

Synthese, Charakterisierung und Wechselwirkung definierter Nanopartikel mit biologischen Systemen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Daniel Nordmeyer
aus Berlin

2015

Die Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2011 bis April 2015 am Institut für Chemie und Biochemie (Physikalische und Theoretische Chemie) der Freien Universität Berlin unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. E. Rühl und Frau Prof. Dr. C. Graf.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. E. Rühl
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. C. Graf

Disputation am: 31.07.2015

Kurzfassung

Der Marktanteil von kommerziell erhältlichen Produkten, die Nanopartikel enthalten, z.B. Sonnencremes, Zahnpasten, Textilien, Nuckel, Babyflaschen etc., ist in den letzten Jahren rasant angestiegen. Da die Auswirkungen von Nanopartikeln auf den menschlichen Organismus nicht abgeschätzt werden können, ist die Erforschung dieser Wechselwirkung von großem gesellschaftlichem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden offene Fragestellungen zur Bildung und Auflösung von Nanopartikeln und zur Wechselwirkung von Nanomaterialien mit humanen Zellen und humaner Haut diskutiert und beantwortet. Die drei grundlegenden Motivationen waren: erstens, die Erforschung, welche Nanopartikelmaterialien mit verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen bevorzugt in den Zellkern eindringen, zweitens, welche Nanopartikelform bevorzugt von verschiedenen Zellen aufgenommen werden, und drittens, in welche Schichten Nanopartikel der nativen und nicht-nativen Humanhaut penetrieren. Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse kurz präsentiert:

Der Zellkern ist die wichtigste subzelluläre Einheit, in der unter anderem die Duplizierung der DNA stattfindet. Mittels Cryo-Röntgenmikroskopie/-tomographie und Transmissionselektronenmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass Goldnanopartikel mit Citrat-Funktionalisierung mit einem Durchmesser von (60 ± 5) nm im Verhältnis zu Silicananopartikeln mit einem Durchmesser von (51 ± 2) nm und Goldnanopartikeln mit Silicaschale mit einem Durchmesser von (68 ± 8) nm in den Zellkern humaner Keratinozyten aufgenommen werden. Zudem führten Citrat-funktionalisierte Goldnanopartikel zu einer stärkeren Verminderung der Viabilität der Zellen im Vergleich zu Nanopartikeln mit Silanolatoberfläche (Silicananopartikel und Goldnanopartikel mit Silicaschale).

Silbernanopartikel werden aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften in zahlreichen Konsumprodukten eingesetzt, sodass eine intensive Wechselwirkung mit Menschen nicht ausgeschlossen werden kann. Silbernanopartikel sind bekannt für zytotoxische Effekte, die auf der Freisetzung von Silberionen in wässrigen Systemen beruhen. Mittels UV/VIS-Spektroskopie, Elektronenmikroskopie und Atomabsorptionsspektrometrie wurde die Auflösung von trigonalen Silbernanoprismen mit der Auflösung ihrer sphärischen Analoga in verschiedenen Medien verglichen. Dabei zeigte sich, dass Medien, die vergleichbar zum Zytoplasma sind, z.B. isotonische Kochsalzlösung (pH 7) und isotonischer Acetatpuffer (pH 4) im Verhältnis zu Reinstwasser (pH

7) oder Acetatpuffer (pH 4), die trigonalen Silbernanoprismen am stärksten anlösten. Sphärische Analoga wurden in diesen Medien stärker angelöst als trigonal-prismatische Silbernanopartikel.

Anschließend wurde die formabhängige Aufnahme von Silbernanopartikeln in humane Stammzellen und humane Keratinozyten untersucht. Mittels Atomabsorptionsspektrometrie und Transmissionselektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass trigonale Silbernanoprismen in deutlich höherer Quantität von Stammzellen aufgenommen wurden, während sphärische Silbernanopartikel in höherer Quantität von Keratinozyten aufgenommen wurden. Dieser Effekt wird der geringeren Biegesteifigkeit von humanen Stammzellen im Vergleich zu Keratinozyten zugesprochen. Aufgrund der erhöhten Elastizität kann es zu einer Vergrößerung der Adhäsionsenergie der trigonalen Prismen kommen, da die Verformung der Membran weniger Energie bedarf. In der Transmissionselektronenmikroskopie zeigte sich, dass sphärische Silbernanopartikel innerhalb von Zellen deutlich dichtere Aggregate bildeten als trigonale Silbernanoprismen. Mittels Rastertransmissionsröntgenmikroskopie konnten nur wenige trigonale Silbernanoprismen, aber zahlreiche Silbersphären in humanen Keratinozyten und Stammzellen nachgewiesen werden. Diese vermutete, unterschiedlich starke Aufnahme lässt sich durch die erhöhte Auflösung der trigonalen Silbernanoprismen im Verhältnis zu sphärischen Analoga innerhalb der Zelle erklären. Schließlich waren trigonale Silbernanoprismen mit einer ursprünglichen Kantenlänge von (42 ± 15) nm und einer Prismendicke von (8 ± 1) nm nach 24 h innerhalb der Zelle stark angelöst und haben einen Durchmesser von (7 ± 4) nm. Die sphärischen Nanopartikel mit einem ursprünglichen Durchmesser von (70 ± 25) nm wurden ebenfalls deutlich angelöst und haben einen Durchmesser von (13 ± 7) nm, sie bildeten allerdings verstärkt dicht gepackte Agglomerate in den Zellen. Somit konnten mittels Rastertransmissionsröntgenmikroskopie (Auflösung < 40 nm) die trigonalen Silbernanoprismen nicht nachgewiesen werden, während die deutlich dichter gepackten und größeren Silbersphären nachgewiesen werden konnten.

Die Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln in humane Haut ist ebenfalls von großem gesellschaftlichen Interesse, da vermutet wird, dass die Haut neben dem Darm und der Lunge die Haupteingangsrouten für Nanopartikel ist. Mit Silicananopartikeln inkubierte, exzidierte humane Haut wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Ein Nachteil dieser Analysetechnik ist, dass die Proben zunächst mit Glutaraldehyd und Paraformaldehyd fixiert und mit Ethanol entwässert werden. Bei

diesem Waschprozess ist es möglich, dass Nanopartikel aus der Haut gewaschen werden. Daher wurden Silicananopartikel mit einem Durchmesser von (55 ± 6) nm aminofunktionalisiert und die Quervernetzung mit den zur Fixierung verwendeten Aldehyden mittels dynamischer Lichtstreuung nachgewiesen, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass in der Haut die Auswaschung der Nanopartikel minimiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass in nicht-gestörter Haut keine Nanopartikel aufgenommen wurden. In Haut deren Barriere gestört ist, konnte nachgewiesen werden, dass aminofunktionalisierte Nanopartikel in der obersten Schicht der Haut, dem *Stratum corneum* und in darunter liegenden Hautschichten sowie innerhalb der Dermis gefunden werden konnten. Innerhalb der Dermis waren die aminofunktionalisierten Silicananopartikel sehr nahe an ein Strukturproteins (Kollagen) lokalisiert. Hierdurch kann eine Beeinträchtigung des Kollagens nicht ausgeschlossen werden.

Abstract

The market share of commercially available products containing nanoparticles, e.g. sun creams, toothpastes, textiles, pacifier, baby bottles, etc., has increased rapidly in recent years. Since the effects of nanoparticles on the human body cannot be estimated, research on this interaction is of great public interest. As part of this work, open questions concerning the formation and dissolution of nanoparticles and the interaction of nanomaterials with human cells and human skin were discussed and answered. The three basic motivations were: firstly, what nanoparticle materials with various surface modifications penetrate preferably in the cell nucleus, secondly, what nanoparticle shape is preferentially taken up by different cell types, and thirdly, in which layers of human skin can nanoparticles penetrate, where native and non-native skin samples investigated. In the following, the major results obtained from this work are presented: The nucleus is the most important subcellular unit in which duplication of DNA takes place. Cryo-X-ray microscopy/tomography and transmission electron microscopy studies indicate that gold nanoparticles with citrate-functionalization with a diameter of (60 ± 5) nm were taken up by the nucleus of human keratinocytes. This is not observed for silica nanoparticles with a diameter of (51 ± 2) nm and gold nanoparticles with a silica shell with a diameter of (68 ± 8) nm. In addition, the uptake of citrate-functionalized gold nanoparticles led to a reduction of the cell viability, as compared to the uptake of nanoparticles with a silanolate surface (silica nanoparticles and gold nanoparticles with silica shell).

Silver nanoparticles are used for their antimicrobial properties in numerous consumer products, so that the intense interaction with humans cannot be excluded. Silver nanoparticles are known for cytotoxic effects, which rely on the release of silver ions in aqueous media. Results from UV/VIS-spectroscopy, electron microscopy, and atomic absorption spectrometry are reported, where the dissolution of trigonal silver nanoprisms was compared to the dissolution of their spherical analogues in various media. It was found, that trigonal silver nanoprisms were strongest dissolved in media which are comparable to the cytoplasm, for example, isotonic saline (pH 7) and isotonic acetate buffer (pH 4), which is different from ultrapure water (pH 7) or acetate buffer (pH 4). Spherical analogues dissolved significantly stronger in these media compared to trigonal prismatic silver nanoparticles.

Subsequently, the shape-dependent uptake of silver nanoparticles in human stem cells and human keratinocytes was investigated. By means of atomic absorption spectrometry and transmission electron microscopy it could be shown that trigonal silver nanoprisms were taken up by stem cells in significantly higher quantity, whereas spherical silver nanoparticles were taken up in keratinocytes in higher quantity. This effect was attributed to the smaller bending stiffness of human stem cells as compared to keratinocytes. The increased elasticity could lead to a higher adhesion energy of the trigonal prisms, since the deformation of the membrane requires less energy. Transmission electron microscopy studies indicate that spherical silver nanoparticles form within cells significantly denser aggregates than trigonal silver nanoprisms. With scanning transmission X-ray microscopy few trigonal silver nanoprisms, but numerous silver spheres could be detected in human keratinocytes and stem cells. This implies that different uptake properties could be explained by the increased dissolution of the trigonal silver nanoprisms in relation to spherical analogues within cells. Finally, trigonal silver nanoprisms with an initial edge length of (42 ± 15) nm and a thickness of (8 ± 1) nm were investigated. It is shown that the uptaken particles were highly dissolved and had after 24 h a diameter of (7 ± 4) nm. The spherical nanoparticles with an initial diameter of (70 ± 25) nm were also significantly dissolved and had a final diameter of (13 ± 7) nm after 24 h. Particles resulting from shrinking processes of the originally spherical silver nanoparticles tended to form more dense and aggregated structures inside lysosomes and endosomes than those resulting from triangular prisms. This enabled the detection of trigonal silver nanoprisms by scanning transmission X-ray microscopy (resolution < 40 nm), so that the much larger and more densely packed silver spheres could be detected.

Studies on the uptake of nanoparticles into human skin is also of great public interest since skin is assumed to be the main entry route for nanoparticles besides the intestine and lung. Excised human skin that has been incubated with silica nanoparticles was studied by transmission electron microscopy. One disadvantage of this analysis technique is that the samples are fixed with glutaraldehyde and paraformaldehyde and dehydrated with ethanol. In this washing process, it is possible that nanoparticles are washed out from the skin. Therefore, the silica nanoparticles with a diameter of (55 ± 6) nm were amino-functionalized. The crosslinking of nanoparticles by aldehydes was used for fixing and the success of this process was proved by dynamic light scattering. This implies that washing out of amino-functionalized nanoparticles from the skin has

been minimized. Furthermore, it was shown that no nanoparticles were taken up by non-damaged skin. In skin barrier disrupted skin, however, it could be shown that amino-functionalized nanoparticles are found in the uppermost layer of the skin (*stratum corneum*), deeper epidermal layers, and within the dermis. Within the dermis, the amino-functionalized nanoparticles were localized close to a structural protein (collagen). Therefore degradation of collagen cannot be excluded.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	11
2.	Theoretische Grundlagen	13
2.1.	Nanopartikel	13
2.1.1.	Goldnanopartikel.....	14
2.1.1.1.	Optische Eigenschaften von Goldnanopartikeln	16
2.1.2.	Silbernanopartikel	17
2.1.3.	Silicananopartikel.....	21
2.2.	Humane Haut	24
2.3.	Zellsysteme	27
2.3.1.	Humane Keratinozyten	27
2.3.2.	Humane mesenchymale Stammzellen.....	27
2.4.	Wechselwirkung von Nanopartikeln mit biologischen Systemen	28
2.5.	Messmethoden.....	30
2.5.1.	Elektronenmikroskopie.....	30
2.5.2.	Dynamische Lichtstreuung.....	32
2.5.3.	Elektrophoretische Lichtstreuung.....	35
2.5.4.	Fluoreszenzmikroskopie	37
2.5.5.	Synchrotronstrahlung.....	39
2.5.6.	Röntgenmikroskopie	40
2.5.6.1.	Cryo-Röntgenmikroskopie/-tomographie und Rastertransmissionsröntgenmikroskop.....	43
2.5.6.2.	Berechnung eines Tomogramms.....	45
2.5.7.	Atomabsorptionsspektrometrie	49
2.5.8.	UV/VIS-Spektroskopie	50
3.	Experimentalteil.....	51
3.1.	Geräte, Methoden und Chemikalien.....	51
3.1.1.	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	51
3.1.2.	Geräte und Methoden	51
3.1.3.	Verwendete Chemikalien	55
3.2.	Darstellung von Nanopartikeln.....	57
3.2.1.	Darstellung von SiO ₂ -ummantelten Goldnanopartikeln.....	57
3.2.2.	Darstellung von AHAPS-funktionalisierten, fluoreszenzmarkierten SiO ₂ Nanopartikeln	58
3.2.2.1.	Synthese des Farbstoffkopplungsprodukts (FITC-APS)	58
3.2.2.2.	Synthese von fluoreszierenden SiO ₂ -Nanokernen (Stöber-Methode)	59
3.2.2.3.	Synthese von fluoreszierenden SiO ₂ -Nanokernen (Mikroemulsionsmethode)	59
3.2.2.4.	SiO ₂ -Ummantelung von fluoreszenzmarkierten SiO ₂ -Kernen	60
3.2.2.5.	AHAPS-Funktionalisierung von fluoreszenzmarkierten und SiO ₂ -ummantelten SiO ₂ -Kernen.....	60
3.2.3.	Darstellung von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie	61
3.3.	Präparation von humanen Keratinozyten mit Goldnanopartikeln für die Röntgenmikroskopie (BESSY II)	61
3.3.1.	Beschichtung der Goldnetzchen	61
3.3.2.	Inkubation von humanen Keratinozyten.....	62
3.3.3.	Cryo-Behandlung der inkubierten Goldnetzchen	63
3.3.4.	Bestimmung der Viskosität und des Brechungsindex von RPMI.....	63
3.4.	Präparation von humanen Keratinozyten mit Silicananopartikeln und Goldnanopartikeln für TEM	64

3.5.	Inkubation von humanen Keratinozyten mit Ag-Nanopartikeln für TEM und AAS	64
3.6.	Inkubation von humanen mesenchymalen Stammzellen mit trigonalen Ag-Nanoprismen und Ag-Nanosphären für TEM und AAS	66
3.7.	Inkubation von Humanhaut mit fluoreszierenden AHAPS-funktionalisierten SiO ₂ Nanopartikeln	66
4.	Ergebnisse und Diskussion	69
4.1.	Untersuchung der Aufnahme von Goldnanopartikeln, Goldnanopartikeln mit Silicaschale und Silicananopartikeln in den Zellkern humaner Keratinozyten	70
4.1.1.	Synthese und Charakterisierung des Farbstoffkopplungsprodukts	71
4.1.2.	Synthese und Charakterisierung SiO ₂ -ummantelter Goldnanopartikel und fluoreszierender SiO ₂ -Nanopartikel	73
4.1.3.	Untersuchung von humanen Keratinozyten mittels cryo-XM/T und TEM	91
4.1.3.1.	Untersuchung mittels cryo-XM/T	93
4.1.3.2.	Untersuchung der Aufnahme von Citrat-funktionalisierten Goldnanopartikeln in humane Keratinozyten	97
4.1.3.3.	Untersuchung der Aufnahme von Goldnanopartikeln mit einer 4 nm Silicaschale in humane Keratinozyten	101
4.1.3.4.	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung	105
4.1.3.5.	Untersuchung der Aufnahme von Silicananopartikel in humane Keratinozyten	105
4.1.3.6.	Untersuchung der Aufnahme von Goldnanopartikeln in humane Keratinozyten	110
4.2.	Untersuchung der Wechselwirkung von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie mit humanen Zellen	119
4.2.1.	Synthese und Charakterisierung von trigonalen Silbernanoprismen	120
4.2.2.	Auflösung von trigonalen Silbernanoprismen und Silbernanosphären	122
4.2.3.	Untersuchung der Aufnahme von trigonal-prismatischen und sphärischen Silbernanopartikeln in Zellen	137
4.2.3.1.	Untersuchung der qualitativen Aufnahme von trigonal-prismatischen und sphärischen Silbernanopartikeln mittels STXM ^[203]	139
4.2.3.2.	Untersuchung der qualitativen und semi-quantitativen Aufnahme von trigonal-prismatischen und sphärischen Silbernanopartikeln mittels TEM	142
4.2.3.3.	Untersuchung der quantitativen Aufnahme von Silbernanopartikeln mittels AAS	153
4.3.	Aufnahme von aminofunktionalisierten Silicananopartikeln in humane ex vivo-Haut	159
4.3.1.	Synthese und Charakterisierung von AHAPS-funktionalisierten SiO ₂ Nanopartikeln	160
4.3.2.	Untersuchung der Aufnahme von AHAPS-funktionalisierten SiO ₂ Nanopartikeln in humane ex vivo-Haut	163
5.	Zusammenfassung und Ausblick	171
6.	Literaturverzeichnis	174
7.	Anhang	182

1. Einleitung

Die Entwicklung von Nanopartikeln und Kolloiden kann unter dem Oberbegriff der Nanotechnologie, die sich mit Strukturen und Prozessen auf der Nanometerskala (10^{-9} m) beschäftigt, subsumiert werden. Durch die räumliche Verkleinerung der Ausdehnung von Nanopartikeln im Verhältnis zu analogen Festkörpern kommt es bei zahlreichen Substanzen zu erstaunlichen Änderungen der physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften. Hierzu zählen Größenquantisierungseffekte, eine vergrößerte chemische Reaktivität und eine erhöhte biologische Aktivität. Als Nanomaterialien werden von der IUPAC Substanzen bezeichnet, deren Größe in mindestens einer räumlichen Ausdehnung zwischen 1 nm und 100 nm beträgt.^[1]

Bereits im Jahr 1914 publizierte Ostwald sein Buch zur kolloidalen Chemie mit dem Titel „*Die Welt der vernachlässigten Dimensionen*“. Hierbei impliziert Ostwald, dass die chemischen und physikalischen Eigenschaften am Übergang von Molekül zu Volumen kristall vorwiegend von der Größe und Form abhängig sind. Diese Parameter sind in der klassischen Chemie von sekundärer Bedeutung.^{[2],[3]}

In zahlreichen Produkten des alltäglichen Lebens werden unterschiedliche Nanopartikel eingesetzt. Der Marktanteil von Produkten, die Nanopartikel enthalten steigt rapide an.^[4] Ob in Reinigungssprays,^[4] Sonnencremes,^[5] Nuckeln und Babyflaschen,^[6] Beißringen als Zahnwachstumshilfen für Babys,^[7] Cremes,^[8] Zahnpasta,^[9] Textilien und Deodorants,^[10] Kühlschränken^[11] sowie Waschmaschinen,^[12] Nanopartikel haben unseren Alltag erobert. Wie der menschliche Organismus auf diese besonderen Substanzen reagiert, ist bislang nur wenig erforscht. Da Nanopartikel eine vergleichbare Größe zu Biomolekülen haben, können diese in Zellen eindringen und so die Funktionalität von biologischen Systemen negativ beeinflussen. Aus diesem Grund sind Studien zur Überwindung von biologischen Membranen mit Nanopartikeln von großem Interesse, um mögliche Risiken zu verstehen sowie neue Forschungszweige, wie die Anwendung von Nanopartikeln, in der Diagnostik und Therapie zu entwickeln.

Die Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln mit verschiedener Oberflächenfunktionalisierung in humane Zellsysteme, im Besonderen in den Zellkern, ist von großem gesellschaftlichem Interesse und kaum erforscht. Der Zellkern ist die wichtigste subzelluläre Einheit, da innerhalb diesem das Erbgut liegt und die Replikation der DNA sowie die Transkription, d. h. Erstellung von mRNA-Kopien, stattfinden. Welche Auswirkungen verschiedene Nanopartikelmaterialien und Oberflächenmodifikationen auf die Aufnahme in den Zellkern haben, ist Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit.

Silbernanopartikel werden aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften in zahlreichen Konsumprodukten eingesetzt. Da die Toxizität von Silbernanopartikeln eine Funktion der Freisetzung von Silberionen ist, wird die Auflösung von trigonalen Silbernanoprismen in verschiedenen Medien erforscht und mit sphärischen Analoga verglichen. Darüber hinaus wird die Aufnahme von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie, z. B. trigonal prismatisch vs. sphärisch, in verschiedene Zellsysteme, wie Hautzellen vs. Stammzellen, untersucht.

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Organismus und schützt diesen unter anderem vor dem Eindringen fremder Substanzen. Da zahlreiche Kosmetika Nanopartikel enthalten,^[13] wird die Aufnahme von Silbnernanopartikeln in humane Haut untersucht. Hierbei soll analysiert werden, wie weit Nanopartikel in die Haut penetrieren können. Zudem wird untersucht, wie Nanopartikel funktionalisiert werden müssen, damit diese während der, für die konventionelle elektronenmikroskopische Abbildung notwendigen Hautpräparation nicht aus der Haut gewaschen werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Nanopartikel

Organische und anorganische Nanopartikel können aufgrund ihrer Größe als Zwischenzustand zwischen Molekül und makroskopischem Festkörper verstanden werden. Die außergewöhnlichen Eigenschaften von Nanomaterialien basieren auf der Größe, der Form und der Oberflächenfunktionalisierung. Aufgrund des großen Verhältnisses von Partikeloberfläche zu –volumen im Verhältnis zum analogen Festkörper zeigen Nanomaterialien interessante Eigenschaften. Dies schließt bei Halbleiternanopartikeln Größenquantisierungseffekte,^[14] bei Goldnanopartikeln Oberflächenplasmonenresonanz^{[15],[16]} und bei Eisenoxidnanopartikeln Superparamagnetismus^[17] ein. Dabei sind die opto-elektronischen bzw. die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel abhängig von der Größe der Nanopartikel. Diese Nanopartikel werden aufgrund ihrer optischen und magnetischen Eigenschaften in der Fluoreszenzmikroskopie von biologischen Proben^[18] sowie in der medizinischen Diagnostik als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie eingesetzt.^[19] Nanopartikel aus Silber (antimikrobielle Wirkung), Titandioxid (UV-Absorber), Zinkoxid (UV-Absorber und antiseptische Wirkung), und anderen Metallen und deren Oxide werden aufgrund ihrer Eigenschaften in zahlreichen Produkten eingesetzt.^[4] Metallische Nanopartikel mit freien Elektronen, die beispielsweise aus Gold, Silber, Kupfer oder Alkalimetallen bestehen, verändern ihre optischen Eigenschaften in Abhängigkeit Ihrer Größe und der Oberflächenfunktionalisierung. Beispielsweise lässt sich durch Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit Antikörpern mittels Oberflächenplasmonenresonanz die Bindung der Nanopartikel an Krebszellen nachweisen.^[20]

Die Anzahl kommerzieller Produkte, die Nanopartikel enthalten stieg in den letzten zehn Jahren rapide an. So enthielten im Jahr 2004 54 Produkte Nanopartikel. Im Oktober 2013 waren 1628 Produkte, die Nanopartikel enthalten auf dem weltweiten Markt verfügbar (Steigerung um das 30-fache).^[4] Der Anteil an Produkten, die Silbernanopartikel enthalten, ist aufgrund der antimikrobiellen Eigenschaften dieser Nanopartikel am größten. Nanomaterialien sind somit durch innovative Produkte unseres täglichen

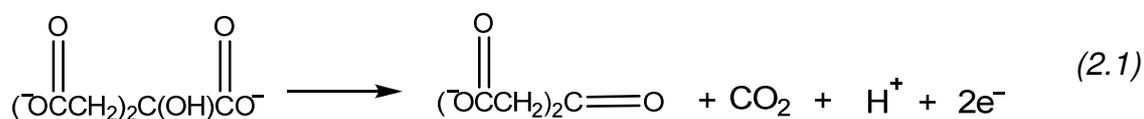
Lebens ein fester Bestandteil geworden. Aufgrund der geringen Größe von Nanopartikeln und damit einhergehenden Eigenschaften können Nanopartikel im Verhältnis zu makroskopischen Festkörpern toxisch auf biologische Systeme wirken.^[21]

Für die Verwendung stabiler Nanopartikeldispersionen ist es notwendig, thermodynamisch instabile Nanopartikel, deren Oberflächenenergie deutlich höher als bei analogen Festkörpern ist, kinetisch, d. h. elektrostatisch und/oder sterisch zu stabilisieren.

