



1 EINLEITUNG

Die Erhaltung der Gesundheit ist eine permanente Herausforderung, mit der sich der Mensch und heutzutage auch immer stärker die Gesellschaft auseinandersetzt. Die Bewältigung dieser Herausforderung ist die Kernaufgabe der Medizin, die durch Verbesserung der Lebensqualität gesellschaftliche Haltungen und Strukturen maßgeblich beeinflusst. Dank dem technischen Progress konnte die Medizin in den letzten Jahrzehnten riesige Fortschritte erzielen. Die Entwicklung von sowohl hochauflösenden bildgebenden als auch hochpräzisen analytischen Verfahren ermöglichte einen Einblick in Strukturen und Mechanismen auf zellulärer Ebene und trug auf diese Weise zu einem besseren Verständnis von Krankheitsursachen, -abläufen und Einflussfaktoren bei. Anhand dieser Erkenntnisse konnten neue, effektivere Medikamente, Diagnose- und Therapieverfahren entwickelt und verbessert werden.

Der Zugang zur Beobachtung und Analyse von biologischen Prozessen auf mikroskopischer Ebene führte zum natürlichen Verlangen nach einer bedarfsgerechten Steuerung dieser Prozesse, um beispielsweise in Form einer Therapie Krankheitsursachen gezielt und hochselektiv bekämpfen zu können. Auf dieser Grundlage konnte sich die sogenannte Nanomedizin zuerst als neues Forschungsgebiet entwickeln und anschließend sich als vielversprechende Richtung in der modernen Medizin etablieren. Das Spielfeld der Nanomedizin ist gemäß der Arbeitsgruppe Nanomedizin (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) definiert als „[...] die Anwendung von meist synthetisch hergestellten Stoffen und Strukturen, die bedingt durch ihre Größe ($< 100\text{ nm}$) über neue spezifische Eigenschaften verfügen und die für medizinische Zwecke wie Diagnose und Behandlung von Krankheiten im Sinne des Arzneimittelgesetzes bzw. des Medizinproduktegesetzes bestimmt sind.“^[1]

Die Entwicklung von nanoskaligen Verbindungen zur medizinischen Anwendung ist durch die erwarteten Vorteile einer solchen Therapie gegenüber dem Einsatz freier Wirkstoffe motiviert. Dazu gehört in erster Linie die Möglichkeit, eine hohe Wirkstoffbeladung aufzunehmen und diese in geschützter Form durch den Körper zu bewegen. Auf diese Weise kann zum einen die Zersetzung der Wirkstoffe im biologischen Medium vermieden und zum anderen die Verweilzeit der Wirkstoffe im Körper signifikant erhöht werden.^[2] Außerdem ermöglicht der Einsatz nanoskaliger Verbindungen die Umsetzung einer multimodalen Behandlung. Diese kann sowohl aus einer Kombination mehrerer therapeutischer Wirkstoffe als auch aus einer Kombination von therapeutischen und bildgebenden Verfahren bestehen.

Erste Schritte zum Einsatz von nanoskaligen Transportsystemen für eine medizinische Anwendung sind aus den Arbeiten von Khanna und Speiser (1969) bekannt.^[3,4] Hierbei wurden Impfstoffe in Nanokapseln aus Polyacrylamid erst oral, später aber auch intravenös, verabreicht. Die injizierten Nanokapseln sollten dauerhaft im Blut zirkulieren und langsam den Impfstoff freisetzen. Auf diese Weise wurde versucht die Notwendigkeit mehrfacher Injektionen, die bei Impfungen gegen Tetanus, Diphtherie und andere Infektionen erforderlich sind, zu umgehen.^[5] Auf Basis dieser Arbeiten wurde zuerst in der Gruppe von Speiser, später aber auch in anderen Forschungsgruppen, ein rasanter Entwicklungsprozess von neuen Materialkonzepten für nanoskalige Wirkstoffträger eingeleitet.^[6] In diesem Zuge wurden auch weitere Vorteile und Einsatzmöglichkeiten für solche Verbindungen aufgedeckt. So wurden bereits im Jahre 1978 Nanopartikel aus denaturiertem Albumin vorgestellt, in die das Chemotherapeutikum Doxorubicin sowie magnetisches Fe_3O_4 eingelagert waren.^[7] An diesen Nanopartikeln konnte die Möglichkeit einer extern gesteuerten Anreicherung in einem definierten Teil des Organismus aufgezeigt werden, die zu einer ortsselektiven therapeutischen Wirkung geführt hat.

