Ljubljana, Slovenien.

Posterbeiträge

- 1) M. Marengo, F. Bonomi, M. Miriani, S. Cosentino, A. Ferraretto, E. Prinz, R. Hempelmann, Conjugates between food proteins and magnetic nanoparticles: production and properties, 53rd National Meeting of Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology 2008 in Riccione, Italien.
- 2) E.-M. Prinz, R. Eggers, H.-H. Lee, U. Steinfeld, R. Hempelmann, Synthese von wirkstoffbeladenen magnetischen Nanopartikeln sowie ihre Aufnahme in die T-Zellen, 108. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie e. V. in Köln 2009.
- 3) E.-M. Prinz, R. Eggers, H.-H. Lee, U. Steinfeld, R. Hempelmann, Biomedical Functionalization of Magnetic Nanoparticles and their uptake into T lymphocytes, 3rd International NanoBio Conference 2010 in Zürich, Schweiz.
- 4) M. Marengo, M. Miriani, A. Ferraretto, F. Bonomi, E. Prinz, R. Hempelmann, H. Frokiae, Recognition and uptake of nanoparticle-conjugated food allergens by human monocytes, Biocompatible magnetic nanoparticles for protein cellular targeting, 55 National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology 2010 Mailand, Italien.
- 5) E.-M. Prinz, X. Le Guével, R. Müller, R. Szamocki, M. Schneider, R. Hempelmann, Fluorescence marked magnetic nanoparticles as multifunctional nanocarriers for drug delivery applications, International LbL Symposium 2011 in Straßburg, Frankreich.

6) Q. Lian, E.-M. Prinz, M. Schnabel, R. Hempelmann, G. Wenz, C. Lehr, B. Loretz, M. Schneider, Multifunctional Magnetic Idarubicin-Loaded Nanoparticles for Magnetically Guided and Improved Drug Delivery, 3rd European Science Foundation Summer School Nanomedicine 2011 in Wittenberg.