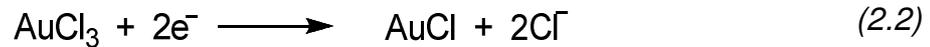
2.1.1. Goldnanopartikel

Zahlreiche Syntheserouten zur Darstellung von Goldnanopartikeln wurden seit der Pionierarbeit von Faraday im Jahr 1857 publiziert.^[15] Diese reichen von klassischen nasschemischen *bottom-up-Verfahren*, wie der Reduktion eines Goldsalzes mit Phosphor,^{[15],[22]} organischen Reduktionsmitteln, wie Formaldehyd, Hydrazin^[22] und Trinitriumcitrat^[23] über inversen Mizellen^[24] bis hin zu physikalischen Verfahren. Durch physikalische *top-down-Verfahren* über Laserablation^[25] sowie Röntgenstrahlung^[26] können ebenfalls Goldnanopartikel synthetisiert werden. Bei der von Turkevich et al. entwickelten und von Frens modifizierten Citrat-Methode entstehen monodisperse Goldnanopartikel, die mit Citrat-Ionen ladungsstabilisiert sind.^{[23],[27]} Dabei ist der Durchmesser (16 bis 147 nm) der entstehenden Nanopartikel von der Konzentration des eingesetzten Citrats abhängig. Durch Einsatz von hohen Konzentrationen an Citrat wird der Durchmesser der Nanopartikel kleiner, die Polydispersität größer und die Wahrscheinlichkeit der Aggregation der Nanopartikel nimmt zu.^[28] Mit stärkeren Reduktionsmitteln, wie beispielsweise Natriumborhydrid und anderen Ligandensystemen, wie Polyethylenimin oder Dodecanthiol, lassen sich Nanopartikel kleineren Durchmessers von 1 bis 5 nm mit größerer Polydispersität generieren.^{[29],[30]} Weare et al. verwenden Phosphin, um Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 1.5 nm und geringer Polydispersität zu synthetisieren.^[31]

Der Mechanismus der etablierten Bildung von Goldnanopartikeln über die Citrat-Methode ist nicht vollständig geklärt. Nach Kumar et al. wird im ersten Schritt zunächst Citrat zu Acetondicarboxylat oxidiert (s. Reaktionsgleichung (2.1)).^[32]



Im zweiten Schritt der Reaktion kommt es zur Reduktion von Gold(III)chlorid zu Gold(I)chlorid (s. Reaktionsgleichung (2.2)).



Im dritten Schritt der Reaktion erfolgt durch Disproportionierung die Bildung der Goldspezies zu Goldatomen und Gold(III)salz mit Hilfe von Acetondicarboxylat (s. Reaktionsgleichung (2.3)).



Der sich dabei bildende Komplex besteht aus drei Goldionen und zwei Carboxyacetoneinheiten (s. Abbildung 2.1).

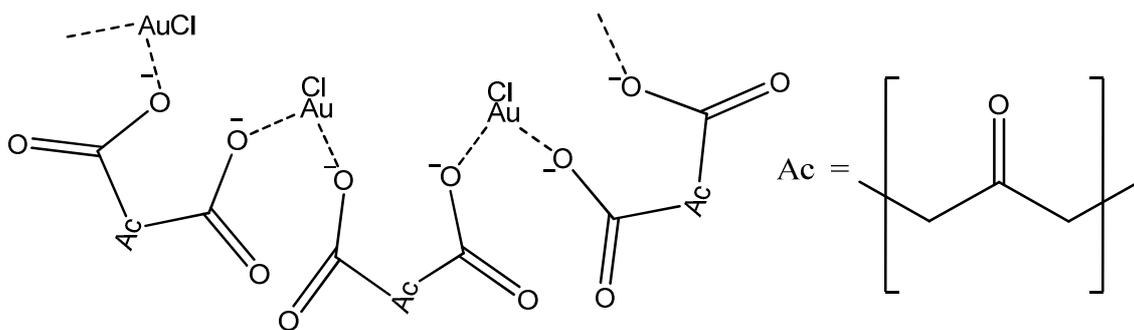


Abbildung 2.1: Komplex aus Gold(I)chlorid und Acetondicarboxylat.^[32]

Die sich während der Disproportionierung bildenden Goldatome absorbieren Au^+ -Ionen. Durch Komplexierung dieser Spezies mit Acetondicarboxylat werden größere Aggregate gebildet. Durch weitere Disproportionierungsreaktionen wird weiteres atomares Gold auf sich bildenden Nukleaten abgeschieden. Es kommt zum Partikelwachstum. Der genaue Mechanismus der Bildung von Goldnanopartikeln ist nicht aufgeklärt.^[32] Goldnanopartikel sind aufgrund der Citrat-Funktionalisierung elektrostatisch und sterisch stabilisiert, sodass die Aggregation der Nanopartikel in wässrigen Medien unwahrscheinlich ist.

2.1.1.1. *Optische Eigenschaften von Goldnanopartikeln*

Die optischen Eigenschaften von Dispersionen, die sphärische Goldnanopartikel mit dem Radius r enthalten, beruhen auf der Streuung und Absorption elektromagnetischer Strahlung, die durch die Mie-Theorie durch Lösung der Maxwell-Gleichungen beschrieben wird.^[33] Für kleine, einzelne sphärische Partikel beschreibt die Mie-Theorie, Streu- und Absorptionsquerschnitte, die Streuamplitude und die Elemente der Phasenmatrix, insbesondere die Phasenfunktion mit Polarisation.

Der Streuquerschnitt der Extinktion (C_{ext}) jedes einzelnen kleinen Partikels mit einer frequenzabhängigen, komplexen dielektrischen Funktion $\varepsilon = \varepsilon' + i\varepsilon''$ im Medium mit der dielektrischen Konstante ε_m kann wie folgt ausgedrückt werden:

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 r^3 \sqrt{\varepsilon_m^3}}{\lambda} \frac{\varepsilon''}{(\varepsilon' + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon''^2} \quad (2.1)$$

Hierbei steht λ für die Wellenlänge des Primärstrahls, r für den Radius der Partikel, ε' für die Polarisation des Feldes und ε'' für die Absorption.

Der Ursprung der starken Farbänderung kolloidaler Golddispersionen liegt im Nenner von Gleichung (2.1), der die Existenz einer Absorptionsbande bei

$$\varepsilon' = -2\varepsilon_m \quad (2.2)$$

beschreibt. In einem Goldnanopartikel induziert der Dipol, der durch ein elektrisches Feld, das wiederum durch Licht entstanden ist, eine Polarisation auf der Oberfläche. Dies bezeichnet man als kollektive Oszillation der Leitungselektronen. Diese Ladung fungiert als Rückstellkraft für Elektronen, die zur Kompensation des Dipols beiträgt und somit zur Extinktion einer bestimmten Resonanzwellenlänge führt, wenn Gleichung (2.2) erfüllt ist (s. Abbildung 2.2).^[16] Die Frequenz, bei der Leitungselektronen mit dem wechselnden elektrischen Feld der einfallenden elektromagnetischen Strahlung oszillieren, wird als Oberflächenplasmonenresonanz bezeichnet.^{[34],[35]} Aufgrund der Elektronenkonfiguration des Goldes ($[\text{Xe}] 4f^{14}5d^{10}6s^1$) und den entsprechenden frei beweglichen Ladungsträgern liegt die Oberflächenplasmonenbande im sichtbaren Spektralbereich. Dabei kann die Resonanzbedingung für Oberflächenplasmonen in Anlehnung

an Gleichung (2.2) erfolgen und ergibt sich zu $\varepsilon'(\lambda_{SPR}) = -2\varepsilon_m(\lambda_{SPR})$.^[35] Bei Partikeldurchmessern von ca. 3 nm bis etwa 120 nm verschiebt sich die Oberflächenplasmonenbande von 515 bis 585 nm.^{[16],[36]} Somit ändern die Disperionen mit den einzelnen Nanopartikelgrößen ihre Farbe von orange über rot bis zu violett.^[27]

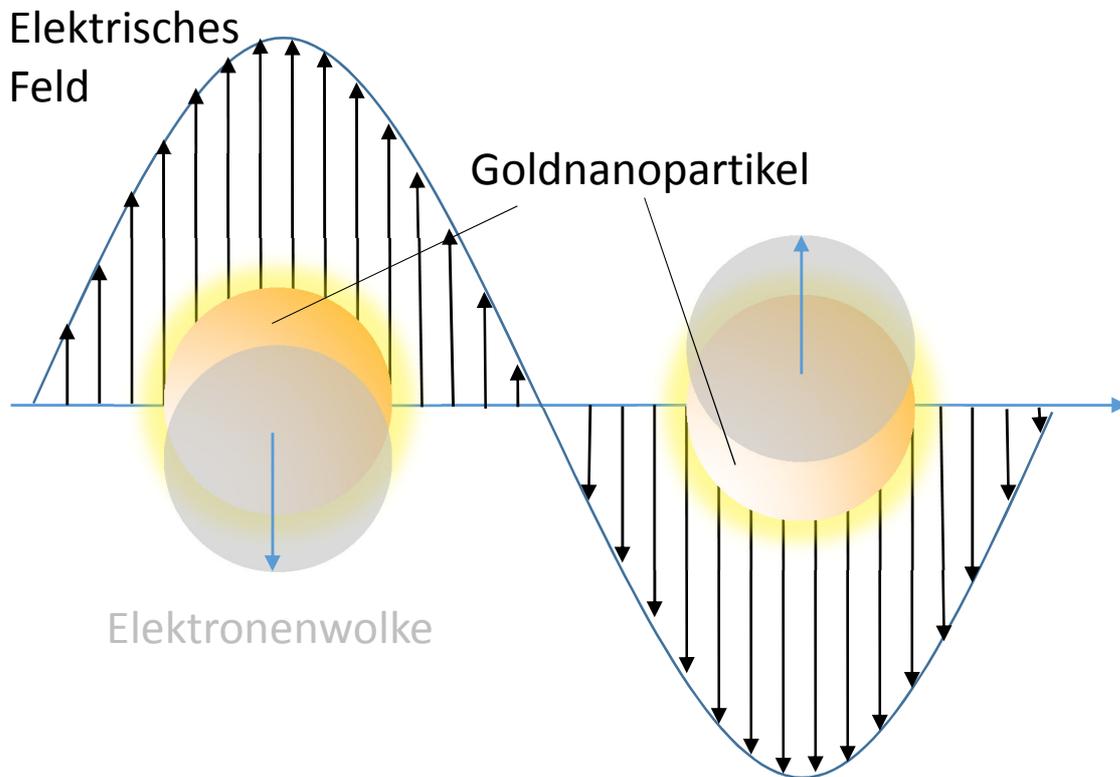


Abbildung 2.2: Induzierter Dipol durch Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit einem Goldnanopartikel, der in Phase zum elektrischen Feld des eingestrahlichten Lichts oszilliert.

2.1.2. Silbernanopartikel

Silber wird schon seit tausenden von Jahren als Antibiotikum verwendet.^[37] Um 1000 v. Chr. wurde Silber in der Aufbereitung von Wasser eingesetzt, um dies trinkbar zu machen.^[37] Im 17. Jahrhundert wurde Silbernitrat in der Behandlung von Geschlechtskrankheiten eingesetzt.^[37] Ab dem Jahr 1884 wurden Neugeborenen einige Tropfen einer wässrigen Silbernitratlösung in die Augen getropft, um die Übertragung der Infektion mit Bakterien (*Neisseria gonorrhoeae*) von bereits infizierten Müttern zu verhindern.^[38]

Silberionen sind hoch reaktiv und blockieren die Proteinfunktionen von Organismen indem sie mit schwefelhaltigen Aminosäuren und Proteinen zu schwerlöslichen Mer-

captiden reagieren. Es kommt zu strukturellen Veränderungen von Zell- und Zellkernmembranen des Bakteriums. Zudem binden Silberionen an bakterielle DNA und RNA und verhindern die Replikation der Bakterien.^{[37],[39],[40]} Somit wird die Funktion zahlreicher Proteine blockiert und lebensnotwendige Prozesse unterbrochen. Dies kann zur verminderten Viabilität von Bakterien führen.^[41]

Silbernanopartikel werden heutzutage in zahlreichen Produkten eingesetzt,^[4] da sie erstens der Größe von subzellulären Bestandteilen wie Proteinen entsprechen und somit die Aufnahme in biologische Systeme, wie zum Beispiel Bakterien vereinfacht wird,^[42] und zweitens Silbernanopartikel ein großes Silberreservoir besitzen. Da sich Silbernanopartikel mit der Zeit auflösen, bilden sich zytotoxische Silberionen. Die Auflösung von polydispersen Silbernanopartikeln wurde von Kittler et al. und Liu et al. untersucht.^{[43],[44]} Dabei kann die Auflösung von Silbernanopartikeln als Funktion der Protonen- und der Sauerstoffkonzentration, der Temperatur und der Konzentration von eingesetztem Silber verstanden werden. Die Autoren gehen davon aus, dass die Auflösung von Silbernanopartikeln nach einer Kinetik erster Ordnung verläuft.

Silbernanopartikel verschiedener Morphologie (Sphären,^[45] Röhren,^[46] Stäbchen^[47] und Würfel^[48]) konnten bereits synthetisiert werden. Die Synthese trigonaler Silbernanoprismen kann sowohl photochemisch^[49] als auch thermisch^[50] erfolgen. Bei der thermischen Synthese trigonaler Silbernanoprismen ist die Konzentration an Reduktionsmittel (Natriumborhydrid und Natriumcitrat), an Oxidationsmittel (Wasserstoffperoxid) und an Liganden (Polyvinylpyrrolidon) entscheidend. Métraux et al. zeigten, dass nach Zugabe des Natriumborhydrids zu den restlichen Edukten sich die Lösung gelblich färbt. Dies weist auf eine sofortige Reduktion der Silberionen hin, sodass es zur Bildung von Nukleaten kommt. Da diese Nanopartikel thermodynamisch nicht stabil sind, entfärbt sich die Dispersion nach einigen Sekunden. Nach ca. 30 min färbt sich die Dispersion spontan magentafarben. Diese Verfärbung deutet auf die Bildung von hexagonalen Silbernanoplättchen hin. Aherne et al. untersuchen den Mechanismus der Bildung trigonaler Silbernanoprismen aus hexagonalen Plättchen. Dabei wird angenommen, dass ein hexagonales Nanoplättchen aus einer defektreichen hexagonal dichtesten Kugelpackung (hdp), die von zwei kubisch flächenzentrierten (fcc) Strukturen umgeben ist, besteht. Die fcc-Strukturen sind asymmetrisch und bestehen alternierend aus (100)- und (111)-Facetten. Das Wachstum der (100)-Facetten ist gegenüber dem Wachstum der (111)-Facetten bevorzugt, sodass trigonale Silbernanoprismen entstehen. Anschließend wachsen die weniger bevorzugten, kleineren Kanten der

(100) Facetten.^[51] Die Ausbildung sogenannter Zwillings Ebenen geschieht in Silberhalogenen sowie in metallischem Silber und Gold bevorzugt, da bei diesen Materialien die Stapelfehlerenergie gering ist.^[52] Aufgrund der hexagonalen Struktur des fcc-Systems bilden diese Zwillingskristalle hexagonal geformte Nukleate (s. Abbildung 2.3).

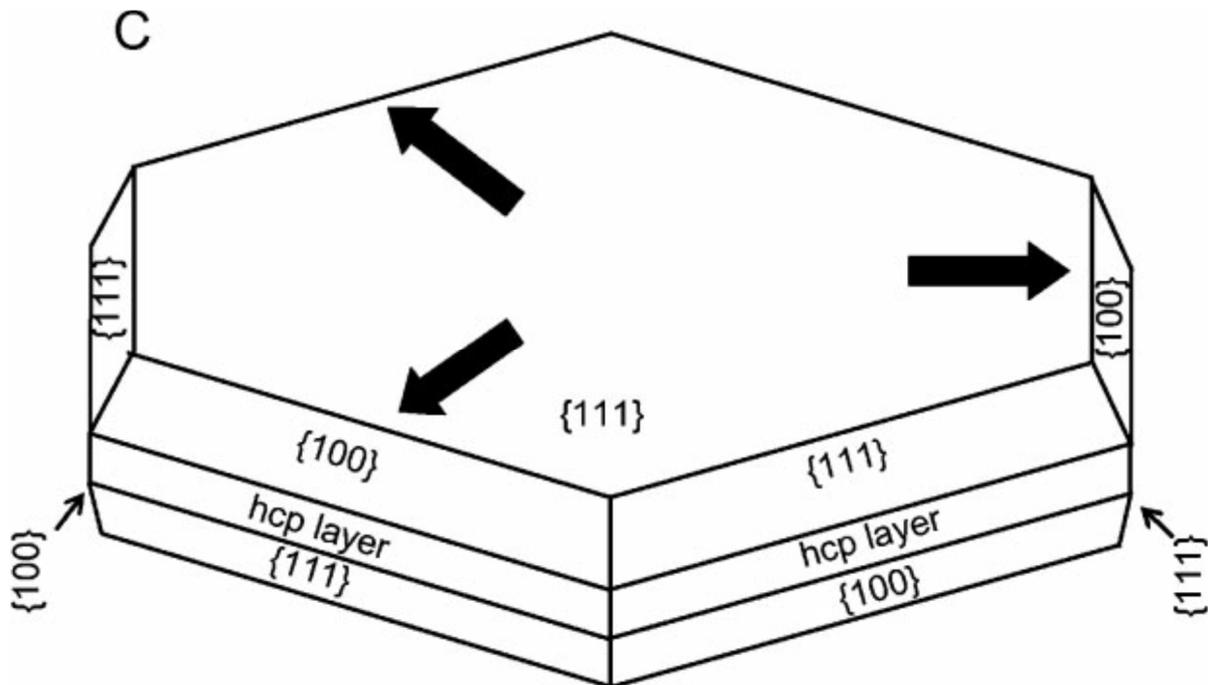


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines hexagonalen Nanoplättchens mit einer defekt-induzierten hcp-Kristallstruktur, die von zwei fcc-Schichten unterschiedlicher Dicke umgeben ist. Innerhalb der zweidimensionalen Wachstumsebene sind aufgrund der alternierenden Verteilung der Facetten bestimmte Wachstumsrichtungen des Kristalls bevorzugt. Die dicken Pfeile deuten die bevorzugte Wachstumsrichtung an (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von John Wiley and Sons eingeholt).^[51]

Lofton et al. gehen bei der Bildung von trigonalen Silbernanoprismen davon aus, dass sich zunächst ein hexagonales Partikel bildet, das eine Zwillings ebene mit alternierender konkaver (Typ A) und konvexer (Typ B) Orientierung aufweist. Jedoch gibt es in dem Modell von Lofton et al. im Verhältnis zu Aherne et al. nur eine Facette (111). Auf der konvexen Seite kann das bindende Silberion nur unzureichend stabilisiert werden, da nur drei Nachbaratome vorhanden sind. Daher ist die Auflösung der absorbierten Ionen energetisch bevorzugt. An der konkaven Seite ist hingegen die Absorption von Silberionen bevorzugt, da die größere Anzahl an Bindungspartnern für eine höhere Stabilisierung sorgt (s. Abbildung 2.4).^[52]

Métraux et al. zeigten, dass bei der Synthese die Konzentration an Natriumborhydrid entscheidend für die Form der entstehenden Partikel ist. Eine hohe Konzentration führt

zu Partikeln mit geringerer Dicke, größerer Kantenlänge und schmalen Kantenspitzen.

Natriumcitrat steuert durch verschieden starke Absorption an der Partikeloberfläche (an die $\{111\}$ -Facetten) das Wachstum in die trigonal-prismatische Form,^[51, 53] während Polyvinylpyrrolidon die Nanoprismen vor Aggregation schützt.^[50]

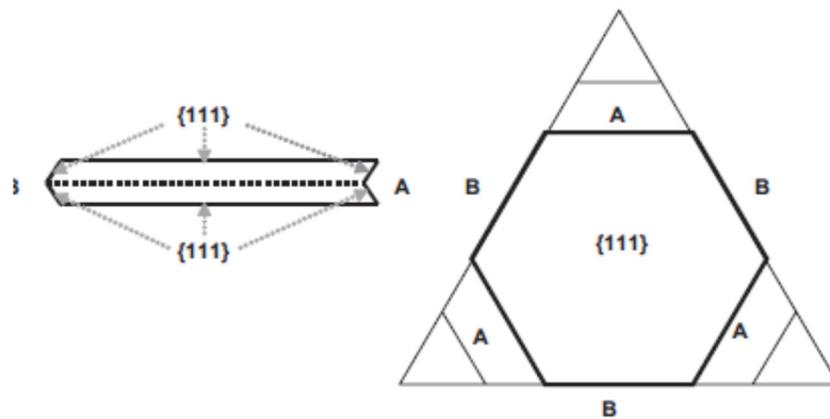


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung einer Zwillingsfläche mit jeweils drei konkaven und konvexen Seitenflächen. Die Bindung von Silberionen an der konkaven Seite ist energetisch bevorzugt, sodass sich trigonale Nanoprismen bilden (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von Elsevier eingeholt).^[52]

Die Ausbildung von Nanoprismen kann mittels UV/VIS-Spektroskopie aufgrund von charakteristischen Absorptionsbanden überwacht werden. Diese resultieren aus den Dipol- und Quadrupolplasmonenresonanzen der trigonalen Silbernanoprismen und können mit der Diskreten-Dipol-Näherung (engl.: *Discrete-Dipole-Approximation* (DDA)) simuliert werden.^{[50],[54]} Die DDA ist eine Näherung der Maxwell'schen Gleichungen, bei der die Prismen in kleine Würfel zerlegt werden und deren Dipolwechselwirkungen betrachtet werden. Die Gleichungen können unter Verwendungen von Fourier-Transformation und komplex-konjugierten Gradienten berechnet werden.^[54]

Das intensivste Signal hat bei 770 nm seinen Ursprung in der in-plane-Dipolplasmonenresonanz der Dreiecksfläche. Bei 470 nm ist das Signal der Quadrupolresonanz der Dreiecksflächen zu erkennen. Das lokale Maximum bei 340 nm entspricht der out-of-plane-Quadrupolresonanz der Rechtecksflächen, während bei 410 nm ein breites und schwaches Signal durch die Dipolresonanz der Rechtecksflächen hervorgerufen wird (s. Abbildung 2.5). Die in-plane-Oberflächenplasmonenbande ist ein sinnvoller Indikator zur Beurteilung der Prismenarchitektur.^{[49],[50]} Bei einer Abrundung der Ecken der Prismen kommt es zur Blauverschiebung im UV/VIS-Spektrum.

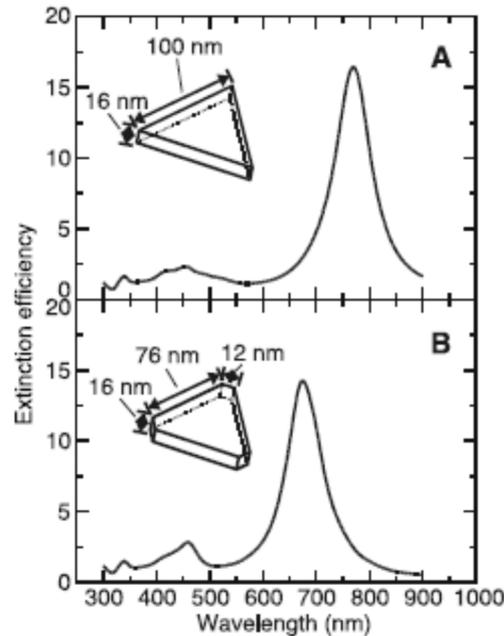


Abbildung 2.5: DDA-simulierte UV/VIS-Spektren trigonaler Silbernanoprismen mit spitzen Ecken (A) und mit abgerundeten Ecken (B) (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von „The American Association for the Advancement of Science“ eingeholt).^[49]

2.1.3. Silicananopartikel

Die Anwendung von Silicananopartikeln ist aufgrund ihrer einzigartigen chemischen und physikalischen Eigenschaften in verschiedenen Industriezweigen weit verbreitet.^[55] Dabei bieten diese Nanopartikel ein breites Anwendungsspektrum, da sie im Vergleich zu Silbernanopartikeln inert gegenüber biologischen Systemen sind und somit als gering toxisch eingestuft werden.^[56] Nanostrukturierte Silicapartikel kommen in zahlreichen Produkten des täglichen Bedarfs wie Kosmetika, Lacken aber auch Lebensmitteln zum Einsatz.^[57] In der Lebensmittelindustrie wird Silica als Lebensmittelzusatzstoff E 551 beispielsweise als Rieselhilfe in Gewürzen, in Getränpulver, Fruchtpulver sowie Suppenpulver eingesetzt.^[55]

Silicananopartikel, insbesondere markierte Silicananopartikel bieten enorme Perspektiven als Indikatoren und Sonden für eine Vielzahl von Disziplinen. So sind die Partikel für biologische und medizinische Anwendungen interessant und werden derzeit als Wirkstoffträger angewendet.^[58] Dabei ist ihr Einsatz bei bildgebenden Verfahren, der optischen Datenverarbeitung und der Nanomedizin möglich.^[59] Zahlreiche Möglichkeiten des Markierens von Biomolekülen (Proteine,^[60] DNA^[61]) mit Silicananopartikeln sind dabei publiziert. Santra et al. funktionalisierte farbstoffmarkierte Silicananopartikeln mit Antikörpern und ermöglichte damit die Lokalisierung von Leukämiezellen in

Zellkulturen.^[62] Zudem ist es möglich, Silicananopartikel in einfacher Weise mit verschiedensten funktionellen Gruppen zu funktionalisieren.^{[63],[64]}

Hergestellt werden können Silicananopartikel über verschiedene Methoden. Zumeist werden Silicananopartikel nach der Stöber-Methode synthetisiert, die im Jahr 1968 entwickelt wurde.^[65] Mit diesem Verfahren können Nanopartikel mit Durchmessern von 30 nm bis 1 µm in ethanolischer Lösung unter katalytischer Wirkung von Wasser und Ammoniak dargestellt werden. Bei diesem Sol-Gel-Prozess wird ein Alkoxysilan (häufig Tetraethoxysilan (TEOS)) zu Kieselsäure hydrolysiert, welche anschließend zu Nanopartikeln geringer Polydispersität kondensiert (s. Abbildung 2.6).