Der Vorteil einer selektiven Anreicherung kann jedoch auch ohne einen externen Eingriff erfolgen. Hierbei wird zwischen einem passiven und einem aktiven Prozess unterschieden. Eine passive Anreicherung kann beispielsweise bei einer erhöhten Permeabilität der Blutgefäßwände erfolgen, wie sie in entzündetem Gewebe und in Tumoren beobachtet wird.^[8,9] So resultiert die schnelle Proliferation von Tumorgewebe, die einer ständigen Zufuhr an Nährstoffen bedarf, in einer mangelhaften Struktur des neu aufgebauten vaskulären Systems. Die Blutgefäßwände weisen größere Fenestrierungen auf, durch die Makromoleküle (> 40 kDa) und nanoskalige Partikel in das Gewebe eintreten können.^[9] Da das Tumorgewebe weiterhin durch eine schlechte Effizienz des lymphatischen Systems gekennzeichnet ist, können diese Makromoleküle und Nanopartikel nicht aus dem Tumorgewebe abtransportiert werden und es erfolgt eine lokale Anreicherung. Dieses Phänomen ist als der EPR-Effekt bekannt (engl.: *Enhanced Permeability and Retention*).^[9,10]

Eine aktive Anreicherung von Nanopartikeln in bestimmten Zelltypen kann über eine gezielte Ansteuerung von zellspezifischen Rezeptoren erfolgen (*Drug Targeting*). Die Oberfläche der Nanopartikel muss hierfür mit entsprechenden Liganden modifiziert sein (z.B. Antikörper, Peptide, Folat-Analoga).^[11–13] Weiterhin können Beschichtungen mit Substanzen, die in molekularer Form von Zellen vermehrt aufgenommen und verwertet werden, zu einer Steigerung der Aufnahme rate führen (z.B. Albumin, Mono- und Polysaccharide).^[14–16]



Dieser Prozess ist jedoch weniger selektiv und lässt sich primär an Tumorzellen aufgrund deren erhöhten Energiebedarfs anwenden.

Die Nanopartikel, die sich auf die beschriebene Art und Weise lokal anreichern lassen, können sowohl therapeutische als auch bildgebende Eigenschaften haben. Zu bildgebenden Verfahren, die auf Basis von Nanopartikeln angewendet werden können, gehören die Magnetresonanztomographie (MRT) und die optische Bildgebung. Magnetische Eigenschaften, auf denen der Einsatz von Nanopartikel als MRT-Kontrastmittel basiert, können beispielsweise durch den Einbau von paramagnetischem Gadolinium oder durch die Einlagerung von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (engl.: *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*, SPIONs) erreicht werden.^[17,18] Für die optische Bildgebung werden Fluoreszenzmarker eingesetzt. Hierbei handelt es sich meist um organische Fluoreszenzfarbstoffe oder anorganische fluoreszierende Nanopartikel (z.B. CdTe und CdSe Q-Dots).^[19,20]

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert bereits eine Vielzahl an erfolgreich demonstrierten Materialkonzepten für Nanopartikel, die eine simultane Therapie und Diagnostik ermöglichen und somit dem Bereich der Theranostik zugeordnet werden können. Zu diesen gehören mesoporöse Silica-Nanopartikel,^[21] Metall- und Metalloxid-Nanopartikel (z.B. Au-Nanopartikel, SPIONs),^[22–24] Kohlenstoff-Nanoröhren,^[25] Polymer-Nanopartikel,^[26] Liposome und Dendrimere.^[27–29] Die funktionelle Beladung ist hierbei entweder innerhalb der Nanopartikel eingeschlossen oder auf der Oberfläche immobilisiert.^[30–33] Ebenso kann das Trägermaterial über eine funktionelle Eigenschaft verfügen und wie im Falle von SPIONs zur therapeutischen und/oder bildgebenden Wirkung der Partikel beitragen.

Die vorgestellten Nanopartikelkonzepte erlauben jedoch nur einen verhältnismäßig geringen Wirkstoffanteil im Vergleich zum Anteil des Trägermaterials. So liegt dieser für mesoporöse Siliziumdioxid-Nanopartikel (MSNP) und Polymer-Nanopartikel in der Regel unter 10 Gew.-%.^[15,34,35] Da die Effizienz einer nanopartikelbasierten Wirkstoffanreicherung in direkter Korrelation mit dem Beladungsgrad steht, bietet es sich an, Materialkonzepte zu entwickeln, die dieser Anforderung gerecht werden können. Einen Ansatz hierfür bietet mit 70 – 90 Gew.-% funktioneller Beladung das Konzept der anorganisch-organischen Hybridnanopartikel.^[35,36] Es handelt sich um nanoskalige Verbindungen mit einer salzartigen Zusammensetzung aus anorganischen Kationen und funktionellen organischen Anionen. Die Herstellung erfolgt über eine einfache, meist wasserbasierte Synthese, die sich positiv auf die Biokompatibilität der Hybridnanopartikel auswirkt.

Erste Verbindungen nach diesem Materialkonzept wurden von Roming *et al.* unter Einsatz von $[\text{ZrO}]^{2+}$ -Kationen und funktionellen Organophosphatanionen $[\text{R}_{\text{Funktion}}\text{-O-PO}_3]^{2-}$ hergestellt.^[37] Im weiteren Entwicklungsverlauf konnte von Poß *et al.* und Neumeier *et al.* die Anwendbarkeit dieses Materialkonzepts auch auf funktionelle organische Anionen mit Sulfonat- und Carboxylat-Gruppen übertragen werden.^[34,36,38] Um eine Schwerlöslichkeit in wässrigem Medium zu gewährleisten, musste hierbei auch das Kation variiert werden, sodass das Materialkonzept um Gd^{3+} -, La^{3+} -, Cu^{2+} - und Ag^+ -Kationen erweitert wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Hybridnanopartikel weisen eine entzündungshemmende, antibakterielle oder chemotherapeutische Wirkung auf oder können aufgrund eingebauter Fluoreszenzfarbstoffe zur optischen Bildgebung eingesetzt werden.^[35,39,40] Weiterhin ist in der Arbeit von Poß *et al.* die Möglichkeit aufgezeigt worden, Hybridnanopartikel als MRT-Kontrastmittel einzusetzen.^[41]

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und Charakterisierung von neuartigen anorganisch-organische Hybridnanopartikeln auf Basis von Gd^{3+} - und $[\text{ZrO}]^{2+}$ -Kationen, die aufgrund ihrer Wirkstoffbeladung in unterschiedlichen Bereichen von Biologie und Medizin eingesetzt werden können. Hierbei sollten auch neue Anwendungsgebiete, so wie die Behandlung viraler Erkrankungen, für Hybridnanopartikel erschlossen werden. Außerdem sollten Hybridnanopartikel entwickelt werden, die mehrere chemotherapeutischen, phototoxischen oder antibakteriellen Wirkstoffe kombinieren. Auf diese Weise sollte das vielversprechende Modell einer Kombinationstherapie mit mehreren Wirkstoffen auf anorganisch-organische Hybridnanopartikel übertragen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Modifizierung der hergestellten Hybridnanopartikel mit Fluoreszenzfarbstoffen, um die Detektierbarkeit der Hybridnanopartikel *in vitro*- und *in vivo*-Studien zu ermöglichen. Durch den Einsatz von Gd^{3+} als Kation sollte zudem ein Anschluss zwischen den bereits bekannten $[\text{GdO}]^+[\text{ICG}]^-$ -Hybridnanopartikeln, für die eine Anwendbarkeit als MRT-Kontrastmittel belegt werden konnte, und wirkstoffbeladenen Hybridnanopartikeln geknüpft werden. Solche Nanopartikel, die über therapeutische und bildgebende Eigenschaften verfügen, sind von besonderem Interesse für einen Einsatz in der Theranostik.