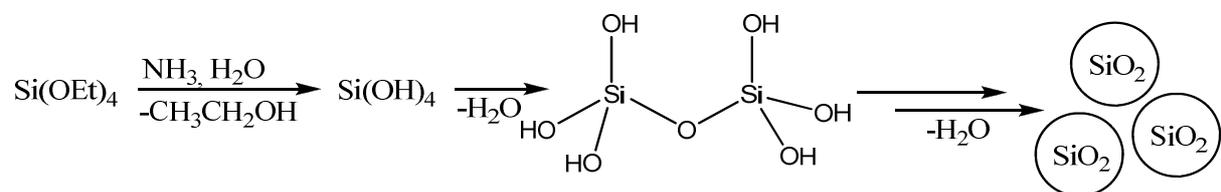


Abbildung 2.6: Vereinfachte Darstellung der Hydrolyse von TEOS zu Kieselsäure und anschließende Kondensation sowie Polymerisation zu Silicananopartikeln.

Die Reaktion läuft über die basenkatalytische Bildung von Organoalkoxysilanen. Hierbei handelt es sich um eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion über einen bimolekularen, nukleophilen Angriff am Si-Atom, wobei ein fünfach-koordinierter negativ geladener Übergangszustand durchlaufen wird.^[66] Durch die Hydrolyse und anschließende Kondensation wird die Elektronendichte am Si-Atom gesenkt, da zunächst die Ethoxygruppen durch Hydroxygruppen und anschließend durch Silanoxygruppen substituiert werden. Die negativ geladenen Übergangszustände sind aufgrund des Absinkens der Elektronendichte stabilisiert, wobei die Hydrolyse der Alkoxyfunktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.^[66] Eine Erhöhung der Katalysatorkonzentration führt aufgrund des verstärkten nukleophilen Angriffs der Hydroxygruppen am Si-Atom zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit.^[66]

Das Wachstum von Silicananopartikeln wird durch verschiedene Modelle erklärt: Beim Monomeradditions-Wachstumsmodell (engl.: *Monomer addition growth model*) nach LaMer^[67] wird das Partikelwachstum mit einer Reaktion erster Ordnung bezüglich TEOS beschrieben. Hierbei wird erstens von einer Hydrolyse (geschwindigkeitsbestimmender Schritt) von TEOS hin zu Kieselsäure ausgegangen und zweitens die Kondensation der Kieselsäure beschrieben. Erfolgt die Übersättigung der Kieselsäure,

kommt es zu einer molekularen Kondensation dieser und somit zur Partikelbildung. Jedoch hat dieses Modell Schwächen: In einer Studie von van Blaaderen et al.^[68] wurden Silicakerne präpariert und wachsen gelassen. Folglich war die kritische Übersättigungskonzentration der Kieselsäure erreicht. Als mehr TEOS zu den Kernen zugegeben wurde, kam es zur Bildung von Nanokernen und nicht wie nach dem Modell nach LaMer zum Wachsen der Primärpartikel. Mit Hilfe des *Aggregation growth-Modells* lässt sich die Bildung von derartigen Sekundärnukleaten erklären. Dabei werden kleine Silicananokerne mit einer räumlichen Ausdehnung von einigen Nanometern durch kontinuierliche Hydrolyse und anschließende Kondensation von TEOS gebildet. Diese Kerne sind aufgrund ihrer großen Oberflächenenergie kolloidal nicht stabilisiert und aggregieren zu größeren, kolloidal stabilen Nanopartikeln, sofern sie die kritische Größe überschreiten. Einen weiteren Hinweis für die Aggregation von Nanokernen hin zu größeren Nanopartikeln lieferten van Helden et al.^[69] Zur Charakterisierung von Silicananopartikeln, die mittels Stöber-Methode^[65] generiert wurden, analysierten die Autoren diese via Röntgenkleinwinkelstreuung (engl.: *Small angle X-ray scattering*, SAXS). Dabei gab es neben dem erwarteten Hauptsignal ein weiteres Signal, das die Autoren Partikeln einer Größe von ca. 1 nm zuordneten.

Neben dem Stöberwachstum hat sich eine weitere Darstellung von Silicananopartikeln etabliert: Hierbei handelt es sich um die Darstellung der Nanopartikel mit geringerer Polydispersität im Verhältnis zu Stöber-Partikeln mittels Mikroemulsion, die von Osseo-Assare und Arriagada in den 1990er Jahren etabliert wurde. Dabei wird TEOS in einer Wasser-in-Öl-Mikroemulsion mit Hilfe eines nicht-ionischen Tensids (14-(Nonylphenoxy)-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-ol, Igepal® CO-520) hydrolysiert und die entstehende Kieselsäure zu Silica kondensiert. Der resultierende Durchmesser der Nanopartikel ist vom Verhältnis von Wasser-zu-Tensid abhängig. Die Anzahl an inversen Mizellen ist dabei eine Funktion der Tensidkonzentration und des molaren Verhältnisses von Wasser zu Tensid (R-Wert, s. Abbildung 2.7). Hierbei reagieren die Oxyethylengruppen der inversen Mizellen des Tensids mit Wassermolekülen über Wasserstoffbrückenbindungen. Durch hohe Wasserkonzentrationen entstehen mehr hydrolysierte TEOS-Spezies innerhalb der inversen Mizellen. Bei hohen Wasser-zu-Tensid-Konzentrationen laufen somit die Hydrolyse und Kondensation von TEOS innerhalb einer inversen Mizelle ab. Somit wird die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung zweier benachbarter Silanolgruppen zur Bildung von Si-O-Si-Bindungen erhöht. Dementsprechend steigt die Keimbildungsrate und die intramizellare Keimbildung läuft

favorisiert ab. Folglich werden die gebildeten Nanopartikel mit steigender Wasser-zu-Tensid-Konzentration kleiner. Dies gilt jedoch nur für geringe Ammoniakkonzentrationen (1.6 Gew.-%). Bei hohen Ammoniakkonzentrationen gibt es ein Minimum der resultierenden Partikelgröße bezüglich der Wasser-zu-Tensid-Konzentration. Arriagada et al. begründen dies mit intermizellaren Wechselwirkungen: Hierbei wird während der Erhöhung der Wasser-zu-Tensid-Konzentration die Geschwindigkeit des intermizellaren Stoffaustauschs erhöht (s. Abbildung 2.7). Die Autoren gehen, wie Bogush et al., beim Partikelwachstum von einem Aggregationswachstum aus.^{[70],[71],[72]}

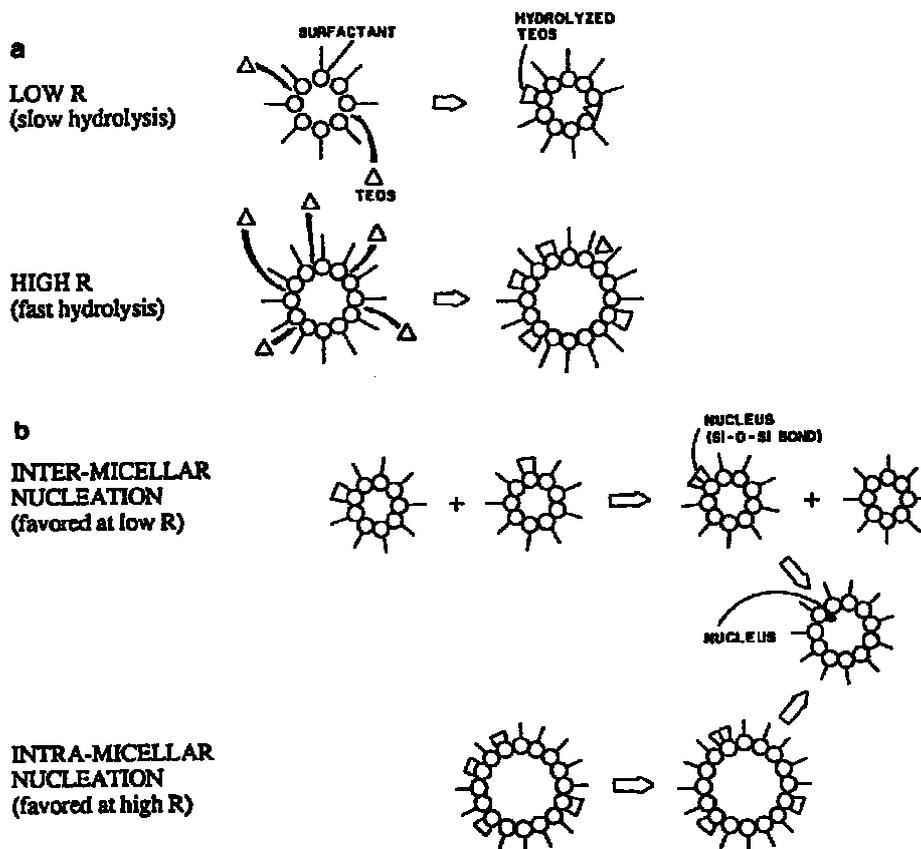


Abbildung 2.7: Bildung von Silicakernen durch Hydrolyse und Kondensation von TEOS in inversen Mizellen. Teilweise Hydrolyse von TEOS und Assoziation zu inversen Mizellen (a), intra- und intermizellare Keimbildung (b) (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von Elsevier eingeholt).^[70]

2.2. Humane Haut

Neben der Lunge und dem Darm stellt die Haut mit einer Ausdehnung von 1.5 bis 2 m² und einem prozentualen Körpergewicht von 7 bis 10% eines erwachsenen Menschen, die Hauptbarriere eines Organismus gegenüber der Umwelt dar.^[73] Hierbei hat die Haut wesentliche essentielle Funktionen:

Die Haut übernimmt beispielsweise Barriere- und Reservoirfunktionen, sodass der Wasserhaushalt reguliert und die Austrocknung der Haut verhindert wird. Zudem schützt die Haut vor exogenen Organismen (zum Beispiel Bakterien, Pilzsporen) sowie Substanzen (beispielsweise Giftstoffe, Nanopartikeln) und übernimmt immunologische Aufgaben. Darüber hinaus bietet die Haut einen mechanischen Schutz. Den zahlreichen Aufgaben, der Haut entspricht der anatomische Aufbau der Haut. Hierbei gliedert sich die Haut in die Oberhaut (Epidermis), die Lederhaut (Dermis) und die Unterhaut (Subcutis) (s. Abbildung 2.8).^[73]

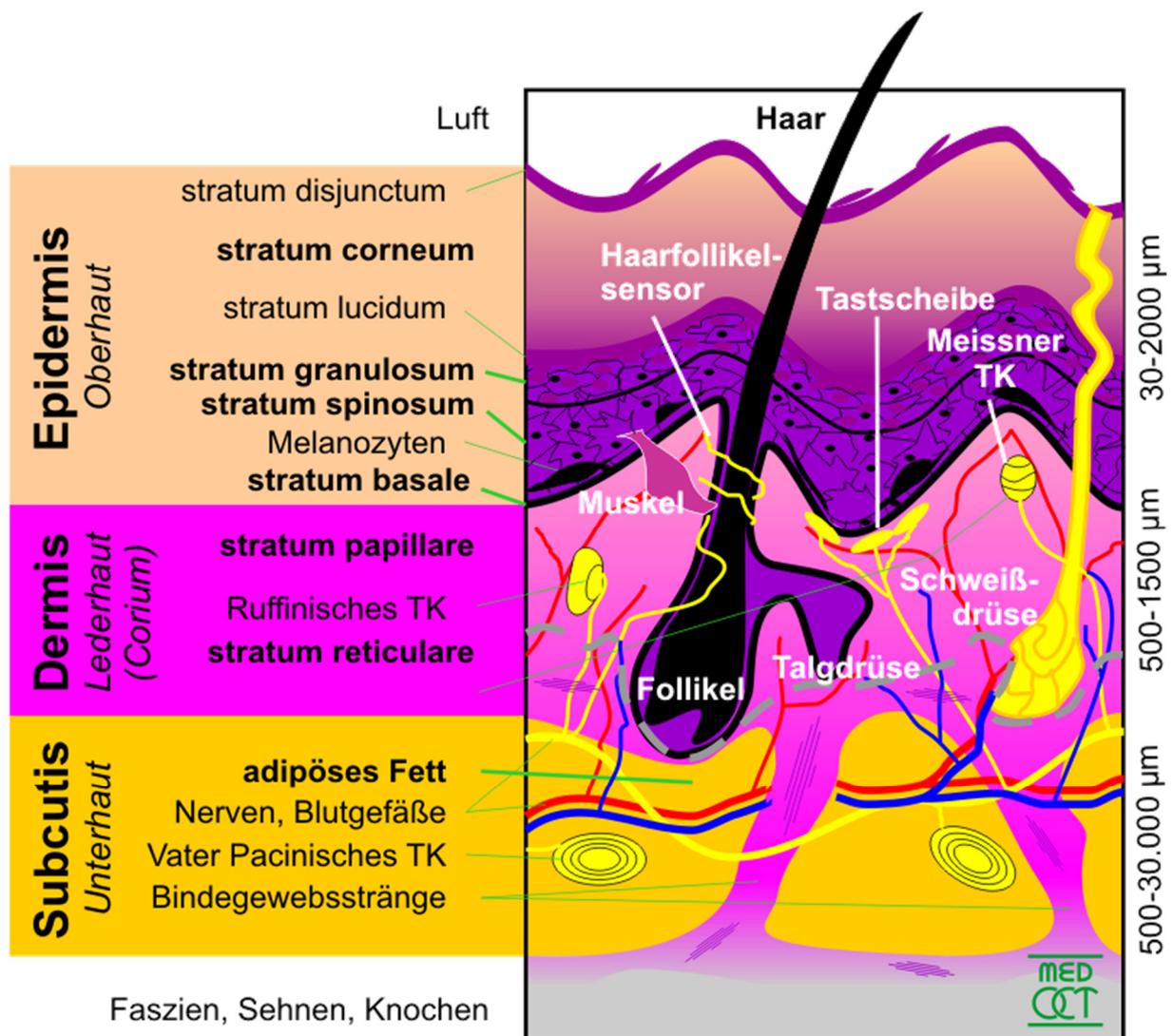


Abbildung 2.8: Aufbau der menschlichen Haut. TK:Tastkörperchen.^[74]

Hierbei unterteilt sich die Epidermis, die eine Dicke von ca. 50 bis 200 µm hat, in das *Stratum corneum* (Hornzellschicht), das *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht), das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) und das *Stratum basale* (Basalzellschicht). Neben den Epithelzellen (Keratinocyten), die 90% aller Zellen in der Epidermis repräsentieren, befinden sich in der Haut zusätzlich Melanozyten (Pigmentzellen), Langerhans-

Zellen (Immunabwehrzellen) und Merkelzellen (Druckrezeptoren). Dendritische Zellen, beispielsweise Langerhans-Zellen, phagozytieren zellfremdes Material, verarbeiten dessen Proteine und präsentieren diese in Form von Antigenen auf ihrer Oberfläche. Das *Stratum corneum* besteht aus abgestorbenen Keratinozyten, die als Korneozyten bezeichnet werden. Ausschließlich lipophile niedermolekulare Stoffe können in tiefere Hautschichten intakter Haut gelangen, da interzelluläre Lipide mit den Zellen eine hydrophobe Schutzschicht bilden. Unter dem *Stratum corneum* liegt das *Stratum granulosum*. Diese Schicht besteht aus viablen Granulazellen. Das in den Zellen enthaltene Granula absorbiert, die für die Zellteilung schädliche UV-Strahlung. Unter dem *Stratum granulosum* liegt das *Stratum spinosum*. Diese Stachelzellschicht enthält rundliche und längliche Zellen, die viele zackenartige Fortsätze beinhalten. Darunter liegt die Basalmembran, die die Grenze zwischen Epidermis und Dermis ist. Die Dermis ist ein faserreiches Bindegewebe, das viel Kollagen enthält. Kollagen ist ein Strukturprotein mit einem relativen Anteil von 30% an der Gesamtmasse aller Proteine das am häufigsten vorkommende Protein im menschlichen Organismus (s. Abbildung 2.9).

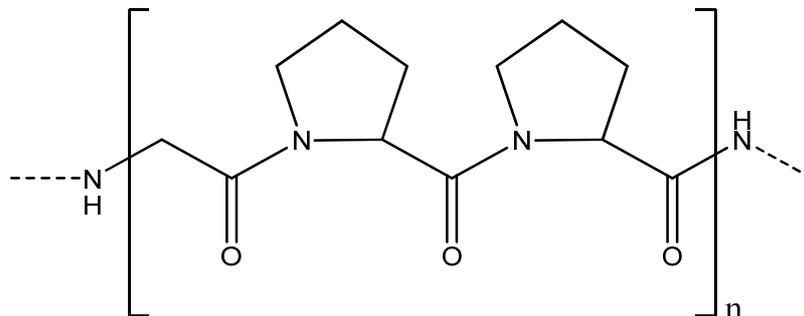


Abbildung 2.9: Primärstruktur des Kollagens.^[75]

Die Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln in Haut ist von besonderem Interesse, da zahlreiche Produkte des täglichen Gebrauchs Nanopartikel enthalten. Gesunde Haut bildet eine effiziente Barriere, die den Organismus schützt. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Nanopartikel nicht in tiefere Hautschichten der lebendigen Areale der Dermis und der Subcutis gelangen.^[13] Zhang et al. zeigen beispielsweise, dass Quantenpunkte mit einem Durchmesser von 4.6 nm in der obersten Schicht der Haut lokalisiert bleiben.^[76] Wird jedoch die oberste Barriere der Haut (*Stratum corneum*) gestört, beispielsweise mit Nadelstichen oder Klebestreifenabrisse, ist eine Penetration von Nanopartikeln in tiefere Hautschichten möglich. Ein Vergleich von relevanten Studien bezüglich der Nanopartikelaufnahme in Haut erfolgt in Kapitel 4.3.

2.3. Zellsysteme

Um die biologischen Effekte beispielsweise die Aufnahme von Nanopartikeln zu untersuchen, werden verschiedene *in vitro*-Systeme verwendet, deren Unterschiede im Folgenden beschrieben werden.

2.3.1. Humane Keratinozyten

Da verletzte Haut eine der Haupteingangsrouten für Nanopartikel sein könnte, werden Hautzellen hinsichtlich ihrer Aufnahme von verschiedenen Nanopartikelsystemen untersucht. Keratinozyten sind in der Oberhaut (Epidermis) der hauptsächlich (> 90%) vorkommende Zelltyp. HaCaT-Zellen sind immortalisierte, also unsterbliche, epidermale Zellen, die eine hohe Proliferationskapazität und Differenzierungskapazität aufweisen.^[77] Diese Zellen stammen von einem männlichen Patienten und werden häufig in Zellexperimenten als Modell für Keratinozyten verwendet.

2.3.2. Humane mesenchymale Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind multipotente nicht differenzierte Vorläuferzellen des Bindegewebes. Die Zellen besitzen ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential. Ausdifferenzierte hMSC sind in der Lage in ein anderes Gewebe zu transformieren. Adulte hMSC tragen zur Aufrechterhaltung und Regeneration des Stütz- und Bindegewebes, wie Knochen, Knorpel und Muskeln bei.^[78] Daher wird vermutet, dass in einem multizellularen Organismus, der Nanopartikeln ausgesetzt ist, hMSC mit den Nanopartikeln interagieren können. Somit wurde dieser Zelltyp und HaCaT-Zellen in dieser Arbeit verwendet, um die Aufnahme von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie (trigonale Silbernanoprismen vs. sphärische Silbernanopartikeln) in Zellen zu untersuchen.

2.4. Wechselwirkung von Nanopartikeln mit biologischen Systemen

Die Wechselwirkung von Nanopartikeln mit biologischen Systemen (beispielsweise *ex vivo*-Haut und *in vitro*-Zellen) hängt von zahlreichen Parametern ab. Hierzu zählen die physiko-chemischen Eigenschaften der Nanopartikel, wie Material, Konzentration,^{[79],[80]} Größe,^[81] Ligandendichte,^[81] Form,^[82] Oberflächenfunktionalisierung,^[64] Grad der Aggregation,^[83] Zeta-Potential und Porosität.^{[84],[85]} Zudem spielen die Eigenschaften der biologischen Systeme eine entscheidende Rolle. Verschiedene Zellsysteme haben beispielsweise verschiedene Dauern der Zellzyklen, wachsen unterschiedlich stark und haben verschiedene Zeitpunkte, nach denen sie konfluent, d. h. den Boden des Kulturgefäßes lückenlos bedecken, werden. Vergleicht man Zellsysteme mit Haut fällt auf, dass die Biegesteifigkeiten von Zellen deutlich geringere Werte haben als die Biegesteifigkeit von Haut. So beträgt die Biegesteifigkeit des *Stratum corneums* von humaner Rückenhaut ca. 2 MPa,^[86] während die Biegesteifigkeit von HaCaT Zellen ca. 0.1 MPa^[87] und von hMSC ca. 10⁻⁴ MPa^[88] betragen (Young Modul). Es stellt sich die Frage, ob bzw. wie Nanopartikel die oberen Hautschichten überwinden können und in tiefer liegende Hautschichten gelangen können. Lademann et al. veranschaulichten, dass sich TiO₂-Nanopartikel in Haarfollikel anreichern können.^[89] Haut bildet dabei eine äußerst effiziente Barriere gegenüber Nanopartikeln und nimmt nur geringe Konzentrationen an Nanopartikeln auf.^{[90],[91],[92]}

Ryman-Rasmussen et al. zeigten eine Aufnahme von PEG-funktionalisierten Quantenpunkten mit einem TEM-Durchmesser von 4.6 nm und einem hydrodynamischen Durchmesser von 45 nm in native Schweinehaut in eine Tiefe von etwa 100 µm.^[93] Ob die Partikel Aufnahme in verletzte oder in erkrankte Haut (beispielsweise Schuppenflechte) erhöht wird, ist Gegenstand laufender Untersuchungen.^{[94],[95],[96]}

In zahlreichen Studien wird die Nanopartikel Aufnahme in tiefere Hautschichten dokumentiert, wenn das *Stratum corneum* zuvor gestört wurde.^[97] Dabei gibt es einige Möglichkeiten das *Stratum corneum* zu stören beispielsweise durch Abziehen von transparentem Polyethylen-Klebeband (z.B. Tesa-Film®),^[13] Pricken mit Lanzette-Mikronadeln^[98], UV-Bestrahlung^[99] und durch Biegen^[100] von Haut sowie Einsetzen induzierter Kontaktdermatidis.^[96]

In vitro-Zellsysteme nehmen Partikel auch ohne vorherige Schädigung in hoher Quantität über verschiedene Aufnahmewege auf (s. Abbildung 2.10). Graf et al. zeigten,

dass positiv geladene und hydrodynamisch stabilisierte Silicananopartikel in höherer Quantität als unfunktionalisierte und PEG-funktionalisierte Silicananopartikel von HeLa-Zellen aufgenommen werden.^[64]

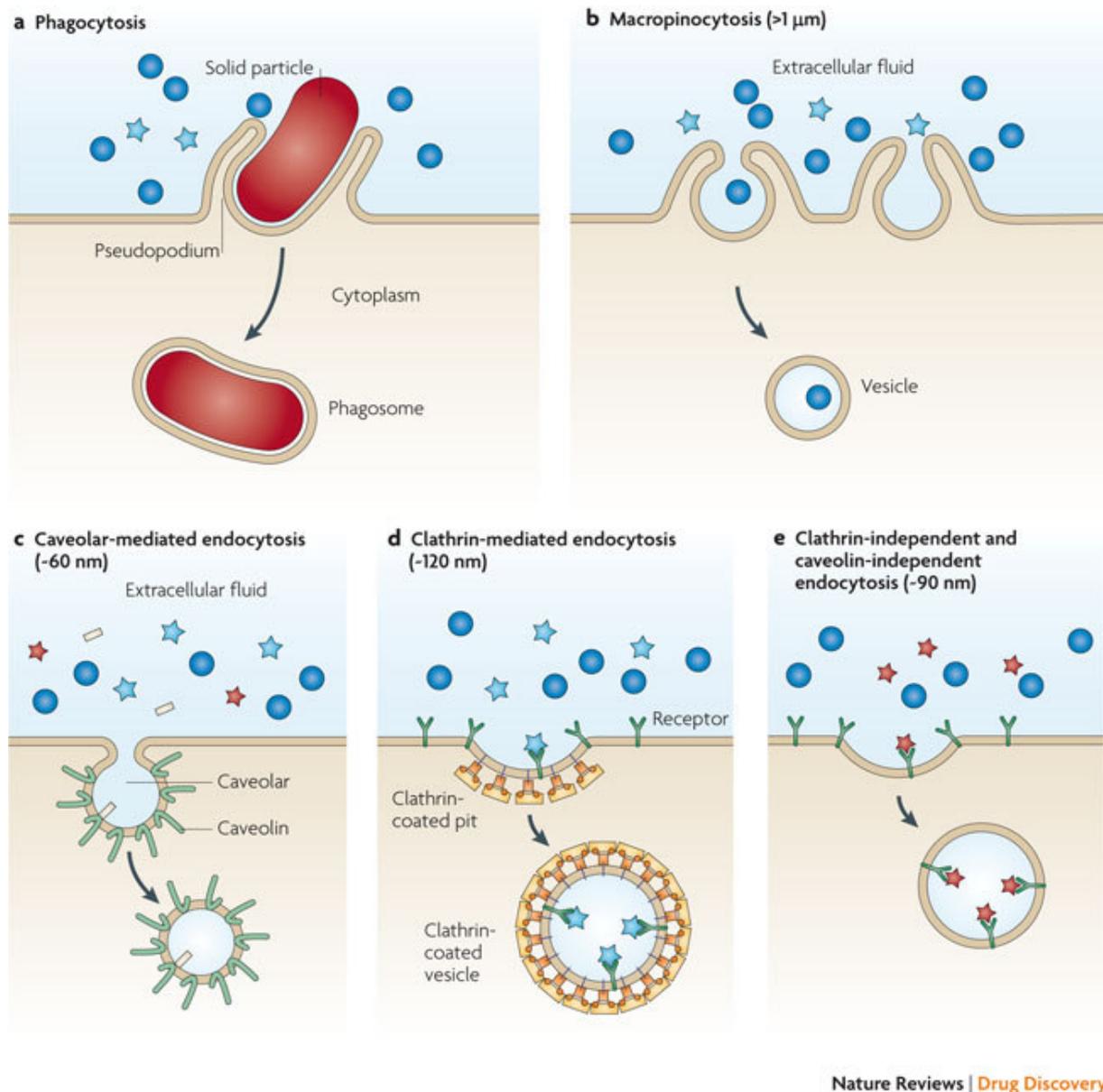


Abbildung 2.10: Darstellung von verschiedenen Aufnahmewegen in die Zelle.^[101]