2 ANALYTISCHE METHODEN

2.1 Elektronenmikroskopie

Unter dem Auflösungsvermögen eines Mikroskops versteht man den minimalen Abstand zweier punktförmiger Objekte, bei dem diese getrennt wahrgenommen werden können. Für ein Lichtmikroskop wird das Auflösungsvermögen nach der Theorie von Ernst Abbé durch die Wellenlänge des Lichts λ und die numerische Apertur beschrieben. Die numerische Apertur definiert die Eigenschaft der Linse, Licht zu fokussieren. Dabei setzt sie sich aus dem Brechungsindex des Mediums n und dem halben Öffnungswinkel α aufseiten des Objekts zusammen.

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha} \quad (2.1)$$

Bei Wellenlängen des sichtbaren Lichts zwischen 380 und 780 nm liegt die Auflösungsgrenze damit bei etwa 0,2 μm . Da dies unzureichend ist, um nanoskalige Objekte zu untersuchen, wird hier auf mikroskopische Methoden mit hochenergetischen Elektronenstrahlen zurückgegriffen. Der Welle-Teilchen-Dualismus von Elektronen ermöglicht Strukturuntersuchungen bis in den Sub-Nanometerbereich. Die Wellenlänge der Elektronen steht dabei nach der De-Broglie-Gleichung in direktem Zusammenhang mit deren Bewegungsgeschwindigkeit.

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m_0 v} \quad (2.2)$$

h ist hierbei das Planck'sche Wirkungsquantum und p der Impuls des Teilchens, welcher sich aus seiner Ruhemasse m_0 und seiner Geschwindigkeit v zusammensetzt.

Der Elektronenstrahl bei mikroskopischen Messverfahren wird in der Regel durch thermische Anregung und Ladungsextraktion im elektrischen Spannungsfeld erzeugt. Die anschließende zielgerichtete Beschleunigung der Elektronen zur Probe erfolgt durch eine Loch-Anode, wobei über die Beschleunigungsspannung U_B die Geschwindigkeit der Elektronen mit der Elementarladung e und damit auch deren Wellenlänge reguliert wird. Der Zusammenhang zwischen diesen Größen wird über die beiden Formeln ersichtlich, mit denen die Energie des Elektrons beschrieben werden kann.

$$E_{el} = eU_B \quad (2.3)$$

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m_0 v^2 \quad (2.4)$$

Da in diesem Fall die elektrische Energie E_{el} , die sich aus U_B und der Elementarladung e zusammensetzt, der kinetischen Energie E_{kin} des Teilchens entspricht, können diese gleichgesetzt werden. Im Zusammenhang mit der De-Broglie-Gleichung kann damit die Abhängigkeit der Wellenlänge von der Beschleunigungsspannung folgendermaßen beschrieben werden:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0 e U_B}} \quad (2.5)$$

Diese Gleichung gilt jedoch nur für Elektronen mit einer Energie < 100 keV. Wenn sich die Geschwindigkeit des Elektrons der Lichtgeschwindigkeit c annähert, kann die Abweichung der relativistischen Masse m_{rel} von m_0 nicht mehr vernachlässigt werden.

$$m_{rel} = m_0 \cdot \frac{1}{\sqrt{1 - \left(\frac{v}{c}\right)^2}} \quad (2.6)$$

Mit dieser Erweiterung nimmt Gleichung (2.5) die folgende Form an:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0 e U_B \cdot \left(1 + \frac{e U_B}{2m_0 c^2}\right)}} \quad (2.7)$$

Dementsprechend beträgt beispielsweise die Wellenlänge von Elektronen in einem Transmissionselektronenmikroskop mit 200 kV Beschleunigungsspannung etwa 2,51 pm, sodass die theoretische Auflösungsgrenze im subatomaren Bereich liegt. Die auftretenden Störungen in Form von nicht-idealen Umgebungsbedingungen, Abbildungsfehlern des Linsensystems und energetischen Schwankungen wirken sich jedoch limitierend auf das Auflösungsvermögen des Geräts aus.

Grundsätzlich lässt sich die Elektronenmikroskopie in zwei unterschiedliche Messanordnungen unterteilen – Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (siehe Kapitel 2.1.1 und 2.1.2). Der Hauptunterschied dieser Verfahren liegt primär in der Detektion der Teilchen, welche nach der Wechselwirkung mit dem Elektronenstrahl aus der Materie austreten. Das Probenvolumen, in dem diese Interaktion stattfindet, wird als die Anregungsbirne bezeichnet. Trotz der unterschiedlichen Beschleunigungsspannungen (REM: etwa 1 - 30 kV, TEM: etwa 80 - 400 kV) stimmen die Prozesse, welche durch das Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe zustande kommen, für beide Verfahren überein. Wie in Abbildung 1 gezeigt, führt der Beschuss mit hochenergetischen Elektronen zur Freisetzung von Rückstreu-, Sekundär- und Auger-Elektronen (RE, SE, AE). Diese werden in der Rasterelektronenmikroskopie zur Bildgebung beziehungsweise in der Augerelektronenspektroskopie zur Untersuchung der

Oberflächenzusammensetzung verwendet werden. RE, SE und AE unterscheiden sich untereinander durch ihre Entstehungsart und damit verbunden durch ihre Energie. Rückstreuerelektronen sind elastisch zurückgestreute Elektronen des Primärstrahls, welche nur einen minimalen Energieverlust gegenüber den Primärelektronen aufweisen. Elektronen, welche durch Primärelektronen aus den Elektronenschalen der Atome herausgeschlagen wurden, werden als Sekundärelektronen bezeichnet. Ihre Energie ist kleiner als 50 eV. Die Auger-Elektronen entstehen in Folge von strahlungslosen Übergängen innerhalb der Elektronenhülle der Atome des untersuchten Materials und haben deswegen diskrete materialspezifische Energiewerte.^[42,43]

Für sehr dünne Proben und hohe Beschleunigungsspannungen kann ein Teil der Elektronen die Materialbarriere passieren. Diese transmittierten Elektronen werden zur Bildgebung in der Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt. Zusätzlich zu den oben genannten Prozessen wird Energie in Form von Kathodenlumineszenz und Röntgenstrahlung freigesetzt. Die letztere kann zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Probenzusammensetzung eingesetzt werden. Dieses separate Analyseverfahren wird in Kapitel 2.1.3 behandelt.

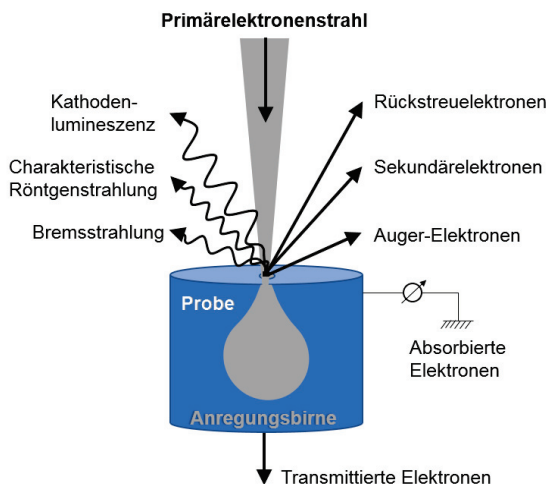


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen dem Primärelektronenstrahl und der Probe in einem Elektronenmikroskop (Abbildung modifiziert nach ^[44]).