Hierbei wird der Aufnahmeprozess durch die Größe der aufgenommenen Strukturen definiert. Generell lagern sich zunächst die extrazellulären Substanzen an die Zellmembran an. Anschließend stülpt sich die Zellmembran ein und bildet ein Vesikel (Endosom) innerhalb der Zelle, das die extrazellulären Substanzen enthält. Zu den rezeptorgesteuerten Aufnahmeprozessen zählen die Clathrin- und die Caveolin-vermittelte

Endozytose. Clathrin und Caveolin sind Proteine, die an der Aufnahme von Nanopartikeln maßgeblich beteiligt sind. Die Clathrin-vermittelte Endozytose findet über eine Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung statt und ist der bevorzugte Aufnahmeweg für Partikel bis zu 200 nm.^[102] Hierbei erfolgte die Unterscheidung der Aufnahmeprozesse durch Inhibition der jeweiligen Proteine.^[103] Die internalisierten Nanopartikel befinden sich unabhängig vom Aufnahmeweg zunächst in frühen Endosomen, die über späte Endosomen (pH~5 bis 6) zu Lysosomen pH~4.5 bis 5 reifen.^[104] Nanopartikel kleinerer Größe werden über die Caveolin-vermittelte Endozytose aufgenommen. Caveolae sind 50 bis 80 nm große flaschenförmige Einbuchtungen in der Plasmamembran.^{[105],[106]} Zudem können Nanopartikel in Zellen über nicht-membranrezeptorgesteuerte Wege aufgenommen werden, sodass sich die Nanopartikel im Zytosol befinden (Pinozytose).^[107] Dabei findet die Anlagerung der Partikel zunächst über intermolekulare Wechselwirkungen (elektrostatische Wechselwirkung, Van-der-Waals-Wechselwirkungen) statt.^[108]

Nanopartikel konnten bisher in verschiedenen subzellulären Einheiten gefunden werden. Beispielsweise wurden C₆₀-Fullerene mit einem Durchmesser von ca. 0.7 nm nach Inkubation unter anderem im Nukleus gefunden.^[109] Dabei gelangen die Strukturen über Ionenkanäle und Poren der Kernmembran bis in den Zellkern. Zudem wurden Nanopartikel innerhalb von Mitochondrien gefunden.^[108] Wenn Nanopartikel innerhalb des Zellkerns die DNA beschädigen, kann dies direkt zum Zelltod (Nekrose) führen. Verschiedene Studien belegen, dass Nanopartikel (Fullerene und Quantenpunkte) zu oxidativem Stress (Entstehung von reaktiver Sauerstoffspezies) führen können, sodass die DNA, Proteine und Lipide verändert werden und dies zur Nekrose führen kann.^[108]

2.5. Messmethoden

2.5.1. Elektronenmikroskopie

Zur optischen Charakterisierung von Nanopartikeln sind Mikroskope mit einer Auflösung im Nanometerbereich notwendig. Das Auflösungsvermögen ist entsprechend der Gleichung von Abbe von der Wellenlänge λ abhängig (s. Gleichung (2.3)).^[110]

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{n * \sin\alpha} \quad (2.3)$$

d : Auflösungsvermögen, $n * \sin\alpha$: numerische Apertur. Hierbei ist α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs und n der Brechungsindex der Probe.

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und die Rastertransmissionselektronenmikroskopie (STEM) sind häufig verwendete analytische Verfahren, die Vergrößerungen bis unter 50 pm (TEM)^[111] bzw. 130 pm (STEM)^[112] liefern. Folglich werden beide Verfahren in der Nanotechnologie zur Größenbestimmung und zur Bestimmung des Grades der Polydispersität nanoskaliger Partikel verwendet. Zudem ist die Aufklärung atomarer Strukturen möglich.^[111] Im Gegensatz zum herkömmlichen Lichtmikroskop werden beim Elektronenmikroskop anstelle von sichtbarem Licht Elektronen verwendet.

Beschleunigte Elektronen besitzen eine erheblich geringere Wellenlänge als Licht im sichtbaren Spektralbereich. Louis de Broglie postulierte im Jahr 1924 diesen Zusammenhang zwischen Teilchenstrahlen und Wellen, den so genannten Welle-Teilchen-Dualismus, der von Davisson und Germer experimentell bestätigt wurde.^[113] Ein Teilchen kann mit dem Impuls p als Materiewelle der Wellenlänge

$$\lambda = h/p \quad (2.4)$$

beschrieben werden. Dabei verhält sich die Wellenlänge der Elektronen umgekehrt proportional zur Beschleunigungsspannung. Bei einer Beschleunigungsspannung eines TEM von 200 kV bzw. 300 kV liegen die Wellenlängen bei 2.51 pm bzw. 1.97 pm und sind demnach fünf Größenordnungen kleiner als die des sichtbaren Lichts. Dementsprechend führt eine Erhöhung der Beschleunigungsspannung zur höheren Auflösung des Mikroskops.

1930 begannen Ruska und Knoll mit der Entwicklung des Elektronenmikroskops, bei dem das Untersuchungsobjekt mit Elektronen durchstrahlt wird.^[114] Nach wenigen Jahren hatte dieses Verfahren die Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops unterboten. Dabei ist der prinzipielle Aufbau eines TEM bis heute nahezu gleich geblieben und ist eng verwandt mit dem Aufbau eines herkömmlichen Lichtmikroskops.

TEM werden unter Hochvakuum betrieben, um eine Streuung des Elektronenstrahls mit Gasatomen und -molekülen zu minimieren. Die Elektronenquelle besteht meist aus

einer klassischen Wolfram-Glühkathode, einer LaB₆-Kathode oder einer Feldemissionskathode (z. B. im hoch-auflösendem TEM (HR-TEM)).^[115] Die so gebildeten Elektronen laufen anschließend von der Kathode zur Anode, die ein elektrisches Feld zur Beschleunigung und Absaugung der Elektronen erzeugt. Die Beschleunigungsspannung des in dieser Arbeit verwendeten TEM liegt bei 80 kV. Die beschleunigten Elektronen werden durch die Objektivlinse in der Zwischenbildebene zu einem Bildpunkt vereinigt. Die Gesamtheit der von allen Objektpunkten erzeugten Bildpunkte ergibt das Bild des zu untersuchenden Objekts. Dieses Zwischenbild wird im Folgenden durch die Zwischenlinse und die Projektivlinse vergrößert und auf dem Leuchtschirm/Detektor abgebildet (s. Abbildung 2.11).^{[116],[117]}

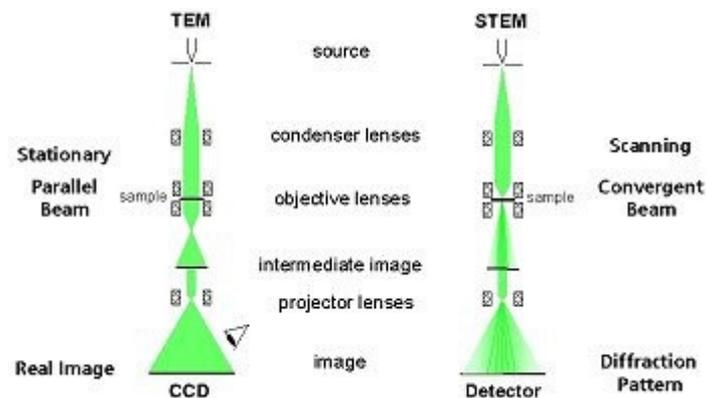


Abbildung 2.11: Vergleich des Strahlengangs im TEM und STEM Mode.^[118]

Bei der TEM wie auch bei der STEM spielen ausschließlich elastisch gestreute Elektronen eine Rolle bei der Erzeugung des Z-Kontrastes. Umso größer die Ordnungszahl der bestrahlten Materie ist, desto höher ist der Z-Kontrast. Die Bildentstehung beim STEM erfolgt analog zum Rasterelektronenmikroskop (s. Abbildung 2.11). Hierbei wird eine Probe mit dem Elektronenstrahl abgerastert. Die Probe muss ähnlich wie beim TEM dünn sein, da bei der STEM ebenfalls in Transmission gemessen wird.

2.5.2. Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Methode zur Größenbestimmung kolloidaler Nanopartikel mit einer Größe von 1 bis 1000 nm. Dabei liefert die DLS Informationen über den hydrodynamischen Radius (Stokes-Radius), den Grad der Polydispersität und die Aggregation von Kolloiden.

Fein verteilte Nanopartikel in Lösemitteln, so genannte Dispersionen, befinden sich in Brownscher Molekularbewegung (Eigenbewegung kolloidaler Systeme aufgrund ihrer thermischen Energie). Misst man mit Hilfe der DLS-Methode das gestreute Licht eines Lasers an dispergierten Nanopartikeln, so kommt es zu einer zeitlichen Änderung der Streuintensität, da sich die Abstände der Streuzentren aufgrund der Brownschen Molekularbewegung ständig ändern. Analysiert man diese Fluktuation als Funktion der Zeit, so kann man die Geschwindigkeit, mit der sich die Kolloide im Lösemittel bewegen, ermitteln. Daraus ist wiederum der Diffusionskoeffizient ableitbar.^[119]

Der Diffusionskoeffizient ist umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Durchmesser (s. Stokes-Einstein-Gleichung (s. Gleichung (2.5))).

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta_0 d} \quad (2.5)$$

D : Diffusionskoeffizient, k_B : Boltzmann-Konstante, T : absolute Temperatur, η_0 : dynamische Viskosität und d : hydrodynamischer Durchmesser

Die Stokes-Einstein-Gleichung verdeutlicht, dass der Diffusionskoeffizient von großen Partikeln klein wird, da sich die Nanopartikel langsamer bewegen, während der Diffusionskoeffizient kleiner Partikel groß wird, da sich die Partikel schneller bewegen.

Die Fluktuation des gestreuten Lichts wird mit Hilfe der Autokorrelations-Funktion $g^{(2)}(\tau)$ analysiert (s. Gleichung (2.6)).

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2.6)$$

$g^{(2)}(\tau)$: normierte Intensitäts-Autokorrelations-Funktion, $I(t)$: Intensität zur Zeit t , τ : Zeitverzögerung, $\langle I(t) \rangle^2$: Normierungsfaktor, $\langle \rangle$: zeitlicher Mittelwert

Wenn sich die Partikel in Brownscher Molekularbewegung befinden, so lässt sich die normierte Intensitäts-Autokorrelations-Funktion $g^{(1)}(\tau)$ mit einer Exponentialfunktion beschreiben (s. Gleichung (2.7)).

Wenn die Partikel monodispers sind, so ist $g^{(1)}(\tau)$ eine einfache Exponentialfunktion:

$$g^{(1)}(\tau) = B \exp(-\Gamma \tau) \quad (2.7)$$

Zur weiteren Analyse ist es nützlich die Intensitäts-Korrelations-Funktion zu einer Autokorrelations-Funktion des elektrischen Feldes zu konvertieren (s. Gleichung (2.8)).

$$g^{(2)}(\tau) = [g^{(1)}(\tau)]^2 + 1 \quad (2.8)$$

wobei Γ die Abklingkonstante ist, die proportional zum Diffusionskoeffizienten D ist (s. Gleichung (2.9)):

$$\Gamma = Dq^2 \quad (2.9)$$

q ist dabei der Streufaktor. Für polydisperse Partikel muss eine Summe von Exponentialfunktionen gefunden werden, da die Fluktuation des gestreuten Lichtes von den Diffusionskoeffizienten der Partikel unterschiedlicher Größe abhängt.

Die Intensitäts-Autokorrelations-Funktion kann zudem in die Feldkorrelationsfunktion G_I umgerechnet werden. An den Logarithmus von G_I kann nun ein Polynom angepasst werden, dieses bezeichnet man als Kumulanten-Anpassung (s. Gleichung (2.10)).

$$\ln(G_I) = a + b\Gamma + c\Gamma^2 + d\Gamma^3 + e\Gamma^4 \dots \quad (2.10)$$

Der Polydispersitätsindex (PDI) ergibt sich aus der Anpassungskonstanten c geteilt durch $2\Gamma^2$ und ist ein Maß für die Polydispersität der Probe. Dabei ermöglicht der PDI die Beurteilung der Größenverteilung:^[120]

- PDI < 0.05 sehr enge Verteilung
- 0.05 < PDI < 0.15 enge Verteilung
- 0.15 < PDI < 0.25 breite Verteilung
- 0.25 < PDI < 0.5 sehr breite Verteilung
- PDI > 0.5 PDI nicht sinnvoll anwendbar.

2.5.3. Elektrophoretische Lichtstreuung

Bei der Bestimmung des Zeta-Potentials wird das elektrische Potential von dispergierten Partikeln ermittelt. Da das Potential erhebliche Auswirkungen auf die Wechselwirkung mit anderen Materialien hat, ist die elektrophoretische Lichtstreuung von großer Bedeutung. Viele dispergierte Partikel haben eine positive oder negative Oberflächenladung. Um die elektrische Neutralität zu wahren, umgeben hohe Konzentrationen an entgegengesetzt geladenen Ionen geladene Partikel (Sternschicht). Um diese Ionenschicht bildet sich wiederum eine weitere Schicht von Ionen entgegengesetzter Ladung (diffuse Schicht). Dies Phänomen (Sternschicht und diffuse Schicht) wird als elektrische Doppelschicht beschrieben (s. Abbildung 2.12).

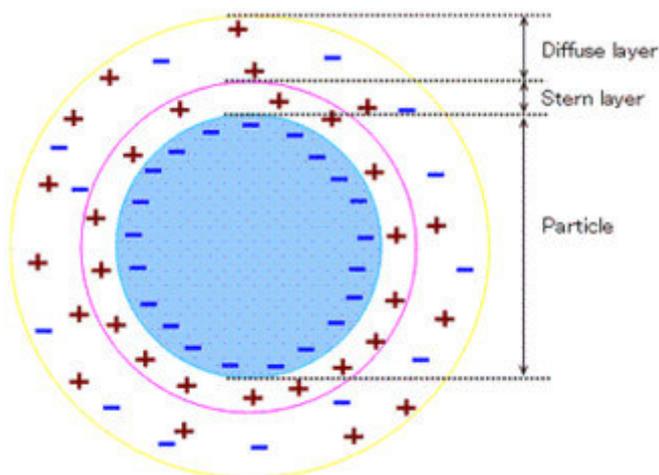


Abbildung 2.12: Elektrische Doppelschicht eines geladenen Partikels.^[119]

Aufgrund der thermischen Bewegung von Partikeln, ist die Konzentration von Gegenionen Nahe der Partikeloberfläche am größten, da durch die Relativbewegung zwischen fester und flüssiger Phase die diffuse Schicht teilweise abgestreift wird. Die Grenze zwischen elektrostatisch gebundenen und beweglichen Ionen wird als Scherebene (engl.: *slipping plane*) bezeichnet. Das Potential an der Scherebene entspricht dem Zeta-Potential (s. Abbildung 2.13).^[119]

Die Stabilität dispergierter Partikel hängt von der Oberflächenladung der Partikel ab. Ist das Zeta-Potential hoch, sind die Nanopartikel aufgrund der gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung stabil. Umgekehrt führen geringe Zeta-Potentiale zu erhöhter Wahrscheinlichkeit der Aggregation von Partikeln, sofern keine ausreichende sterische und/oder elektrostatische Stabilisierung vorliegt.^[119]

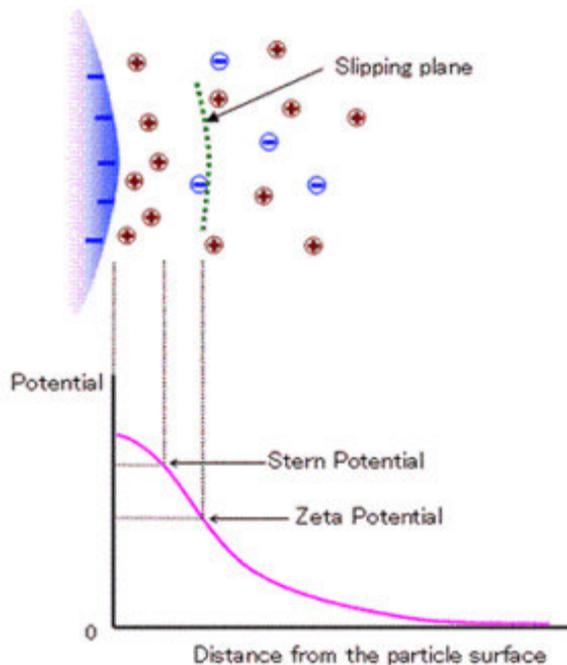


Abbildung 2.13: Konzept des Zeta-Potentials.^[119]

Mittels Elektrophorese, also durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden geladene, dispergierte Partikel in Richtung der Elektrode entgegengesetzter Ladung beschleunigt. Da die Bewegungsgeschwindigkeit proportional zum Oberflächenpotential der Partikel ist, kann durch Bestimmung der Partikelgeschwindigkeit auf das Zeta-Potential geschlossen werden. Zur Bestimmung der Partikelgeschwindigkeit wird die Dispersion mit einem Laser bestrahlt. Anschließend wird das von Partikeln gestreute Licht detektiert. Die dabei auftretende Frequenzverschiebung zwischen eingestrahlttem und gestreutem Licht v_D ist hierbei aufgrund des Dopplereffekts proportional zur Partikelbeweglichkeit U (s. Gleichung (2.11)).^[119]

$$v_D = \frac{Uq}{2\pi} \cos \frac{\theta}{2} = \frac{Un}{\lambda} \sin \theta \quad (2.11)$$

$q = \frac{4\pi n \sin \frac{\theta}{2}}{\lambda}$: Streuvektor, λ : Wellenlänge des Primärstrahls, n : Brechungsindex des Mediums, θ : Streuwinkel

In wässrigen Lösungen, die Elektrolyten enthalten, kann das Zeta-Potential (ζ) über die Smoluchowski Gleichung berechnet werden (s. Gleichung (2.12)).

$$\zeta = \frac{n}{\epsilon_0 \epsilon_r} U \quad (2.12)$$

ε_0 : Dielektrische Konstante des Vakuums, ε_r : Dielektrische Konstante des Lösemittels^[119]

2.5.4. Fluoreszenzmikroskopie

In unseren Experimenten wurde die Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung von Zellen auf dem Probenträger verwendet.

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie und wird beispielsweise zur Charakterisierung von biologischen Proben eingesetzt. Hierbei werden Fluorochrome (beispielsweise 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und 4-(4-Diethylaminostyryl)-1-methyl-pyridinium-iodid (4-Di-2-Asp)) mit Zellen inkubiert, um zum Beispiel die DNA oder die Zellmembran von Zellen anzufärben. Das in dieser Arbeit verwendete 4-Di-2-Asp bindet dabei an entsprechende Membranrezeptoren.

Der Fluorophor wird dabei mit elektromagnetischer Strahlung angeregt. Dabei wird ein Elektron aus einem Orbital gelöst und in einen angeregten Zustand gehoben. Somit befindet sich der Fluorophor in einem instabilen elektronisch angeregten Singulett-Zustand (S_1 oder S_2). Daraufhin findet eine strahlungslose Schwingungsrelaxation (engl.: *Internal Conversion*) statt. Aus dem resultierenden S_1 -Zustand sind mehrere Relaxationen in den Grundzustand möglich (s. Abbildung 2.14).

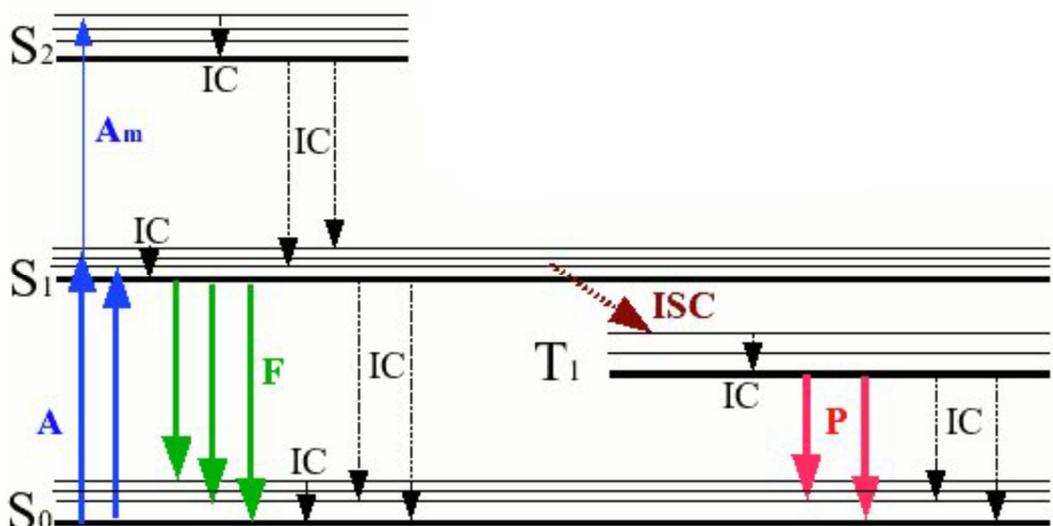


Abbildung 2.14: Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung der Anregungs- und Relaxationsprozesse unterschiedlicher elektronischer Zustände. $S_{0,1,2}$: Energieniveaus von Singulett-Zuständen, T_1 : erster Tripletzustand, A: Anregung, Am: multiphotonische Anregung, IC: Interne Konversion, F: Fluoreszenz, ISC: Intersystem Crossing, P: Phosphoreszenz.^[121]

Durch Fluoreszenz, bei der ein Photon emittiert wird, gelangt das Elektron in den Grundzustand (S_0). Da das Elektron spinpaart mit dem im Grundzustand verbliebenen Elektron ist, ist die Fluoreszenz spinerlaubt und läuft schnell ab ($< 10^{-8}$ s). Ein anderer Relaxationsprozess kann über einen Triplett-Zustand erfolgen (engl.: *Intersystem Crossing*). Hierbei wird über Spinumkehr der Triplett-Zustand erreicht, da das im Grundzustand verbliebene Elektron den gleichen Spin hat. Der direkte Übergang von T_1 auf den S_0 Zustand ist quantenmechanisch verboten. Erst nach erneuter Spinumkehr kann das Elektron unter Emission eines Photons in den Grundzustand übergehen.^[35] Dementsprechend hat die Phosphoreszenz eine längere Abklingzeit als die Fluoreszenz von ca. 10^{-3} s.^[122]

In einem Fluoreszenzmikroskop wird Anregungslicht über einen Anregungsfilter monochromatisiert, damit die Anregungsenergie definiert ist. Über den Strahlteiler wird die Strahlung durch ein Objektiv auf das Untersuchungsobjekt gelenkt. Die dabei entstehende fluoreszierende Strahlung wird durch den Strahlteiler selektiv passieren gelassen. Die Strahlung wird durch einen Filter zum Okular gelenkt. Die Detektion findet durch einen Photomultiplier oder eine CCD-Kamera statt (s. Abbildung 2.15).^[123]

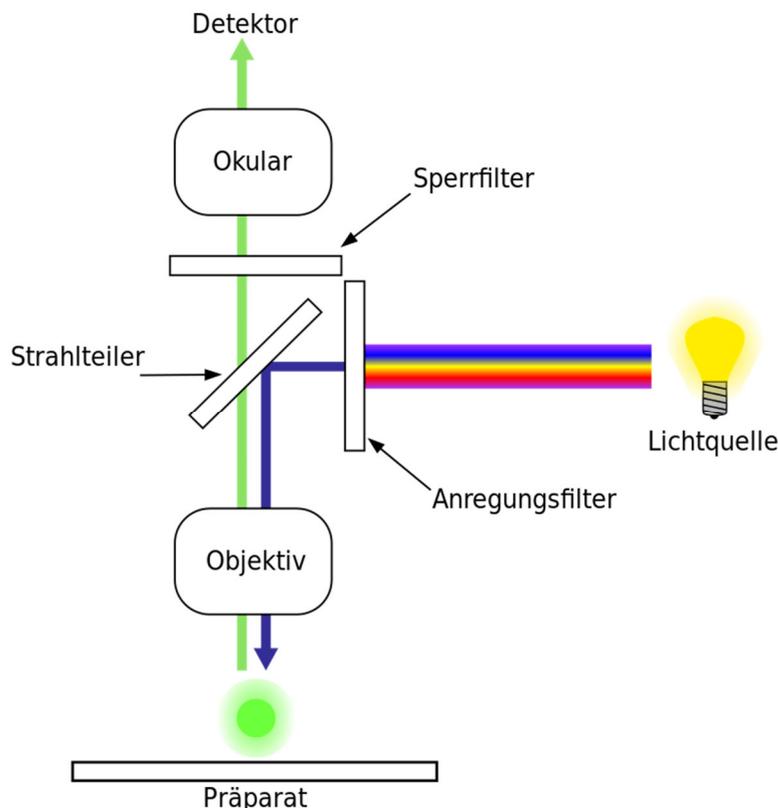


Abbildung 2.15: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.^[123]

2.5.5. Synchrotronstrahlung

Es wurden Messungen am HZB (BESSY II) und an der „Swiss Light Source“ (SLS, PSI, Schweiz) am Strahlrohr PolLux durchgeführt.

Synchrotronstrahlung bezeichnet man als elektromagnetische Strahlung im Bereich der IR- bis zur γ -Strahlung, die tangential zur Bewegungsrichtung geladener Teilchen emittiert wird, wenn sich diese mit relativistischer Geschwindigkeit bewegen. Diese Photonenpakete sind eine Form der Bremsstrahlung, da die Ablenkung der Elektronen von einer geraden Bahn einer Änderung des Geschwindigkeitsvektors, also einer Beschleunigung, entspricht.

Zunächst werden Elektronen aus einer Elektronenkanone emittiert und im Ultrahochvakuum durch eine Anodenspannung von 70 kV beschleunigt. Die Elektronen werden in einen Teilchenbeschleuniger (Mikrotron) injiziert und auf ca. 50 MV beschleunigt. Anschließend werden die Elektronen in das Synchrotron injiziert. Hierbei werden die Elektronen fast auf Lichtgeschwindigkeit beschleunigt (1.7 GV).^[124] Bei der Injektion der Elektronen in den Speicherring der Anlage BESSY II/SLS besitzen die Elektronen eine Energie von etwa 1.7 GV/2.4 GV) (s. Abbildung 2.16).^[125] Magnete zwingen Elektronen auf eine Kreisbahn im Speicherring. Dipole ermöglichen hierbei die kreisförmige Umlaufbahn, Quadrupole kompensieren das Auseinanderdriften von Elektronen und Sextupole sorgen für eine Korrektur der Flugbahn und eine längere Speicherung der Elektronen im Speicherring.

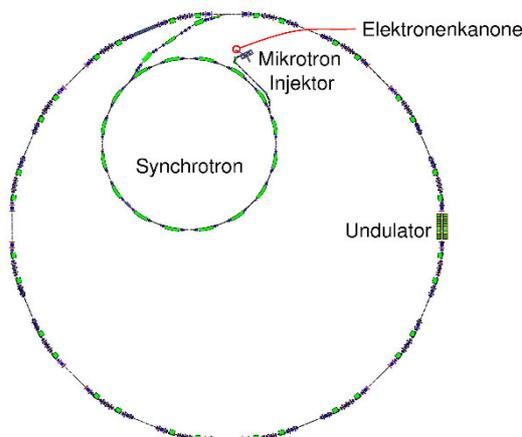


Abbildung 2.16: Elektronenspeicherring.^[126]

Durch ein Hochvakuum wird die Wahrscheinlichkeit einer Kollision mit Restgasmolekülen reduziert. Aufgrund des breiten Spektrums und der hohen Intensität und Brillanz

der Synchrotronstrahlung wird diese zur Untersuchung zahlreicher Proben eingesetzt. Mit Röntgenmikroskopie können daher auch biologische Proben untersucht werden. Trifft Röntgenstrahlung auf Materie, so kommt es zur Verminderung der Intensität. Die Abschwächung der Intensität des Primärstrahls kann durch das Lambert-Beersche-Gesetz beschrieben werden (s. Gleichung (2.13)).

$$I = I_0 * \exp(-\mu x) \quad (2.13)$$

Dabei gibt es eine Abhängigkeit der Intensität nach Durchstrahlen der Materie (I) und der Anfangsintensität (I_0), wobei x der zurückgelegten Strecke der Strahlung und μ dem Schwächungskoeffizienten entspricht. Hierbei beruht die Absorption bei etwa 500 eV zum größten Teil auf dem Photoeffekt und ein zu vernachlässigender Anteil auf dem Compton-Effekt.^[127] Der Schwächungskoeffizient (μ) ist durch die Summe der Streu- (σ) und Absorptionskoeffizienten (τ) bestimmt (s. Gleichung (2.14)).

$$\mu = \tau + \sigma \quad (2.14)$$

Darüber hinaus ist der Schwächungskoeffizient (μ) materialabhängig und somit proportional der Ordnungszahl (Z) und der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes (λ).

$$\mu = \lambda^3 * Z^4 \quad (2.15)$$

2.5.6. Röntgenmikroskopie

Röntgen entdeckte, die nach ihm benannte Röntgenstrahlung im Jahr 1895. Röntgenstrahlung ist eine Form hochenergetischer Strahlung mit Wellenlängen zwischen 10^{-8} bis 10^{-12} m. Kurz nach der Entdeckung wurde die Relevanz der Untersuchung von biologischen Proben mittels Röntgenstrahlen erkannt.^[128] Jedoch standen zu diesem Zeitpunkt keine für Röntgenstrahlung geeigneten Optiken zur Verfügung. Bis zu den 1950er Jahren wurde mittels Röntgenstrahlung Schattenwurfmikroskopie oder Kontaktmikroradiographie durchgeführt.

Ein wichtiger Vorteil ist, dass durch die kurzen Wellenlängen Strukturen unter dem Beugungslimit von UV/VIS-Strahlung beobachtet werden können. Ein weiterer Vorteil

von Röntgenmikroskopie ist, dass diese an Proben eingesetzt werden kann, deren Struktur und Funktion an ein fluides Medium gebunden ist.^[129] Beispiele hierfür sind Zellen, Zellorganellen, jedoch ebenfalls Proben aus den Materialwissenschaften und der Kolloidchemie.^[129] Eine strukturverändernde Präparation wie bei der TEM durch Schneiden und Einbetten der Proben ist hierbei nicht nötig. Aufgrund der geringen Wellenlänge der Röntgenstrahlung bei BESSY II und der SLS kann eine hohe Ortsauflösung von etwa 15 nm erreicht werden.^{[130],[131]} Um diese hohe Auflösung zu erreichen, mussten zunächst optische Elemente (Zonenplatten) hergestellt werden, die mit Hilfe der Beugung von Röntgenstrahlung Proben abbilden. Ein Detektor (beispielsweise Photomultiplier) hinter der Probe misst den transmittierten Photonenfluss.^[132] Die mikroskopische Untersuchung mittels Röntgenstrahlung von biologischen Systemen (beispielsweise Zellen) findet im sogenannten Wasser-Fenster statt (s. Abbildung 2.17).

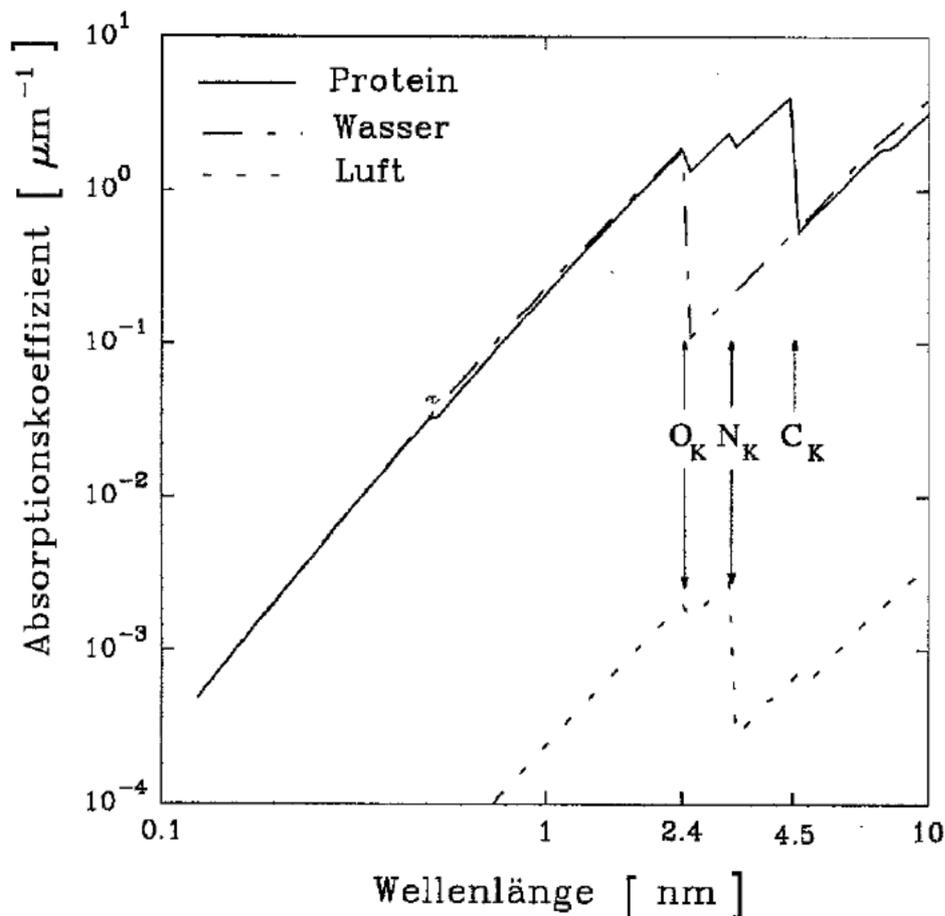


Abbildung 2.17: Linearer Absorptionskoeffizient von Protein, Wasser und Luft in Abhängigkeit weicher Röntgenstrahlung innerhalb des Wasserfensters (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von Springer eingeholt).^[129]

Dies befindet sich in einem Wellenlängenbereich von etwa 2.3 bis 4.4 nm. Hierbei handelt es sich um den Wellenlängenbereich der zwischen den K-Absorptionskanten des Sauerstoffs ($O_K = 543 \text{ eV}$) und des Kohlenstoffs ($C_K = 284 \text{ eV}$) befindet. Dieser Bereich wird als Wasserfenster bezeichnet, da die Absorption von Proteinen erheblich größer der Absorption des Wassers ist.^[129] In der vorliegenden Arbeit wird unterhalb der O_K -Kante bei einer Energie von 510 eV gemessen, da hier die Röntgenstrahlung ausreichend Energie besitzt, um Zellen unter einer 10 μm dicken Eisschicht abzubilden.^[133]

Um die zu untersuchenden Zellen vor Röntgenstrahlung zu schützen, wird eine dünne Eisschicht von etwa 10 μm oberhalb der Zellschicht erzeugt, sodass der Röntgenstrahl zunächst durch das Eis transmittiert. Die Eisschicht besteht dabei aus amorphem Eis, in dem die Wassermoleküle ungeordnet vorliegen. Durch zügiges Herunterkühlen der Zellproben auf -140 bis -180 °C entsteht amorphes Eis (s. Abbildung 2.18).^[134] Scharfkantige Eiskristalle können Zellen überlagern und so deren Abbildungen stören sowie zu morphologischen Veränderungen der Zellen führen.

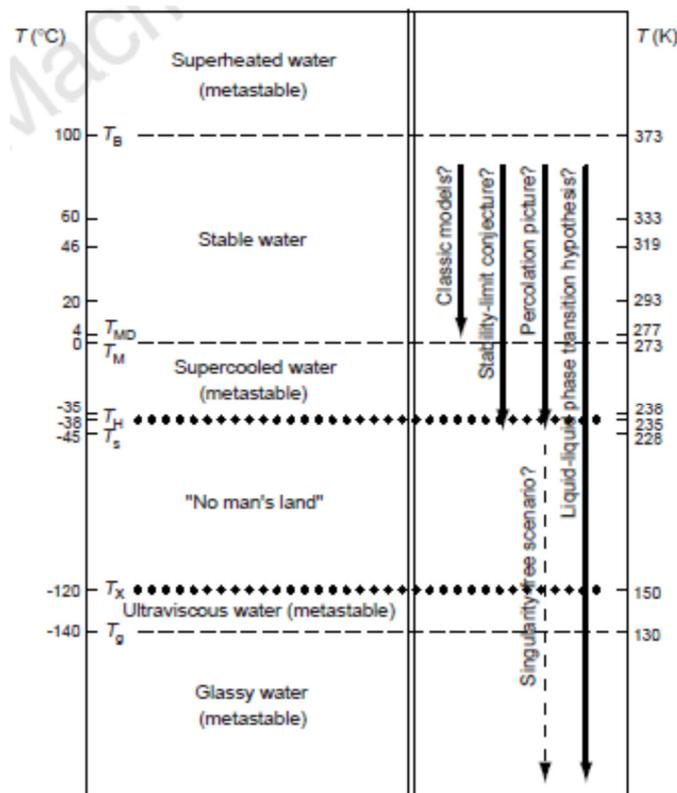


Abbildung 2.18: Eismodifikationen in Abhängigkeit der Temperatur bei Atmosphärendruck (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von der „Nature Publishing Group“ eingeholt).^[134]

2.5.6.1. Cryo-Röntgenmikroskopie/-tomographie und Raster-transmissionsröntgenmikroskop

Synchrotronstrahlung wird in einem Röntgenmikroskop (Cryo-Röntgenmikroskopie/-tomographie (engl.: *soft X-ray cryo-microscopy/tomography*, cryo-XM/T bei BESSY II) oder Rastertransmissionsröntgenmikroskopie (engl.: *Scanning Transmission X-ray Microscopy*, STXM an der SLS) zunächst durch einen Monochromator auf einen Kondensator gelenkt. Hierbei kann es sich um eine elliptisch geformte Glaskapillare (BESSY II) als auch um eine Fresnel-Zonenplatte (SLS) handeln. Im Fall der Fresnel-Zonenplatte (s. Abbildung 2.19) wird das monochromatische Licht durch eine Blende fokussiert, die ausschließlich Licht 1. Ordnung transmittieren lässt (engl.: *order-sorting aperture*, OSA). Unfokussiertes Licht 0. Ordnung und Licht höherer Ordnungen werden zunächst durch die Zonenplatten defokussiert und damit durch die OSA geblockt (s. Abbildung 2.20).

Eine Fresnel-Zonenplatte, die sowohl bei BESSY II als auch bei der SLS zum Einsatz kommt, ist ein radialsymmetrisches Transmissionsbeugungsgitter mit nach außen abnehmender Gitterkonstante. Hierbei wird der Primärstrahl gebeugt, sodass es zu einer konstruktiven Interferenz der Strahlung 1. Ordnung kommt. Die Fresnel-Zonenplatte besteht dabei aus abwechselnd durchlässigen und absorbierenden Ringen, deren Breite nach außen hin abnimmt (s. Abbildung 2.19).

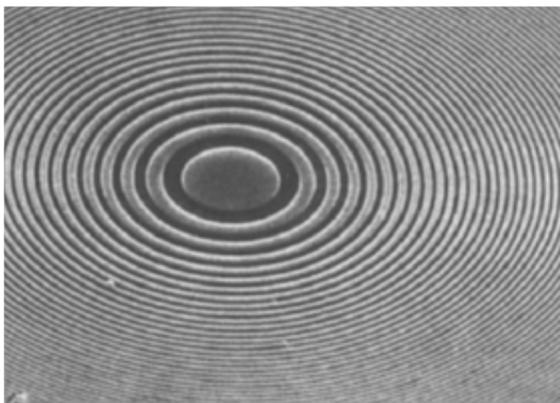


Abbildung 2.19: REM-Aufnahme des mittleren Teils einer hochauflösenden Zonenplatte aus Germanium (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von Springer eingeholt).^[129]

Die räumliche Auflösung, die durch Zonenplatten erreicht werden, wird durch die numerische Apertur der Kondensatorplatte und der Mikrozonplatte (NA_{MZP}) bestimmt.

$$NA_{MZP} = \frac{\lambda}{2\Delta r_{MZP}} \quad (2.16)$$

Hierbei ist λ die Wellenlänge und Δr_{MZP} die äußerste kleinste Zonenbreite. Chao et al. erreichte hierbei eine räumliche Auflösungen von etwa 12 nm.^[135] Die räumliche Auflösung des Mikroskops ist somit ähnlich der äußersten kleinsten Zonenbreite.^[132] Bei BESSY II ist durch Nutzung der Glaskapillare ausreichend Raum, sodass ein flacher Probenhalter um bis zu $\pm 79^\circ$ gedreht werden kann.^[136] Bei der SLS wird das Licht auf die semi-transparente Probe geleitet. Durch das Abrastern der Probe entsteht eine zweidimensionale Projektion der Probe.^[132]

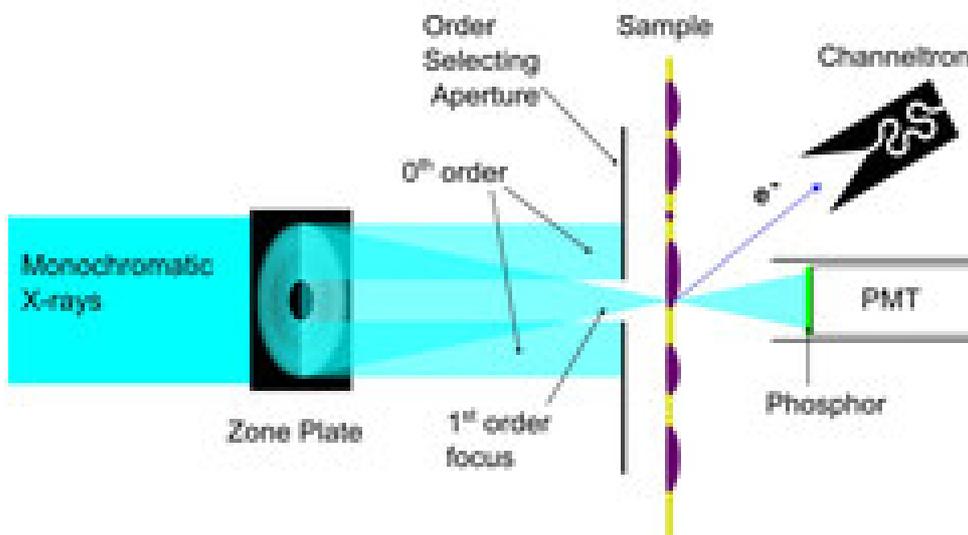


Abbildung 2.20: Aufbau des STXM bei der SLS.^[132]

Bei BESSY II wird das Licht, das die Probe transmittiert durch eine Fresnel-Zonenplatte auf eine CCD- (engl. *charged coupled device*) Kamera fokussiert (s. Abbildung 2.21).

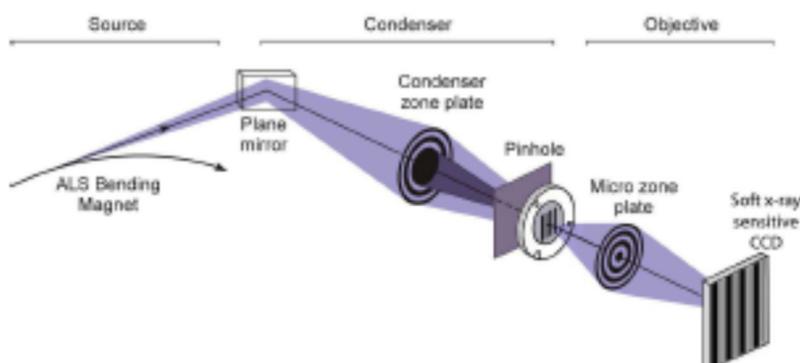


Abbildung 2.21: Aufbau des cryo-XM/T bei BESSY II.^[135]

Bei der Cryo-XM/T werden die Untersuchungsobjekte bei verschiedenen Winkeln abgebildet. Dazu wird ein euzentrischer Probenhalter verwendet auf dem die Probe befestigt wird und seriell um ca. $\pm 50^\circ$ oder $\pm 60^\circ$ mit 1° oder 2° Inkrementen rotiert wird. Werden die einzelnen Aufnahmen abgespielt, so wird hieraus ein Rohtomogramm erhalten. Aus diesem Rohtomogramm muss über eine Rückprojektion ein Tomogramm berechnet werden, da das Koordinatensystem des Rohtomogramms nicht gleich dem Koordinatensystem des Mikroskops und somit nicht gleich dem Koordinatensystem des Tomogramms ist. Dazu sind Berechnungen mit dem IMOD-Software-Paket (mit dem graphischen Benutzer-Interface ETomo) notwendig (s. Kapitel 2.5.6.2).

2.5.6.2. Berechnung eines Tomogramms

Zur Berechnung eines Tomogramms ist es notwendig, zunächst Einzelaufnahmen (Projektionen) des Rohtomogramms mit dem Programm „TILTALIGN“ anzupassen, sodass diese Projektionen einer Struktur entsprechen, die um eine bekannte Achse rotiert. Zudem ist diese Anpassung notwendig, da es bei der Drehung des Probenhalters zu einer lateralen Bewegung des Probenhalters kommen kann. Die Vergrößerung der Aufnahme kann somit aufgrund von vertikaler Bewegung des Probenhalters und imperfekter Fokussierung der Probe variieren. Zudem kann die Probe während der Bestrahlung leicht schrumpfen, da es durch die Bestrahlung zur Denaturierung von Proteinen kommen kann. Zur Anpassung werden Marker (in diesem Fall die inkubierten Goldnanopartikel bzw. Silica-ummantelte Goldnanopartikel) innerhalb der Proben verwendet. Die Positionen der Marker werden zu Projektionsgleichungen angepasst, um die korrekten Parameter zur Bestimmung der Tomogramme zu finden und die einzelnen Aufnahmen anzupassen.^[137] In Abbildung 2.22 ist die Geometrie der Projektion während der Erstellung der Rohtomographie der Probe veranschaulicht. Hierbei werden drei Koordinatensysteme berücksichtigt: Das des Mikroskops, der Probe und der Projektion (einer Einzelaufnahme des Rohtomogramms). Vor der Rotation der Probe sind die Koordinatensysteme des Mikroskops und der Probe koinzident. Die Achsen sind entsprechend x , y und z . Die Achsen der Projektionsaufnahmen des Rohtomogramms werden als u und v bezeichnet.

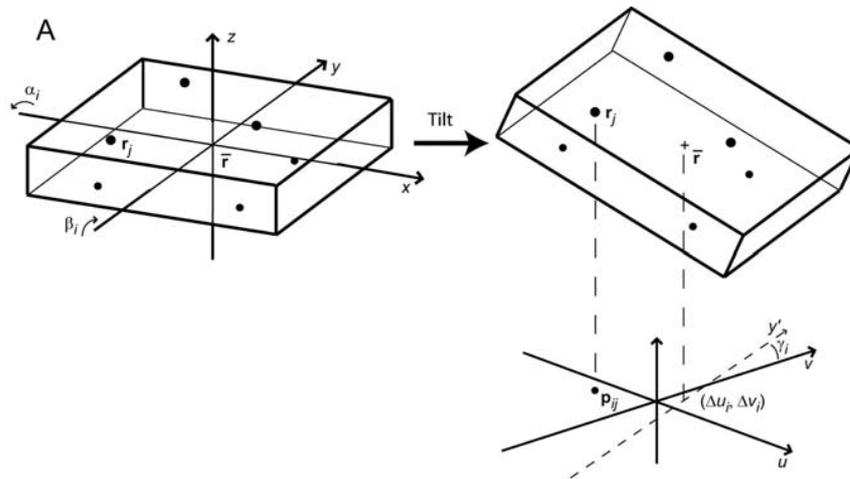


Abbildung 2.22: Projektion einer Probe. Das Koordinatensystem der nicht-rotierten Probe im cryo-XM/T entspricht (x, y, z) , während das Koordinatensystem der digitalisierten Aufnahme (u, v) entspricht. Für die i -te Projektion wird die Probe um den Winkel α_i um die x -Achse und um den Winkel β_i um die y -Achse gedreht. Die Projektionsaufnahme wird um den Winkel γ_i rotiert und um $(\Delta u_i, \Delta v_i)$ verschoben. Die Nanopartikelbojen werden wie folgt beschrieben: $r_j = (x_j, y_j, z_j)$ entspricht den Koordinaten der Probe der j -ten Projektion der Nanopartikel, $j = 1, \dots, n_T$, n_T entspricht der absoluten Anzahl an Markierungsbojen, $p_{oj} = (u_{ij}, v_{ij})$ sind die gemessenen Koordinaten der Projektion des j -ten Punktes in der i -ten Aufnahme, n_i entspricht der Anzahl von gemessenen Punkten in der i -ten Aufnahme, V_i entspricht der gemessenen Punktmenge in der i -ten Aufnahme, $j \in V_i$ ist der j -te Punkt in der i -ten Aufnahme (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von Springer eingeholt).^[138]

Die im Folgenden gezeigten Gleichungen repräsentieren ein Modell des Prozesses der Bildung der Rück-Projektion (von Rohtomogramm zu Tomogramm). Hierbei wird eine kleine Menge an Variablen in dem Modell, das von den Positionen der Nanopartikel in den Projektionsaufnahmen generiert wird, berücksichtigt. Das Projektionsmodell definiert, dass die Probe um die y -Achse rotiert wird und gegebenenfalls auch eine leichte Drehung um die x - und z -Achse erfolgt. Für die i -te Projektion gilt: α_i entspricht dem Drehwinkel um die x -Achse des Mikroskops, \mathbf{X}_i entspricht der Rotationsmatrix für die Drehung:

$$\mathbf{X}_i = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos\alpha_i & -\sin\alpha_i \\ 0 & \sin\alpha_i & \cos\alpha_i \end{bmatrix} \quad (2.17)$$

Darüber hinaus ist β_i der Drehwinkel um die y -Achse des Mikroskops und \mathbf{Y}_i ist das Produkt der Matrizen der Drehung und Projektion in die u, v -Ebene.

$$\mathbf{Y}_i = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \cos\beta_i & 0 & \sin\beta_i \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin\beta_i & 0 & \cos\beta_i \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos\beta_i & 0 & \sin\beta_i \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.18)$$

γ_i ist der Rotationswinkel um die z-Achse des Mikroskops nach Projektion in die u,v-Ebene mit der Rotationsmatrix \mathbf{R}_i .

$$\mathbf{R}_i = \begin{bmatrix} \cos\gamma_i & -\sin\gamma_i \\ \sin\gamma_i & \cos\gamma_i \end{bmatrix} \quad (2.19)$$

Neben der Rotation werden mit dem Programm „TILTALIGN“ Unterschiede in der Vergrößerung und Delokalisierungen in den Rohtomogrammen berechnet und gelöst. Hierbei entspricht $d_i = (\Delta u_i \Delta v_i)$ der Translation nach der Projektion in die u, v-Ebene. Durch ETomo (Programm zur Erstellung der Rückprojektion) wird mit einer Schätzung von d_i begonnen.

$$p'_{ij} = A_i r_j + d_i \quad (2.20)$$

Aus Gleichung (2.20) können für jedes d_i entsprechende r_i mittels Anpassung (Methode der kleinsten Quadrate) ermittelt werden. Anschließend werden d_i aus Gleichung (2.21) bis zur Konvergenz iteriert.

$$\mathbf{d}_i = \bar{\mathbf{p}}_i - \mathbf{A}_i \bar{\mathbf{r}}_i \quad (2.21)$$

Wobei

$$\bar{\mathbf{p}}_i = \sum_{j \in V_i} \frac{\mathbf{p}_{ij}}{n_i} \quad (2.22)$$

Die Mittelpunkte von Bildkoordinatenpunkten ($\bar{\mathbf{p}}_i$) gemessen in der i-ten Aufnahme sind konstant und

$$\bar{\mathbf{r}}_i = \sum_{j \in V_i} \frac{\mathbf{r}_j}{n_i} \quad (2.23)$$

sind die Mittelpunkte der Punkte der Projektion \bar{r}_i der i-ten Aufnahme entsprechend einer Summe von Variablen.