2.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem die Oberfläche der Probe mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgerastert wird und die detektierten Sekundär- und Rückstreuelektronen pixelweise zu einem Gesamtbild der Probenoberfläche zusammengefügt werden.

Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops. Dieser besteht aus einer Elektronenquelle mit Beschleunigungsanode, einem Linsensystem zur Fokussierung des Elektronenstrahls, einem Probenträger und den Detektoren, welche oberhalb der Probe angebracht sind. Ein ebenfalls wichtiger Bestandteil des Mikroskops ist ein Vakuumsystem zur Gewährleistung eines Ultrahochvakuums (etwa 10^{-10} mbar) in der Mikroskopsäule. Auf diese Weise wird eine Streuung des Elektronenstrahls durch Wechselwirkung mit Gasmolekülen auf dem Weg zur Probe vermieden.

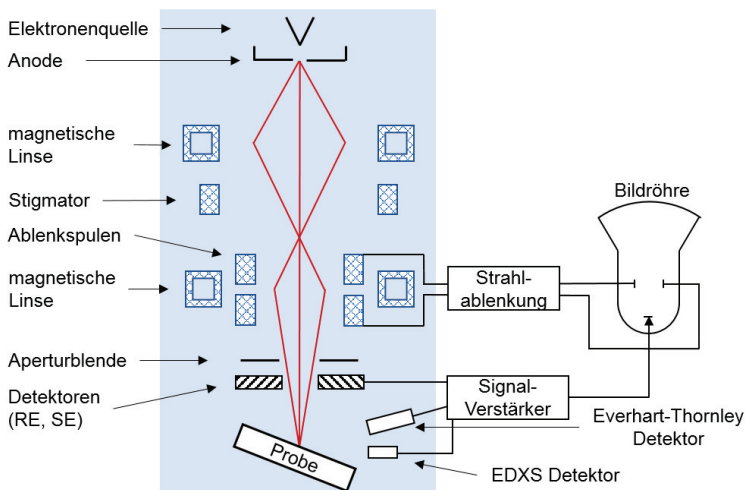


Abbildung 2. Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops.

Die meistgenutzte Informationsquelle für die Oberflächenabbildung in der Rasterelektronenmikroskopie sind die Sekundärelektronen. Bedingt durch ihre geringe Energie können nur oberflächennahe SE die Probe verlassen, sodass die erzeugten Bilder einen hohen topografischen Kontrast aufweisen. Detektiert werden Sekundärelektronen über den InLens-Detektor, welcher sich oberhalb der Probe befindet, sowie über den Everhart-Thornley-Detektor seitlich von der Probe. Über den Everhart-Thornley-Detektor können zudem auch Rückstreuelektronen abgefangen werden. Da mit zunehmender Ordnungszahl der



Atome in der Probe die Rückstreuung zunimmt, sind die aufgenommenen Bilder durch einen hohen Materialkontrast gekennzeichnet.^[42,43]

Für diese Arbeit wurde ein Supra 40VP Rasterelektronenmikroskop (CARL ZEISS, Oberkochen, Deutschland) mit einer ZrO_2/W -Feldemissionskathode (1800 K Betriebstemperatur) eingesetzt. Die REM-Bilder wurden bei 2 - 5 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen. Zur Detektion der Sekundärelektronen wurde hierbei ein InLens-Detektor mit einem Arbeitsabstand von 2 mm zur Probe verwendet. Zur Probenpräparation wurde ein Siliziumwafer mittels eines Ultraschallverneblers mit einer verdünnten, meist wässrigen Nanopartikelsuspension bedampft und bei Raumtemperatur getrocknet. Der Siliziumwafer wurde anschließend auf einen Aluminiumträger mit Leitsilber befestigt. Die Bestimmung der Größenverteilung der Partikel erfolgte anhand von einer statistischen Auszählung von mindestens 120 Partikeln mithilfe der ImageJ Software (Version 1.52p).