Eine übergangslose Rekonstruktion kann durch die Anpassung eines Satzes von Einzelaufnahmen des Rohtomogramms gebildet werden (s. Abbildung 2.23).

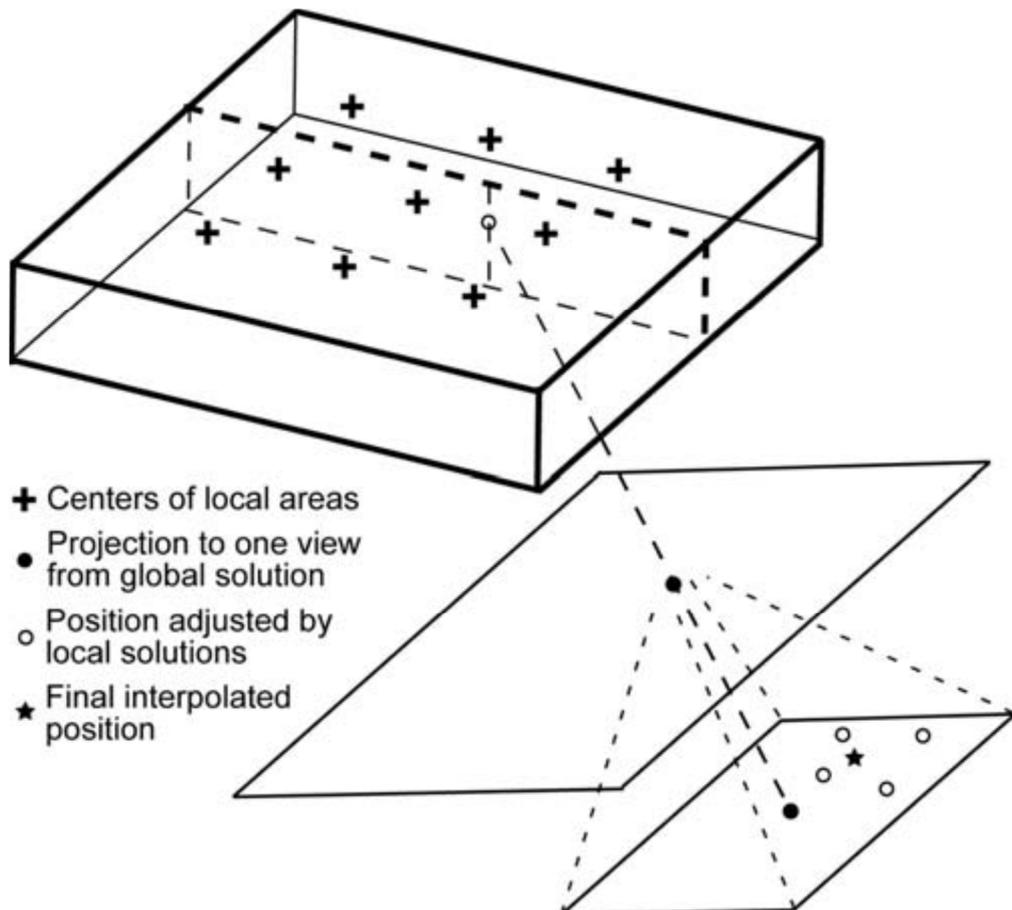


Abbildung 2.23: Darstellung der Erzeugung einer übergangslosen Rekonstruktion durch Nutzung eines Satzes von Anpassungen basierend auf Nanopartikelbojen in lokalen Schnittebenen. Die Graphik veranschaulicht wie die Position in dem rekonstruierten Volumen zu einem einzigen Punkt in der Projektion bei einem bestimmten Rotationswinkel der Probe abgebildet wird (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von Springer eingeholt).^[138]

Das Programm zur Erstellung der Rückprojektion (ETomo) nutzt dazu sämtliche angepasste Aufnahmen eines Satzes von Projektionen in die weiter oben beschriebenen Anpassungen vorgenommen werden. Die Kreuze in Abbildung 2.23 markieren die Zentren der einzelnen Schnittebenen. Jede Spalte von Punkten in der Rekonstruktion ist an einer bestimmten Position lokalisiert und grenzt an bis zu vier benachbarte Spalten. Der Punkt in der Schnittebene ist in der Spalte neben zwei benachbarten Zentren von zwei Schnittebenen lokalisiert. Dieser Punkt wird durch Rückprojektion einer bestimmten Position in jeder der angepassten Aufnahmen rekonstruiert. Der Projektions-

strahl und die gefüllten Kreise beschreiben die Position der Projektion bei einem bestimmten Drehwinkel vor der Anpassung. Die lokale Anpassung für jede einzelne der vier lokalen Bereiche werden verwendet um die modifizierte Position der Projektion zu finden (offene Kreise). Diese Positionen werden durch Interpolation basierend auf der Gewichtung des Abstandes des Punktes einer Spalte von den Zentren der lokalen Ebenen bestimmt.^{[137],[138]}

2.5.7. Atomabsorptionsspektrometrie

Die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) ist eine bewährte Methode zur quantitativen Analyse von Elementen in wässrigen Lösungen. Im Strahlengang des Atomabsorptionsspektrometers befindet sich eine Atomisierungskammer, in der die zu analysierende Probe atomisiert wird. Die Atomisierung kann in einem elektrisch beheizten Graphitrohr bei ca. 2450 °C (Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie) oder einer Luft-Acetylen-Flamme bzw. Lachgas-Acetylen-Flamme (Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie) stattfinden. Bei beiden Methoden wird anschließend die entstehende Atomwolke mit einem Lichtstrahl bestrahlt und detektiert, wie viel des eingestrahlten Lichtes einer bestimmten Wellenlänge durch die atomisierte Probe absorbiert wird. Dabei gilt das Lambert-Beersche-Gesetz (s. Gleichung (2.24)).

$$E = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon * c * d \quad (2.24)$$

Hierbei ist c die Konzentration der Lösung, d die Schichtdicke der Küvette, I_0 die Intensität des Primärstrahls und I die Intensität des austretenden Lichtstrahls. Mit steigender Konzentration des Analyten nimmt die Schwächung des eingestrahlten Lichts (Extinktion) proportional zu. Die AAS ist ein relatives analytisches Messverfahren. Zunächst wird die Extinktion eines Kalibrierungsstandards bekannter Konzentration aufgenommen und eine Kalibrierungskurve erstellt. Anschließend wird der Analyt vermessen. Ein großer Vorteil der AAS gegenüber zahlreichen anderen spektroskopischen Methoden besteht in der Elementselektivität der quantitativen Elementbestimmung. Die als Lichtquellen eingesetzten Lampen emittieren aufgrund der Zusammensetzung ihres Leuchtmittels (Hohlkathodenmaterial, Salz in einer elektrodenlosen Entladungslampe) ein elementspezifisches elektromagnetisches Spektrum.^[139]

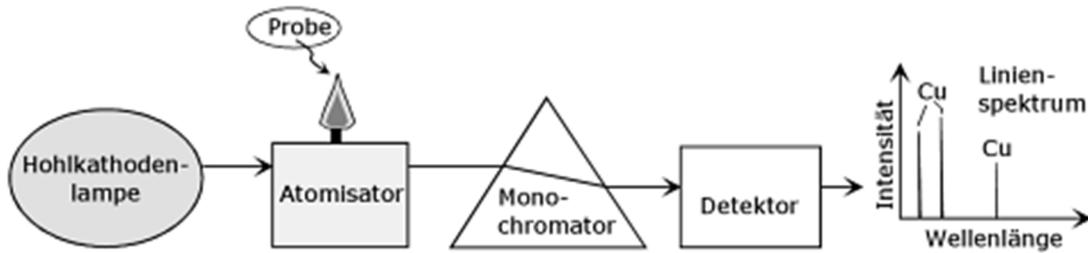


Abbildung 2.24: Aufbau einer AAS.^[140]

In dieser Arbeit wird ein AAS mit Luft-Acetylen-Flamme verwendet. Dazu muss zunächst der Analyt zerstäubt werden (s. Abbildung 2.25). Typische Nachweisgrenzen der verwendeten AAS entsprechen für Ag 1.5 µg/L, für Au 9 µg/L und für Si 90 µg/L.

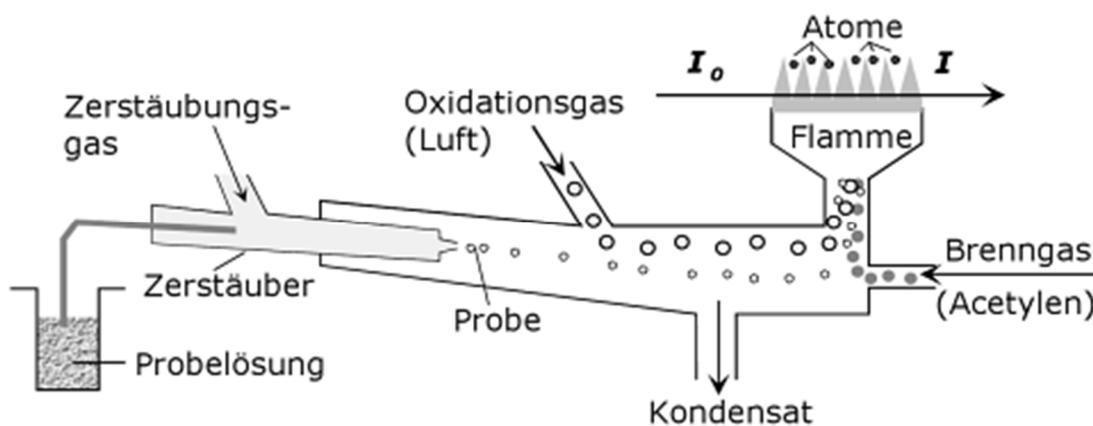


Abbildung 2.25: Zerstäuber und Brenner der Flammen-AAS.^[140]

2.5.8. UV/VIS-Spektroskopie

Bei der UV/VIS-Spektroskopie werden Lösungen oder Dispersionen mit elektromagnetische Strahlung im ultravioletten (UV) und sichtbaren Bereich (VIS) bestrahlt und der Analyt angeregt (s. Abbildung 2.14). Diese Proben werden mit einer Vergleichsprobe (Lösemittel) zusammen vermessen. Das Extinktionsspektrum der Vergleichsprobe wird von dem Extinktionsspektrum der Probe abgezogen. Aus dem resultierenden Extinktionsspektrum kann beispielsweise die Konzentration des Analyten über das Lambert-Beersche-Gesetz berechnet werden (s. Gleichung (2.24)).

3. Experimentaltteil

3.1. Geräte, Methoden und Chemikalien

3.1.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften

Sämtliche Reaktionen wurden bei RT in ausgeheizten Standardglasapparaturen, die zuvor mit 8%-iger Flusssäure und Königswasser gewaschen wurden, durchgeführt.

3.1.2. Geräte und Methoden

Dynamische Lichtstreuung (DLS) und elektrophoretische Lichtstreuung (ELS):

Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des Zeta-Potentials von Kolloiden erfolgte an dem Gerät Delsa Nano C (*Delsa™ Nano Submicron Particle Size and Zeta Potential Particle Analyzer*) von Beckman Coulter. Hierzu wurden die Nanopartikelproben in entsprechenden Lösemitteln dispergiert und vor der Messung mit einem sterilen Spritzenfilter (0.2 µm, Filtermaterial: Nylon, Polytetrafluorethylen, regenerierte Zellulose, Carl-Roth) um Staubpartikel zu entfernen, filtriert. Die Messungen der zu analysierenden Proben erfolgten in 1.5 ml Halbmikro-Plastikbrand-Einmalküvetten von VWR mit einer Schichtdicke von 10 mm bei 25 °C. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers wurden mindestens fünf Einzelmessungen mit Akkumulationszeiten von 50 bis 300 durchgeführt. Der Polydispersitätsindex der Probe wird von der Software *Delsa™ Nano* berechnet. Die Messungen zur elektrophoretischen Lichtstreuung werden in der Zetapotential-Messzelle von *Delsa™ Nano* durchgeführt.

ESI-FTICRMS: Die Proben wurden mit einem Ionspec QFT-7, Varian Inc., Lake Forest, CA, ausgestattet mit einem 7 T supraleitenden Magneten und einer Micromass Z-Spray ESI-Quelle, Waters Co., Saint-Quentin, Frankreich, analysiert. Die Solvensflussrate beträgt 4 µL/min. Die Sprayspannung wurde auf 3.8 kV gesetzt. Alle anderen Parameter wurden auf eine maximale Abundanz des jeweiligen [M+H]⁺ oder [M-H]⁻ optimiert.

UV/VIS-Spektroskopie: Die Proben wurden mit einem *Lambda 950 UV/VIS/NIR Spektrometer* von *Perkin Elmer* in 1.5 ml Halbmikro-Plastik-Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm von VWR vorgenommen.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM): Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen erfolgen an einem *Zeiss EM CR-Transmissionselektronenmikroskop* (Beschleunigungsspannung: 80 kV) bzw. mit einem *Zeiss EM 906-Transmissionselektronenmikroskop* (Beschleunigungsspannung: 80 kV). Die Nanopartikelproben wurden auf Kohlenstoffnetzchen (*Cu 400 mesh, Quantifoil®: 100 Carbon Support Films*) aufgebracht. Ultradünne Schnitte von Zellen mit einer Dicke von 70 nm werden an einem *Ultracut S, Leica* angefertigt und auf Kohlenstoffnetzchen aufgebracht.

Aus den erhaltenen Aufnahmen konnte mittels des Programms *Simple PCI* von C-Imaging die Partikelgröße ermittelt werden.

Rastertransmissionselektronenmikroskopie: Rastertransmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an einem *Hitachi SU8030* (Beschleunigungsspannung 30 kV) durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgte analog zur Probenpräparation für das Transmissionselektronenmikroskop.

Atomabsorptionsspektrometrie: Die quantitative Silberbestimmung von Silberdispersionen, Lösungen, die Silberionen enthalten und Zellen die Silbernanopartikel aufgenommen haben, erfolgte an einem *AAAnalyst 200* von *Perkin Elmer*. Zuvor wurden die Proben in konzentrierter Salpetersäure aufgelöst. Zur Kalibrierung des Atomabsorptionsspektrometers wurden Standards vermessen deren Matrix der Matrix der Proben entspricht. Dies bedeutet, dass sich die Standards und die Messlösungen nur in der Konzentration des zu bestimmenden Elements unterscheiden.

Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma: Zur Messung wird das Gerät *iCAP 6300 Duo* der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Die Proben (Haut, die mit Silicananopartikeln inkubiert wurde) werden in konzentrierter Natronlauge (4.3 M) aufgenommen und im Ultraschallbad für 60 min bei 50 °C aufgelöst.

Cryo-Röntgenmikroskopie/-tomographie: Am Strahlrohr U41 bei BESSY II am HZB wird das Cryo-Röntgenmikroskop betrieben. Durch zwei vorgeschaltete Undulatoren durchlaufen ankommende Elektronen, entgegengesetzte sinusförmige Bahnen und emittieren linear-polarisierte Synchrotronstrahlung (s. Abbildung 3.1).^[141]

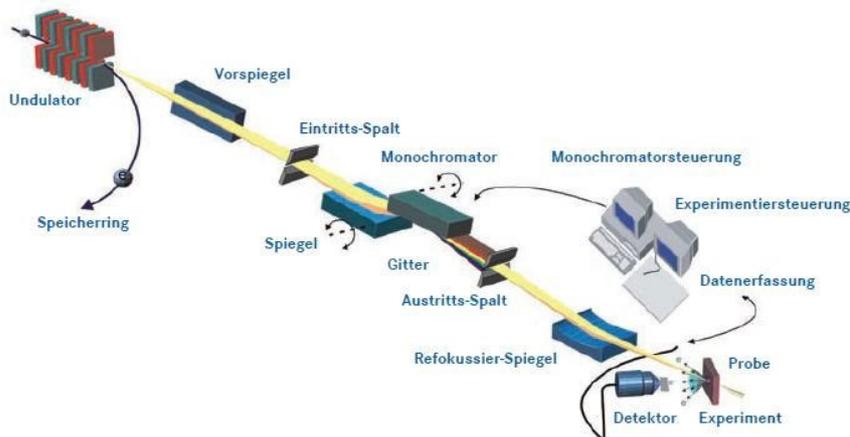


Abbildung 3.1 Genereller Aufbau eines Strahlrohrs bei BESSY II und SLS.^[142]

Mit Hilfe eines Toroidspiegels wird die linear-polarisierte Strahlung fokussiert.^[141] Die Strahlung wird auf den Eintrittsspalt eines Gittermonochromators gelenkt, indem die erforderliche Energie (510 eV) selektiert wird. Die Röntgenstrahlung trifft auf den Kondensator (elliptische Glaskapillare) und wird hierdurch auf die Probe fokussiert. Durch eine strahlungsundurchlässige Platte wird ausschließlich Strahlung der dritten Beugungsordnung durchgelassen (s. Abbildung 3.2).

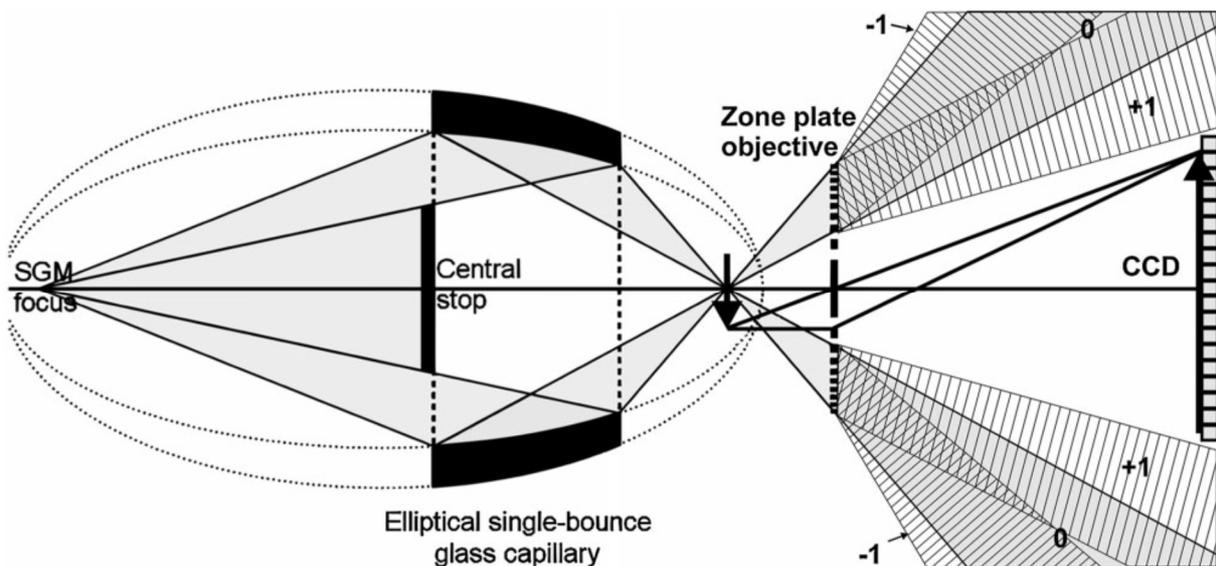


Abbildung 3.2: Aufbau eines optischen Röntgenmikroskops bei BESSY II. Der Kondensator (elliptische Glaskapillare) generiert die benötigte Hohlkegelbeleuchtung. Ausschließlich Röntgenstrahlung dritter Ordnung wird zur CCD-Kamera transmittiert.^[131]

Es wird eine elliptische Glaskapillare anstelle einer Kondensor-Fresnel-Zonenplatte verwendet, da somit eine höhere Ortsauflösung erzielt werden kann.^[131] Zudem weist dieser Kondensor einen geringen Strahlenverlust von etwa 20% auf. Durch die Verwendung von monochromatischer Röntgenstrahlung wird auf eine Lochblende direkt vor der Probe verzichtet.^[136] Das nachgestellte Objektiv (Fresnel-Zonenplatte) fokussiert die austretende Röntgenstrahlung auf eine CCD-Kamera. Die Auflösung des Mikroskops liegt bei etwa 14.3 nm.^[131]

Durch Verwendung eines Cryo-Probenhalters, der mittels eines Dewar-Gefäßes mit flüssigem Stickstoff gespeist wird, erfolgen die Messungen bei -196 °C . Hierbei ist der Probenhalter um $\pm 79^\circ$ drehbar, sodass mit diesem Aufbau Rohtomographien (mehrere Aufnahmen einer Probe bei verschiedenen Winkeln) durchgeführt werden können. Durch eine spätere Bearbeitung der Aufnahmen lassen sich dreidimensionale Rekonstruktionen der Zellen anfertigen.

Cryo-Fluoreszenzmikroskopie: Es wird ein Leica DMI6000B Cryo-Fluoreszenzmikroskop innerhalb des Cryo-Röntgenmikroskops, zur Lokalisierung der Zellen auf den Goldnetzchen verwendet. Hierbei werden Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm angefertigt. Als Lichtquelle dient eine HXP120 (D) Beleuchtungseinrichtung von Zeiss, an die ein flüssigkeitsgefüllter Lichtleiter gekoppelt ist. Zudem werden Filter von Zeiss verwendet, die Licht im spektralen Bereich von Rhodamin und grün fluoreszierenden Proteinen (GFP) durchlassen.

Rastertransmissionsröntgenmikroskopie: Rastertransmissionsröntgenmikroskopische Untersuchungen von Zellsystemen, die mit Nanopartikeln inkubiert wurden, werden an der Synchrotron-Lichtquelle Schweiz (SLS, PSI, Schweiz) am Strahlrohr Pol-Lux bei 510 eV an der O_K -Kante im Wasserfenster durchgeführt. Zuvor werden Zellproben, die mit Silbernanopartikeln inkubiert wurden, auf Kollagen-bedeckte Si_3N_4 -Membranen aufgebracht.^[143] Der generelle Aufbau eines Strahlrohrs an der SLS und bei BESSY II ist in Abbildung 3.1 veranschaulicht. Der Strahlengang des Mikroskops bei der SLS ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Mittels eines Toroidspiegels wird linear-polarisierte Strahlung fokussiert.^[130] Eine Fresnel-Zonenplatte fokussiert die monochromatische Röntgenstrahlung. Höhere Beugungsordnungen werden mittels einer Blende (engl.: *order-sorting aperture*, OSA) geblockt, sodass nur Strahlung erster Ordnung transmittiert wird.

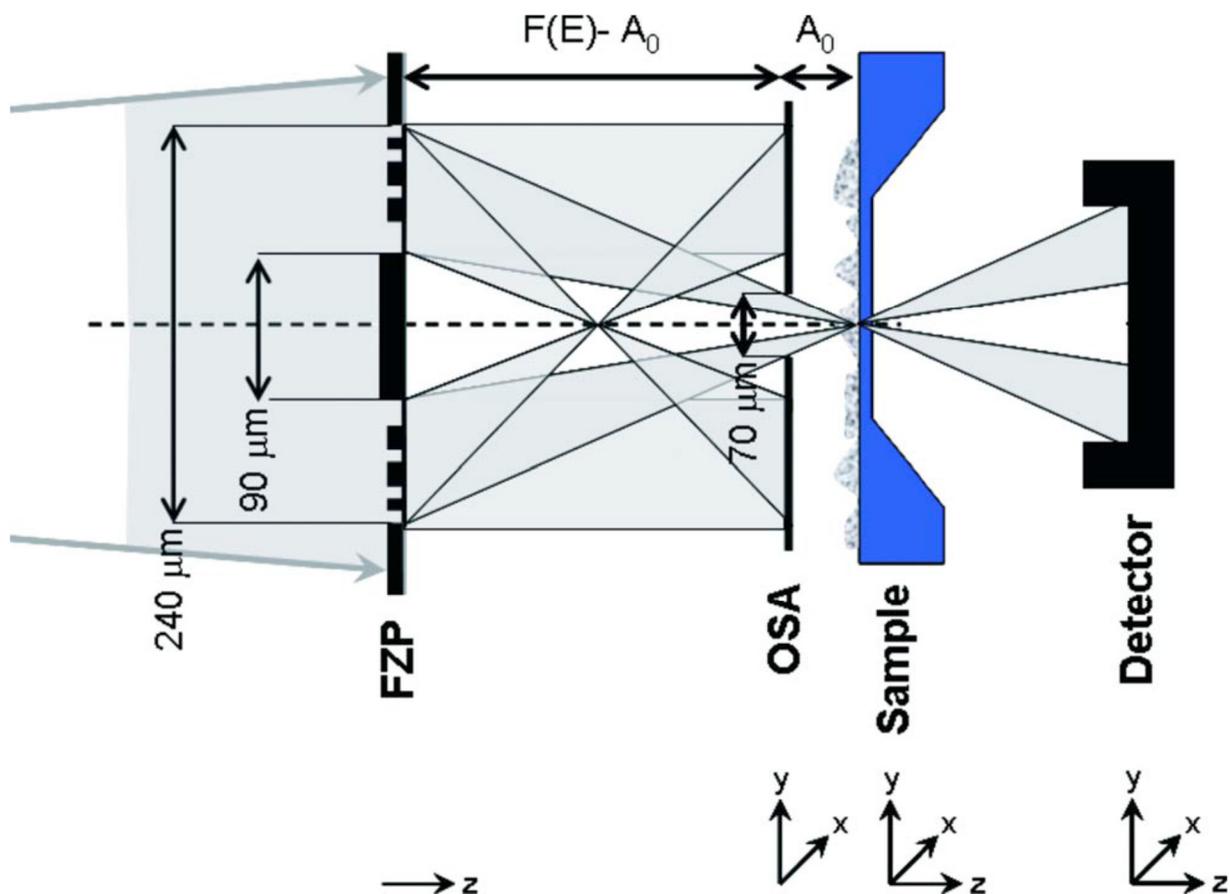


Abbildung 3.3: Strahlengang des Rastertransmissionsröntgenmikroskops bei der SLS.^[130]

Die Messungen erfolgen bei Raumtemperatur und bei 0.5 bar in einer Heliumatmosphäre.

Ultraschallbad: Es wird ein Ultraschallbad (*Bandelin Sonorex Super RK 514 H*) verwendet um hauptsächlich Nanopartikelproben zu redispergieren. Ultraschall-Spitzenleistung: 860 W, Betriebsfrequenz: 35 kHz.

3.1.3. Verwendete Chemikalien

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien

Verbindung	Abkürzung	Hersteller	Reinheit
3-Aminopropyl- trimethoxy-silan	APS	Sigma-Aldrich	97%
4-(4-Diethylaminostyryl)-1-methyl-pyridinium-iodid	4-Di-2Asp	Sigma-Aldrich	97%
Ammoniak (25%ig)	NH ₃	Carl Roth	reinst
Argon	Ar	Air Liquide	99.999%

Verbindung	Abkürzung	Hersteller	Reinheit
Chloroform	CHCl ₃	VWR	99.2%
Cyclohexan	-	Sigma-Aldrich	99.5%
Ethanol	-	Berkel AHK	99.9%
Ethylacetat	-	VWR	technisch
fetales Kälberserum	FCS	Lonza	-
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	Sigma-Aldrich	90%
Fluorwasserstoffsäure (40 bis 45%, auf ca. 8% verdünnt)	HF	Riesel de Haën	technisch
Goldnanopartikel ($d = (60 \pm 5) \text{ nm}$)	Au-NP	BBInternational	-
Igepal® CO-520	-	Sigma-Aldrich	-
Natriumacetat	-	Merck	98%
Natriumborhydrid	NaBH ₄	Sigma-Aldrich	99%
Natriumchlorid	NaCl	Grüssing	99.5%
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH=7.4	PBS	Biochrom	-
Polyvinylpyrrolidon (10 kg/mol)	PVP-10	Sigma-Aldrich	-
Polyvinylpyrrolidon (29 kg/mol)	PVP-29	Sigma-Aldrich	-
Reinstwasser	RW	Millipore	ultrapur (25 °C), 18.2MΩ*cm
Salpetersäure (65%ig)	HNO ₃	Güssig	95%
Salzsäure (37%ig)	HCl	Carl Roth	99%
Silbernitrat	AgNO ₃	Sigma-Aldrich	99%
Silberstandard für AAS ($c = (1000 \pm 5) \text{ mg/L}$)	-	Sigma-Aldrich	TraceCert®
Tetraethoxysilan	TEOS	Sigma-Aldrich	98%
Trinatriumcitrat-Monohydrat	-	Merck	99%
Trypsin	-	Biochrom	-
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Carl Roth	30%
Zellkulturmedium, das am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde	RPMI	PAA The Cell Culture Company	steril
Zellkulturmedium, Keratino-cyte growth medium	KGM	Lonza	steril

3.2. Darstellung von Nanopartikeln

3.2.1. Darstellung von SiO₂-ummantelten Goldnanopartikeln

Die Darstellung erfolgt analog zur Literatur.^[144] Es wurden verschiedene Versuche mit unterschiedlichen Reaktionsparametern durchgeführt (s. Tabelle 3.2).

Im Folgenden wird exemplarisch ein Versuch (Synthese 4, s. Kapitel 4.1.2) beschrieben, der zu einer homogenen und dünnen Silicaummantelung der Goldnanopartikel führt. Sämtliche Reaktionsschritte finden unter Schutzgasatmosphäre (Ar) und unter Lichtausschluss statt. Zu einer Dispersion aus kommerziell erhältlichen Goldkolloiden ($V = 60 \text{ mL}$, $c = 2.6 \cdot 10^{10} \text{ N/mL}$, $d = (60 \pm 5) \text{ nm}$, BBITM Group), die mit Citrat funktionalisiert sind, wird Polyvinylpyrrolidon (PVP, $M = 10 \text{ kg/mol}$) zur Funktionalisierung der Nanopartikel verwendet. Dabei beträgt die eingesetzte Menge 60 Moleküle PVP pro nm^2 der Goldnanopartikeloberfläche. PVP (11.52 mg, 1.152 μmol) wird zunächst in Reinstwasser (0.45 mL) in einem Ultraschallbad für 15 min aufgelöst. Die PVP-Lösung wird anschließend zu der vorgelegten Golddispersion gegeben. Die Kolloide werden für 18 h bei RT und 600 U/min gerührt. Anschließend werden durch Zentrifugation (123 g, 4 °C) Nebenprodukte wie PVP und Citrat abgetrennt. Es werden 0.625 mL einer Mischung von Ammoniakwasser (30%, 1.099 mL, 1 g) in 25.1 mL Ethanol zu den sedimentierten und PVP-funktionalisierten Goldnanopartikeln zugegeben. Da die Bildung der SiO₂-Schale stöchiometrisch erfolgt, werden für eine 5 nm dicke Schale unter Rühren bei 600 U/min 10 μL einer 5%-igen Tetraethoxysilan (TEOS)-Lösung in Ethanol zugefügt und für 18 h gerührt (600 U/min, RT). Die resultierenden Silica-ummantelten Goldnanopartikel werden dreimal gewaschen, indem die Dispersion zentrifugiert wird (123 g, 4 °C). Nach jedem Zentrifugationsschritt werden die sedimentierten Nanopartikel in Ethanol redispergiert. Um die Nanopartikel vollständig zu redispergieren werden diese ultraschallt (5 min, RT). Für Zellversuche werden die Nanopartikel in Reinstwasser überführt. Dies geschieht unter den oben genannten Zentrifugationsbedingungen. Die Nanopartikel werden insgesamt dreimal gewaschen, um eine Ethanolkonzentration $< 0.5\%$ zu erreichen.

Zur Bestimmung des Durchmessers der Goldnanopartikel und der Silica-ummantelten Goldnanopartikel werden die Nanopartikel an einem Transmissionselektronenmikroskop abgebildet und Messungen zur dynamischen Lichtstreuung durchgeführt.

Tabelle 3.2: Versuchsbedingungen

Synthese	Au-Dispersion [mL]	NH ₃ /Ethanol [mL]	TEOS/Ethanol [μ L]	Zugabe der TEOS/Ethanol-Lösung
1	40	2.5	10	1*10 μ L
2	40	2.5	30	3*10 μ L
3	20	0.625	30	3*10 μ L
4	20	0.625	10	einmalig
5	20	0.625	10	3*3.6 μ L
6	20	0.313	10	einmalig

3.2.2. Darstellung von AHAPS-funktionalisierten, fluoreszenzmarkierten SiO₂ Nanopartikeln

Die Darstellung von fluoreszenzmarkierten SiO₂-Nanokernen erfolgte nach der Stöbermethode, die von van Blaaderen und Vrij^[145] modifiziert wurde und nach der Mikroemulsionsmethode,^[70-71] die von Osseo-Asare und Arriagada entwickelt wurde (s. Kapitel 2.1.3).

3.2.2.1. Synthese des Farbstoffkopplungsprodukts (FITC-APS)

Die Darstellung erfolgt analog zur Literatur.^[145]

Die Kopplung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APS) wird in einem ausgeheizten und Argon gespülten 10 mL Einhalskolben unter Lichtausschluss durchgeführt.^[146] Nach Vorlegen von FITC (0.043 mmol, 16.9 mg) wird Ethanol (0.172 mol, 10 mL) unter Rühren (600 U/min) zugegeben. Zu dieser Lösung wird APS (0.4 mmol, 70.7 μ L) zugegeben und für weitere 5 min gerührt. Anschließend wird der Kolben für 90 min ultrabeschallt und die Reaktionsmischung unter Ar bei RT für 15 h gerührt.

3.2.2.2. *Synthese von fluoreszierenden SiO₂-Nanokernen (Stöber-Methode)*

Die Darstellung erfolgt analog zur Literatur.^[145]

In einem 2 L-Einhalskolben wird Ethanol (17 mol, 1 L) vorgelegt und eine wässrige Ammoniaklösung (25 Gew.-%, 48 mL) unter Rühren (600 U/min) zugegeben. Anschließend wird das Farbstoffkopplungsprodukt (FITC-APS, 29.1 mg, 74.2 μ mol bezüglich FITC, s. Kapitel 3.2.2.1) ohne weitere Aufreinigung und TEOS (0.172 mol, 38 mL) nacheinander dem 2 L-Kolben zugegeben und für weitere 18 h unter konstanter Geschwindigkeit gerührt. Anschließend wird die gelbe Dispersion zentrifugiert (770 g, 8 h), der Überstand entfernt und die sedimentierten Nanopartikel in Ethanol mit Hilfe eines Ultraschallbads (20 min, RT) redispergiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal wiederholt.

3.2.2.3. *Synthese von fluoreszierenden SiO₂-Nanokernen (Mikroemulsionsmethode)*

Die Darstellung erfolgt analog zur Literatur.^[70-71]

In einem 2 L-Einhalskolben werden Nonylphenoxypoly(ethylenoxy)ethanol (Igepal CO-520, 0.22 mol, 98.6 g) und Cyclohexan (18.5 mol, 2 L) vorgelegt und für 2 min bis zur vollständigen Vermischung gerührt (1200 U/min). In den Kolben wird eine wässrige Ammoniaklösung (25%, 12.1 mL) gegeben und wiederum für 2 min gerührt. Anschließend werden nacheinander das Farbstoffkopplungsprodukt (8.1 mg, 20.7 μ mol bezüglich FITC, s. Kapitel 3.2.2.1) und TEOS (56 mmol, 12.32 mL) zugegeben und für 5 min gerührt (1200 U/min). Der Kolben wird an einen ruhigen Ort mit konstanter Temperatur und unter Lichtausschluss für 48 h gelagert.

Die resultierende Dispersion wird an einem Rotationsverdampfer (40 °C) von Cyclohexan ($p = 235$ mbar) und Wasser ($p = 72$ mbar) befreit. Anschließend wird die Dispersion in Ethanol (17.2 mol, 1L) aufgenommen und zentrifugiert (770 g, 8 h), der Überstand wird entfernt und die sedimentierten Nanokerne in Ethanol mit Hilfe eines Ultraschallbads (20 min, RT) redispergiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal wiederholt.

3.2.2.4. *SiO₂-Ummantelung von fluoreszenzmarkierten SiO₂-Kernen*

Die Darstellung erfolgt analog zur Literatur.^[64]

Ein Teil der jeweiligen Dispersion (15.3 mg/mL, 65.36 mL, s. Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.2.3) wird verwendet um die farbstoffmarkierten Nanopartikelkerne mit einer farbstofffreien SiO₂-Schale zu ummanteln. Dazu wird die aufgereinigte Dispersion in einen 2 L-Einhalskolben gegeben und durch Zugabe von Ethanol (934.64 mL) eine Konzentration von 1 g/L unter Rühren (600 U/min) eingestellt. Anschließend werden Ammoniaklösung (25%, 43.84 mL) und TEOS (1.51 mL, 6.8 mmol) der Dispersion zugegeben und für 18 h unter konstanter Geschwindigkeit gerührt. Die Dispersion wird zentrifugiert (770 g, 8h), der Überstand entfernt und die sedimentierten Kern-Schale-Nanopartikel in Ethanol mit Hilfe eines Ultraschallbads (20 min, RT) redispergiert. Dieser Waschschritt wird insgesamt dreimal wiederholt. Die Dispersion wird in Ethanol bei RT unter Lichtausschluss gelagert.

Zur Verwendung der Nanopartikel in Zellversuchen werden diese von Ethanol in Reinstwasser überführt. Die Dispersion wird zentrifugiert (770 g, 8 h), der Überstand entfernt und die sedimentierten Kern-Schale-Nanopartikel in Reinstwasser mit Hilfe eines Ultraschallbads (20 min, RT) redispergiert. Dieser Waschschritt wird insgesamt dreimal wiederholt. Die Dispersion wird in Reinstwasser bei RT unter Lichtausschluss gelagert.

3.2.2.5. *AHAPS-Funktionalisierung von fluoreszenzmarkierten und SiO₂-ummantelten SiO₂-Kernen*

Die Darstellung erfolgt analog zur Literatur.^[64]

Ein Teil der synthetisierten Dispersion (15.44 mg/mL, 10 mL, s. Kapitel 3.2.2.4) wird verwendet um den Kern-Schale-Nanopartikeln ein positives Oberflächenpotential zu verleihen. Dazu wird die aufgereinigte Dispersion in einem zuvor mit Argon gespülten 25 mL-1-Halsschlenkkolben mit Ethanol (4.79 mL) verdünnt und Ammoniaklösung (650 µL) und N-(6-Aminoethyl)aminopropyltrimethoxysilan (AHAPS, 41.3 µL) zugegeben und für 2 h bei 1200 U/min unter Argon refluxiert. Anschließend wird für weitere 2 h bei Raumtemperatur unter Argon bei konstanter Geschwindigkeit gerührt. Die Dispersion wird zentrifugiert (770 g, 8 h), der Überstand entfernt und die sedimentierten AHAPS-funktionalisierten Kern-Schale-Nanopartikel in Ethanol mit Hilfe eines Ultra-

schallbads (15 min, RT) redispergiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal wiederholt. Die Dispersion wird bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon und Lichtausschluss gelagert.

3.2.3. Darstellung von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie

Die Darstellung von trigonalen Silbernanoprismen erfolgt modifiziert zur Literatur.^[50] In einem 50 mL-Einhalsschlenkkolben wird eine wässrige Silbernitratlösung (0.1 mM, 25 mL) vorgelegt und nacheinander unter Rühren (800 U/min) Trinatriumcitratlösung (30 mM, 1.5 mL) und PVP-Lösung (M = 29 kg/mol, 0.7 mM, 1.5 mL) vorgelegt. Wasserstoffperoxid (30%, 60 µL) wird zugegeben und Natriumborhydridlösung (0.1 M, 226 µL) über 1 min zugetropft. Anschließend werden die resultierenden trigonalen Silbernanoprismen zentrifugiert (2550 g, 4 °C) der Überstand entfernt und der Rückstand in entgastem Reinstwasser (20 mL, $c(\text{O}_2) \geq 0.1$ ppm) aufgenommen. Die Dispersion wird bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon und Lichtausschluss gelagert. Sphärische Silbernanopartikel wurden von Diendorf (AG Epple, Universität Duisburg-Essen) analog zur Literatur synthetisiert.^[147] Dabei haben die PVP-funktionalisierten sphärischen Silbernanopartikel einen TEM-Durchmesser von (70±25) nm, einen hydrodynamischen Durchmesser von (75±20) nm und ein Zeta-Potential von ca. – 30 mV.

3.3. Präparation von humanen Keratinozyten mit Goldnanopartikeln für die Röntgenmikroskopie (BESSY II)

3.3.1. Beschichtung der Goldnetzchen

Ein mit Ethanol gereinigter Objektträger (Menzelgläser 76 mm * 26 mm und einer Standardstärke von 1 mm (ISO Norm 8037/I)) wird mit humanem Hautfett gefettet und in einen Tropftrichter gegeben. Anschließend wird eine zuvor präparierte 1.35 Gew.-% Polyvinylformal (Formvar)-Lösung in Chloroform hergestellt und in den Tropftrichter gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 s wird die Formvarlösung abgelassen. Dabei benetzt die Formvarlösung den Glaträger. Nachdem Chloroform verdampft ist,

wird der Formvarfilm mit einer Rasierklinge an den vier Kanten des Objektträgers entfernt. Zum Ablösen des Films vom Objektträger wird dieser in einem Winkel von 45° in eine Kristallisierschale, die mit Reinstwasser gefüllt ist, eingetaucht. Hierbei löst sich der Film vom Objektträger und verhartet auf der Wasseroberfläche. Ein Film mit optimaler Dicke zeigt keine Interferenzen mit sichtbarem Licht. Ein zu dicker Film kann anhand der Farbzerlegung des sichtbaren Lichts identifiziert werden. Dicke Filme lösen sich von den Goldnetzen ab, sodass sie unbrauchbar sind.

Die Goldnetzchen (Silson) werden mit der glänzenden Seite nach oben auf den Formvarfilm gelegt. Anschließend wird ein zweiter Objektträger, der vollständig mit einem weißem Aufkleber umklebt ist wieder aufgenommen. Dazu wird der Objektträger in einem 45° Winkel eingetaucht, sodass der Film an diesem haftet. Schließlich wird der Film 1 h getrocknet.

3.3.2. Inkubation von humanen Keratinozyten

Die Proben werden von Frau Dr. Rancan (AG Blume-Peytavi/Vogt, Charité Berlin) präpariert.

Primäre Keratinozyten werden in Anlehnung an die Literatur^[13] aus humaner Haut isoliert, welche von einem/einer Spender/Spenderin zwischen 50-70 Jahren stammt. Die Keratinozyten werden in einem basalen Medium (engl. *Keratinocyte growth medium* (KGM)) aufgenommen und nach Sedimentation durch Zugabe von Trypsin vom Boden einer Zellkulturflasche abgelöst (trypsiniert). In einer Petrischale werden fünf Goldnetzchen mit 1 mL KGM versetzt. In die Petrischale werden 200 µL der abgelösten Keratinozyten mit einer Konzentration von 200,000 Zellen pro Petrischale gegeben. Innerhalb von 24 h adhären die Keratinozyten auf dem Formvarfilm der Goldnetzchen. Zu den Keratinozyten werden Goldnanopartikel und Goldnanopartikel mit Silicaschale (jeweils $c = 2 \text{ g/L}$, $V = 100 \text{ µL}$ (RPMI)) auf die Goldnetzchen in der Petrischale gegeben, sodass die Endkonzentration 0.182 g/L beträgt. Nach einer Inkubationszeit von 110 min in einem Brutschrank bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ werden die inkubierten Zellen mit dem kationischen und mitochondrialen Fluoreszenzfarbstoff 4-(4-diethylamino)styryl)-N-methylpyridiniumiodid (4-DI-2-Asp) weitere 10 min bei konstanten Bedingungen inkubiert.

3.3.3. Cryo-Behandlung der inkubierten Goldnetzchen

Das Medium und darin dispergierte Nanopartikel wird vollständig entfernt und die Goldnetze (s. Abbildung 3.4) mit 1 mL KGM versetzt. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wird überprüft an welchen Stellen auf den Goldnetzchen sich die humanen Keratinozyten befinden. Die Goldnetzchen werden nachfolgend mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit einer Mischung aus Reinstwasser und RPMI im Verhältnis von 1:1 gewaschen. RPMI ist ein Zellkulturmedium, das am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde. Die Goldnetze werden mit Hilfe eines Filterpapiers am breiten Steg des Goldnetzchens getrocknet. Die Gridfläche wird nur wenig abgetupft, sodass eine 10 µm dicke Eisschicht im Folgenden entsteht. Dazu wird eine Pinzette, die das Goldnetzchen hält, zügig in flüssiges Ethan mit einer Temperatur von -140 °C bis -180 °C getaucht. Dabei bildet sich amorphes Eis. Die Proben werden in flüssigem Stickstoff gelagert. Kurz vor Analyse der Proben werden die Goldnetzchen in einen auf ca. 77 K gekühlten Kryo-Probenhalter eingesetzt und durch eine Schraube fixiert.

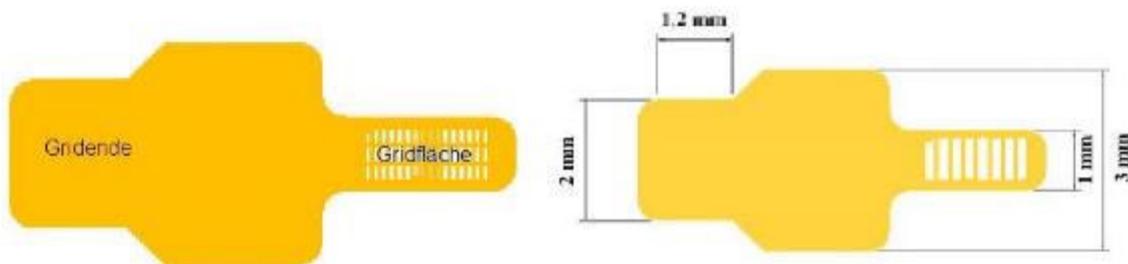


Abbildung 3.4: Goldnetzchen

3.3.4. Bestimmung der Viskosität und des Brechungsindex von RPMI

Die kinematische Viskosität wird mit Hilfe eines Mikro-Ostwald-Viskosimeter (s. Abbildung 3.5) bestimmt. Hierzu werden 2 mL des RPMI in das verbreiterte Rohr pipettiert und die Lösung bis zum Eichstrich E1 mit Hilfe eines Peleusball hochgesaugt und die Zeit gemessen, bis die Lösung den Eichstrich E2 erreicht.

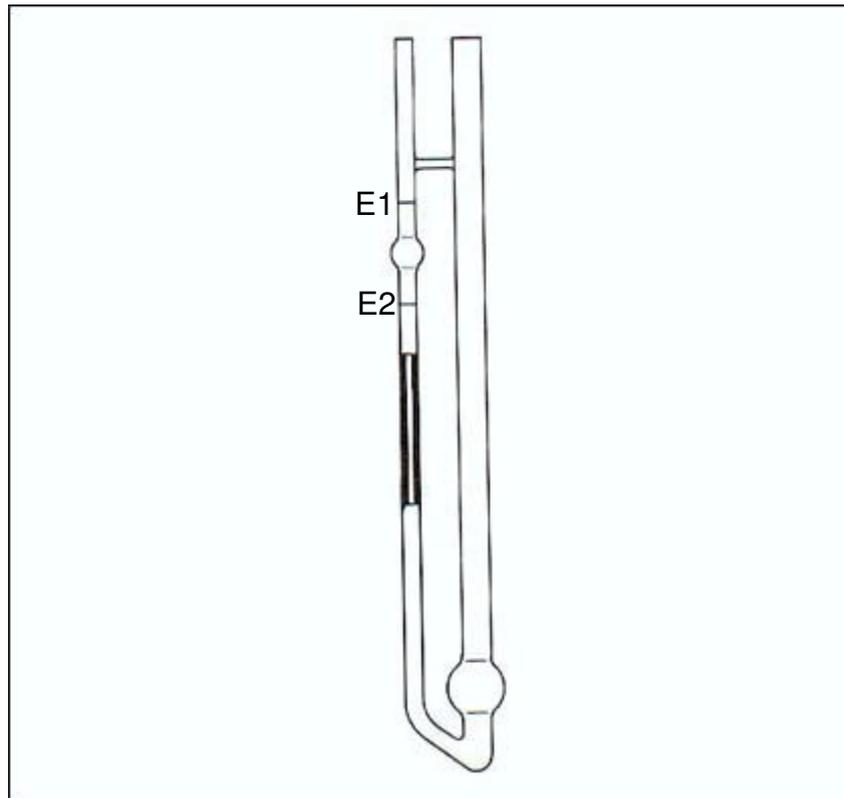


Abbildung 3.5: Mikro-Ostwald-Viskosimeter.^[148]

3.4. Präparation von humanen Keratinozyten mit Silicananopartikeln und Goldnanopartikeln für TEM

Die Proben wurden von Frau Dr. Rancan (AG Lademann/Vogt, Charité Berlin) und Frau Schrade (AG Bachmann, Charité Berlin) analog zur Literatur präpariert.^[13]

Zur Untersuchung der Aufnahme von Goldnanopartikeln mit Silicaschale und Silicananopartikeln werden Proben für die TEM vorbereitet.