2.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Ähnlich zu einem Lichtmikroskop, ermöglicht die Transmissionselektronenmikroskopie eine direkte Abbildung von Objekten. Bei großer Beschleunigungsspannung, geringer Probendicke sowie hoher Ordnungszahl der Atome kann das Auflösungsvermögen bei diesem Verfahren sehr hoch sein und bis hin zur atomaren Ebene reichen. Wie in Kapitel 2.1 erläutert, liegt die theoretische Auflösungsgrenze eines Transmissionselektronenmikroskops im Pikometerbereich. Das Auflösungsvermögen wird jedoch durch Abbildungsfehler des Linsensystems, Schwankungen der Elektronenstrahlenergie und weitere Parameter eingeschränkt.

Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops. Dieser weist eine starke Ähnlichkeit mit einem Lichtmikroskop auf, wobei statt optischer Linsen elektromagnetische Linsen eingesetzt werden.

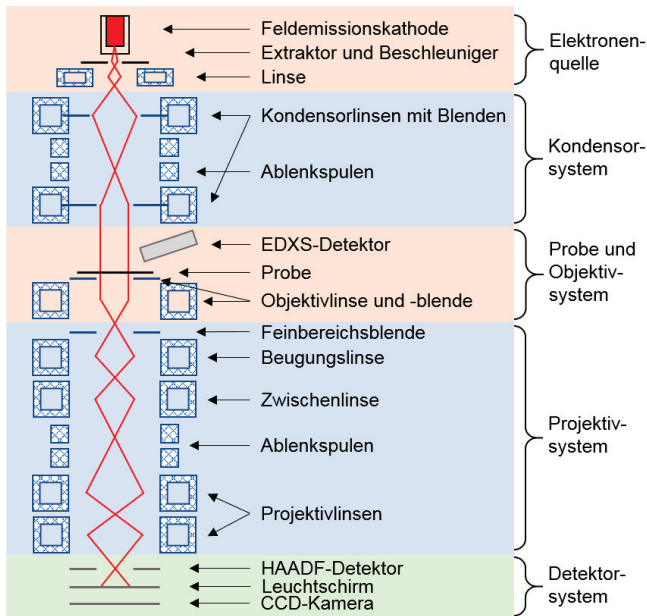


Abbildung 3. Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops.

Der obere Teil des Aufbaus – zwischen der Elektronenquelle und dem Probenträger – entspricht jenem eines Rasterelektronenmikroskops, wobei der Elektronenstrahl für TEM-Aufnahmen nicht fokussiert auf die Probe geleitet wird, sondern in Form von einem Zylinder mit parallel verlaufenden Elektronenwellen (siehe Abbildung 4a). Da bei diesem Verfahren die Bildgebung über transmittierte Elektronen erfolgt, wird die Detektion unterhalb vom Probenträger durchgeführt. Das Bild der Probe wird dabei zuerst durch ein Objektiv-Linsensystem in ein Zwischenbild überführt und anschließend durch das Projektiv-Linsensystem auf einen Leuchtschirm oder eine CCD-Kamera vergrößert. Unterschieden wird hier zwischen einer Hellfeld- (engl.: *Bright Field*, BF) und einer Dunkelfeld-Abbildung (engl.: *Dark Field*, DF). Bei Hellfeld-Detektion wird der Elektronenstrahl hinter der Probe mittels der Apertur-Blende auf nicht oder kaum abgelenkte Elektronen eingeschränkt. Somit erscheinen Bereiche mit geringer Probendicke oder kleinen Ordnungszahlen der Atome heller. Für das Dunkelfeld werden die gestreuten Strahlen für die Bildgebung genutzt, sodass das Kontrastverhältnis umgekehrt ist.