3.5. Inkubation von humanen Keratinozyten mit Ag-Nanopartikeln für TEM und AAS

Die Proben werden von Herrn Dipl.-Ing. Sebastian Ahlberg (AG Lademann/Vogt, Charité Berlin) präpariert.

Zur Untersuchung der Aufnahme von trigonalen Silbernanoprismen, Silbernanosphären und einer 1:1-Mischung aus beiden Partikelsorten (Konfetti-Nanopartikel) in hu-

mane Keratinozyten (HaCaT-Zellen) werden Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie und Atomabsorptionsspektrometrie vorbereitet. Dazu werden vier Proben hergestellt:

1. Kontrollzellgruppe (ohne Nanopartikel)
2. Zellen mit trigonalen Ag-Nanoprismen (25 µg/mL, 1 mL)
3. Zellen mit Ag-Sphären (25 µg/mL, 1 mL)
4. Zellen mit Ag-Konfetti-Nanopartikeln (25 µg/mL, 1 mL)

In eine 4*6 Lochplatte werden 17 Löcher mit 1 mL einer Mutterzellsuspension (250,000 Zellen/mL) in RPMI mit 10% fetalem Kälberserum (RPMI/FCS) gegeben und die HaCaT-Zellen über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator adhärirt. Das Zellkulturmedium wird entfernt und 1 mL der entsprechenden Silberdispersionen in 1 mL RPMI/FCS (c = 25 µg/mL) bzw. 1 mL pures RPMI/FCS (Kontrollzellgruppe) zugegeben (s. Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Probenpräparation

Probe	Nanopartikel	Löcher für TEM	Löcher für AAS
Negativkontrolle	Keine	0	2
Zellen mit Ag-Sphären	Ag-Nano-sphären	3	2
Zellen mit trigonalen Ag-Nanoprismen	Trigonale Ag-Nanoprismen	3	2
Zellen mit Ag-Konfetti	Ag-Konfetti	3	2

Die Proben werden für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wird das Medium bezüglich der Kontrollgruppe entfernt. In der Nanopartikelgruppe werden ebenfalls das Medium und Nanopartikel, die von den HaCaT-Zellen nicht aufgenommen wurden, entfernt.

Sämtliche Proben werden mit jeweils 1 mL PBS gewaschen, 500 µL Trypsin zugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Dabei werden die adhärenen HaCaT-Zellen vom Lochboden gelöst. Es werden jeweils 500 µL RPMI zugegeben um den Ablösevorgang der Zellen vom Lochboden zu unterbinden und die Zellsuspensionen in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Mikroreaktionsgefäß) gefüllt. Anschließend werden die Zellsuspensionen zentrifugiert (493 g, 7 min) und der Überstand entfernt. Die Zellen werden in 1

mL PBS resuspendiert und wiederum zentrifugiert (493 g, 7 min). Der Überstand wird entfernt. Die Zellen, die anschließend mittels TEM untersucht werden sollen werden mit 500 μ L Fixierungslösung fixiert und die Proben für die AAS in 500 μ L Paraformaldehyd redispergiert.

Die Fixierung der Zellen für die TEM erfolgt dabei nach einem Protokoll von Frau Schrade (AG Bachmann, Charité Berlin, s. Anhang A).

3.6. Inkubation von humanen mesenchymalen Stammzellen mit trigonalen Ag-Nanoprismen und Ag-Nanosphären für TEM und AAS

Die Probenpräparation humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) wird in Verhältnis zur Probenpräparation der HaCaT-Zellen (s. Kapitel 3.5) variiert. Dabei werden die Zellzahlen von 250.000 Zellen/Loch auf 100.000 Zellen/Loch herabgesenkt. Anschließend werden identische Partikelsysteme mit 10 μ g/mL und 25 μ g/mL der verschiedenen Dispersionen (trigonale Ag-Nanoprismen, Ag-Nanosphären und Ag-Konfetti) versetzt. Die Verringerung der Zellzahl ist notwendig, da die räumliche Ausdehnung der hMSC deutlich größer als die räumliche Ausdehnung der HaCaT-Zellen ist. Dabei gibt es hMSC die eine Länge von 50 μ m, während HaCaT-Zellen eine Länge von etwa 10 μ m aufweisen. Bei einer Zellzahl >100.000 Zellen/Loch würden sich Multilagen der hMSC bilden. Sämtliche weitere Bedingungen (s. Kapitel 3.5) werden zur Präparation der HaCaT-Zellen konstant gehalten.

3.7. Inkubation von Humanhaut mit fluoreszierenden AHAPS-funktionalisierten SiO₂ Nanopartikeln

Die Inkubation und Fixierung von Humanhaut mit fluoreszierenden AHAPS-funktionalisierten SiO₂-Nanopartikeln (s. Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.2.4) werden von Herrn Dipl.-Ing. S. Ahlberg (Charité) und Herrn Dr. M. Laue (Robert Koch Institut) analog zur Literatur durchgeführt.^{[13],[149]}

Zunächst wird Humanhaut eines 50 bis 70-jährigen Spenders exzidiert und die Haut über Nacht in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ mit 100% Luftfeuchte für 15 h

gehalten. Sämtliche Strukturen unterhalb des Bindegewebes werden entfernt. Es wird intakte Haut (ohne Narben und Verfärbungen) in Stücke mit einer Ausdehnung von 2 cm² geschnitten. Die Humanhaut wird mit einer Lanzette-Mikronadel auf einem mit Alufolie umhüllten Styroporblock fixiert und 1 cm² große Quadrate markiert. Anschließend werden drei verschiedene Proben vorbereitet:

1. Negativkontrolle
2. Native Hautprobe, die mit der Dispersion inkubiert wird
3. Geprickte Hautprobe, die mit der Dispersion inkubiert wird

Die zuletzt genannte Hautprobe wird mit einer Lanzette-Mikronadel ca. 10*10 Mal mit einer Tiefe von etwa 70 µm eingestochen. Es wird ausgeschlossen, dass die Basalmembran der Haut verletzt wird.

Die humanen Hautproben werden entsprechend Tabelle 3.4 mit verschiedenen Medien versetzt. Diese werden anschließend für etwa 10 s in die Haut einmassiert. Überstehende Medien werden abgetupft.

Tabelle 3.4: Probenpräparation

Probe	Hautpräparation	V(Nanopartikel) [µL], c = 1 g/L	V(PBS) [µL]
Negativkontrolle	Keine	0	20
Native Hautproben	keine	20	0
Geprickte Hautproben	geprickt	20	0

Die Hautproben werden in eine Nasskammer und in den Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte für 24 h gestellt.^[13]

Die Hautproben werden einmal mit einem Tesafilmstreifen (Beiersdorf AG) beklebt und abgerissen. Die Hautproben werden in 3*3 mm² große Stücke geschnitten und in Fixierungslösung (Glutaraldehyd (2.5%), Paraformaldehyd (1%) in 2-(4-(2-Hydro-

xyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonsäurepuffer (HEPES, 0.05 M)) für 3 h bei Raumtemperatur gelagert. Nach der Fixierung werden die Hautproben bei 4 °C gelagert und von Herrn Dr. M. Laue (Robert Koch Institut Berlin) geschnitten. Dazu wird die geprickte Hautprobe zunächst semidünn (Schnittdicke 115 µm) geschnitten. Anschließend werden ultradünne Schnitte präpariert (Schnittdicke 60 bis 80 nm) bis eine typische Prickstelle zum Vorschein kommt (s. Anhang B und C).

4. Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der zahlreichen kommerziell erhältlichen Produkte, die Nanopartikel enthalten und der gesellschaftlichen Verunsicherung bezüglich der möglichen Aufnahme und Toxizität dieser Systeme gegenüber dem menschlichen Organismus gibt es zahlreiche Studien, die die Wechselwirkung von Nanopartikeln mit biologischen Systemen beschreiben. Dabei hängt die Interaktion von Nanopartikeln mit biologischen Systemen von vielen Faktoren ab: Hierzu zählen die physiko-chemischen Eigenschaften der Nanopartikel, wie Material, Konzentration,^{[79],[80]} Größe,^[81] Ligandendichte,^[81] Form,^[82] Oberflächenfunktionalisierung,^[64] Grad der Aggregation,^[83] Zeta-Potential und Porosität.^{[84],[85]}

Chitrani et al. zeigten beispielsweise, dass Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 50 nm stärker von Zellen aufgenommen werden, als Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10 nm oder 100 nm.^[81] Zudem zeigten diese Autoren, dass Nanopartikel mit verschiedenen Ligandendichten zu unterschiedlichen biologischen Konsequenzen (Aufnahme, Zytotoxizität) führen. Gratton et al. veranschaulichten, dass Polyethylenglycol-Hydrogel-Nanopartikel verschiedener Morphologie in unterschiedlicher Quantität von Zellen aufgenommen werden.^[82] So werden in absteigender Quantität Stäbchen gefolgt von Sphären, Zylindern und Würfeln aufgenommen. Dies gilt für Nanopartikel >100 nm. In Studien mit sub-100-nm-Partikeln werden Sphären in höherer Quantität als Stäbchen aufgenommen.^{[85],[150]} Graf et al. zeigten, dass die Oberflächenfunktionalisierung und damit das Zeta-Potential von Silicananopartikeln Auswirkungen auf die Stabilität von Dispersionen und auf die Aufnahme der Nanopartikel in Zellen haben.^[64] Albanese et al. präsentierten, dass monodisperse Goldnanopartikel in höherer Quantität als aggregierte Systeme in Zellen aufgenommen werden.^[83]

Trotz der zahlreichen Studien, sind die fundamentalen Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Biomaterie noch nicht verstanden.^[151] In den letzten Jahren wurden daher zahlreiche Studien durchgeführt, in denen molekulare Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Biosystemen untersucht werden.^[152] Es wurde herausgefunden, dass Nanopartikel bereits im extrazellulären Raum mit verschiedenen Biomolekülen, wie Proteinen, Zuckern und Lipiden wechselwirken bevor eine Interaktion mit der Zellmembran stattfindet.^[152]

Im ersten Kapitel der Auswertung dieser Arbeit (s. Kapitel 4.1) wird diskutiert, ob und wieso Nanopartikel verschiedenen Oberflächenmaterials (Gold vs. Silica) und unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung (Citrat vs. Silanolat) in die wichtigste zelluläre Subeinheit, den Zellkern, eindringen können.

Im zweiten Kapitel der Auswertung (s. Kapitel 4.2) werden die Aufnahme und die Wechselwirkung von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie mit zwei verschiedenen Zellsystemen untersucht. Hierzu werden humane Keratinozyten, die Zellen aus der Oberhaut (Epidermis) menschlichen Gewebes repräsentieren und Stammzellen, die an der Geweberegeneration involviert sind verwendet. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Zellen mit zytotoxischen Silbernanopartikeln nach Exposition mit menschlichen Organismen interagieren, ist hoch.^{[78],[153]} Dabei soll herausgefunden werden, ob Nanopartikel verschiedener Morphologie in unterschiedlicher Quantität von den verschiedenen Zellsystemen aufgenommen werden.

Im dritten Kapitel der Auswertung (s. Kapitel 4.3) wird die Aufnahme von Silicananopartikeln in humane Haut untersucht.

In dieser Arbeit wird darauf Wert gelegt, mit verschiedenen unabhängigen analytischen mikroskopischen, spektromikroskopischen und spektrometrischen Verfahren identische Proben zu analysieren, um belastbare Ergebnisse zu erhalten.

4.1. Untersuchung der Aufnahme von Goldnanopartikeln, Goldnanopartikeln mit Silicaschale und Silicananopartikeln in den Zellkern humaner Keratinozyten

Der Zellkern ist die wichtigste Organelle von Zellen, da innerhalb des Zellkerns das Erbgut liegt und die Replikation des Erbguts (Duplizierung der DNA) sowie die Transkription (Erstellung von mRNA-Kopien) stattfinden. Daher wird vermutet, dass der Zellkern besonders empfindlich gegenüber Nanopartikeln ist. Wie Nanopartikel beschaffen sein müssen um vom extrazellulären Raum über den intrazellulären Raum bis in den Zellkern zu penetrieren und wie die Aufnahmewege sind, ist folglich von großem Interesse.

Im Folgenden wird daher untersucht, wie Nanopartikel beschaffen sein müssen, um bis in den Zellkern zu gelangen. Dazu werden die Aufnahme und die Aufnahmewege

von verschiedenen Nanopartikelsystemen (1. mit Silanolatoberfläche, 2. mit Citratoberfläche) mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Cryo-Röntgenmikroskopie/-tomographie (engl.: soft X-ray cryo-microscopy/tomography, cryo-XM/T) in humane primäre Keratinozyten untersucht. Bei der cryo-XM/T werden ganze, cryofixierte und nicht eingebettete Zellen untersucht, während bei der TEM eingebettete und fixierte ultradünne Schnitte (Dicke ca. 70 nm) von Zellen untersucht werden. Da bei cryo-XM/T Proben mit einer Dicke von etwa 10 μm untersucht werden, benötigt man innerhalb der Nanopartikel einen Goldkern, um diese innerhalb der biologischen Probe lokalisieren zu können. Gold besitzt gegenüber Silica einen höheren Absorptionsquerschnitt, sodass ein höherer Kontrast mit geringerer Röntgenstrahlendosis erreicht werden kann.^[154] Vergleicht man die transmittierte Röntgenstrahlung bei einer Energie von 510 eV von einem Goldnanopartikel mit einem Silicananopartikel mit Durchmessern von 60 nm, so werden von Gold etwa 23% und von Silica ca. 94% der Strahlung transmittiert.^[155]

Bei fixierten und eingebetteten Zellschnitten für die TEM ist ein Goldkern nicht notwendig, da die Dicke der biologischen Probe bei etwa 70 nm liegt und daher der von den Silicananopartikeln erzeugte Kontrast im Elektronenstrahl ausreicht, um die biologische Probe von den Nanopartikeln zu unterscheiden. Die beiden verwendeten Methoden unterscheiden sich in der Ortsauflösung. Die Auflösung des cryo-XM/T liegt bei etwa 14 nm,^[131] die Auflösung des verwendeten TEM liegt bei etwa 1 nm. Mittels TEM können subzelluläre Strukturen in höherer Auflösung visualisiert werden. Cryo-XM/T bietet die Möglichkeit der Untersuchung des elementspezifischen Kontrasts (Spektromikroskopie) der biologischen Probe.^[131]

Die einzelnen Vor- und Nachteile der cryo-XM/T und TEM werden in Kapitel 4.1.3 erläutert.

4.1.1. Synthese und Charakterisierung des Farbstoffkopplungsprodukts

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wird in zahlreichen Studien als Fluoreszenzsonde verwendet, um beispielsweise Nanopartikel zu markieren.^[146, 156] Zur Darstellung von fluoreszierenden Silicananopartikeln ist eine vorherige Synthese des Farbstoffkopplungsprodukts (s. Abbildung 4.1) notwendig. Dazu wird FITC (0.043 mmol, 16.9 mg)

mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APS, 0.4 mmol, 70.7 μ L) in Ethanol (0.172 mol, 10 mL) zum Farbstoffkopplungsprodukt (FITC-APS) umgesetzt.

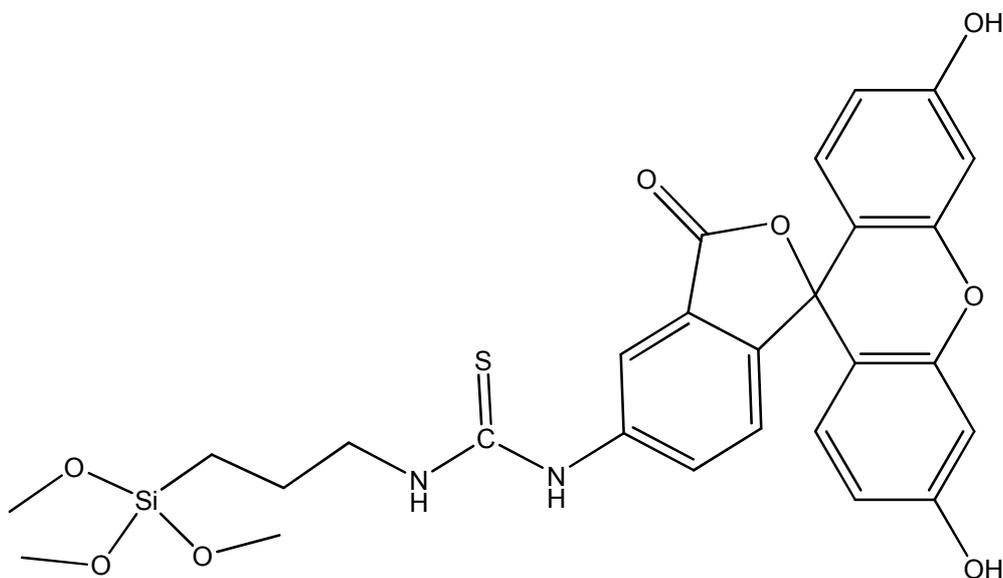


Abbildung 4.1: FITC-APS Kopplungsprodukt mit $m/q = 568.1336$.

Die Überprüfung, ob die Reaktion abläuft, erfolgte mittels Massenspektrometrie (Elektronenstoßionisation). Im Massenspektrogramm ist ein Signal der relativen Intensität (I_{rel}) bei 100% bei 595.15845 m/z (negativ) erkennbar. Dies legt die Vermutung nahe, dass es zu einem Austausch von zwei Methoxygruppen des FITC-APS durch Ethoxygruppen gekommen ist. Zudem zeigt das Signal bei 609.17417 m/z (negativ) ($I_{rel} \approx 86\%$) und 611.18636 m/z ($I_{rel} \approx 10\%$) den Austausch von drei Methoxygruppen durch Ethoxygruppen. Da APS in zehnfachem Überschuss eingesetzt wurde, tritt zudem ein Signal bei 222.15189 m/z (positiv), $I_{rel} \approx 8\%$, das der Bildung des 3-Aminopropyltriethoxysilan entspricht, auf. Ein Signal bei 568.1336 m/z , das dem Muttermolekül entspricht, ist nicht enthalten. Jedoch kann dieses Signal bei der Elektronenstoßionisation für das Muttermolekülion fehlen, da vorwiegend intensive Signale für Fragmentationen erhalten werden.^[157] Zudem sind Polykondensationsprodukte bei der Reaktion entstanden (1205.34049 m/z (positiv), $I_{rel} \approx 10\%$ sowie 2179.90889 m/z (positiv), $I_{rel} \approx 20\%$).

4.1.2. Synthese und Charakterisierung SiO_2 -ummantelter Goldnanopartikel und fluoreszierender SiO_2 -Nanopartikel

Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte Silicananopartikel werden mit einer modifizierten Mikroemulsionssynthese dargestellt (s. Kapitel 3.2.2).^[146, 158] Die resultierenden fluoreszierenden Silicananokerne werden mit einer farbstofffreien Silicaschale mittels Kern-Schale-Wachstum analog zum Stöberwachstum ummantelt (s. Abbildung 4.2).^[68, 159]

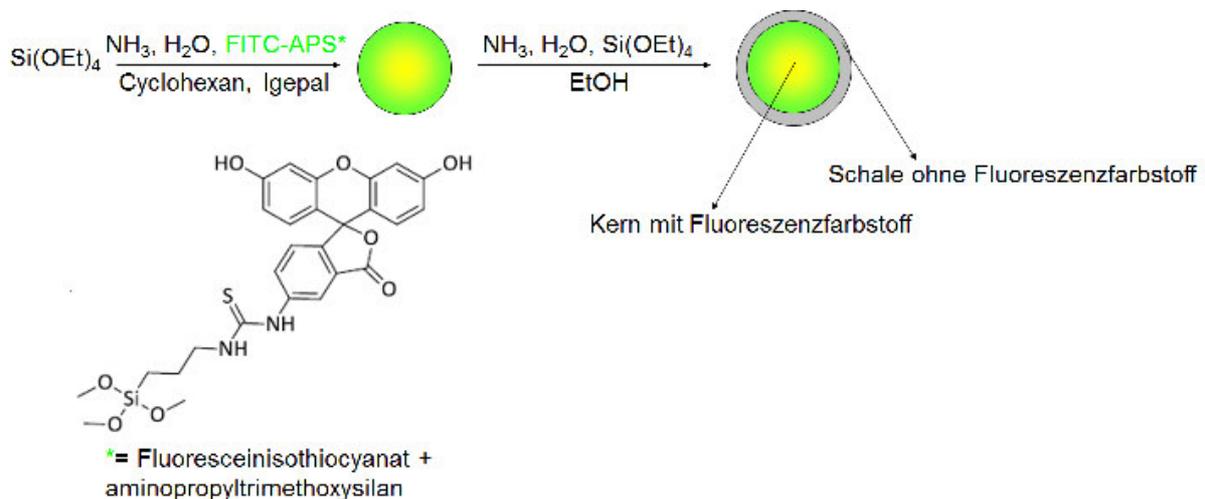


Abbildung 4.2: Schema zum Aufbau der verwendeten Kern-Schale-Silicananopartikel mit Fluoreszenzfarbstoff.

Anschließend werden kommerziell erhältliche Goldnanopartikel (BBI™ Group) und die synthetisierten fluoreszierenden Silicananopartikel mit farbstofffreier Silicaschale mit TEM, dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Zeta-Potential-Messungen charakterisiert. Die Beschreibung zur Synthese und Charakterisierung der Silica-ummantelten Goldnanopartikel erfolgt später. Aufgrund der Oberflächenfunktionalisierung mit Citrat (Goldnanopartikel) oder Silanolat (Silicananopartikel bzw. Goldnanopartikel mit Silicaschale) besitzen die untersuchten Nanopartikel ein negatives elektrisches Potential an der Abscherschicht (Zeta-Potential). Die resultierende elektrostatische Abstoßung der Nanopartikel führt zu hydrodynamischen Durchmessern, die den Durchmessern der Nanopartikelkerne ähnlich sind, die durch die TEM (TEM-Durchmesser: (60 ± 5) nm (Goldnanopartikel), (51 ± 2) nm (Silicananopartikel)) erhalten werden (s. Abbildung 4.3).

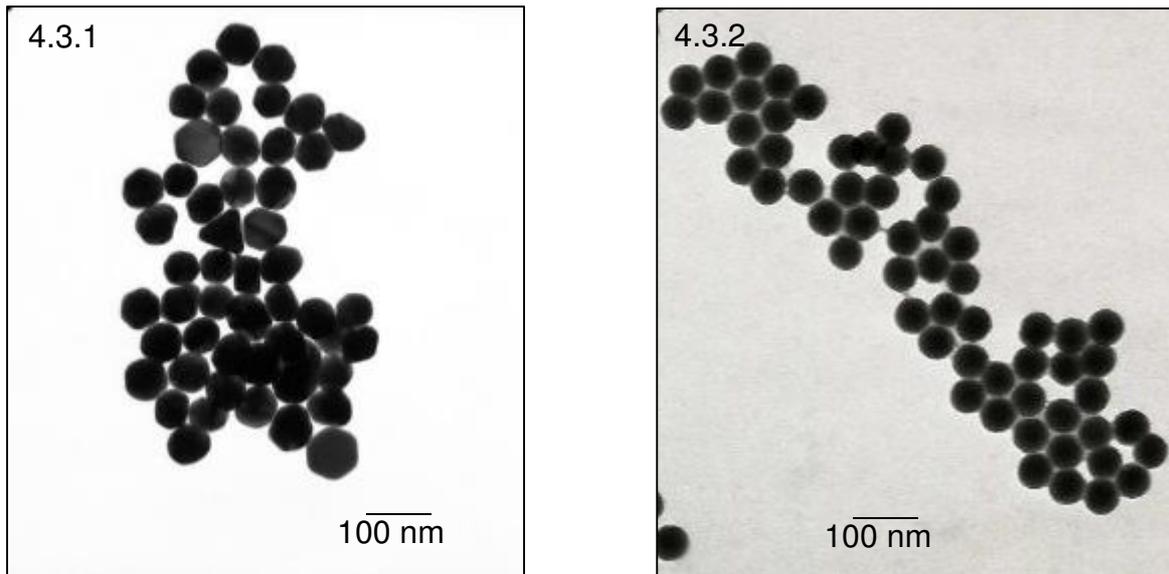


Abbildung 4.3: TEM-Aufnahme von Goldnanopartikeln (Abbildung 4.3.1) und Silicananopartikeln (Abbildung 4.3.2)

Die Kolloide liegen somit nicht aggregiert vor. Die Differenz aus TEM- und hydrodynamischen Durchmesser resultiert aus der räumlichen Ausdehnung des Liganden (Citrat bzw. Silanolat) und adsorbierter Lösemittelmoleküle.^[119] Die Nanopartikel sind auch nach einer Lagerung von über 2 Jahren in Reinstwasser stabil (s. Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Charakterisierungsdaten zu Goldnanopartikeln und Silicananopartikeln.

Nanopartikel	TEM-Durchmesser [nm]	DLS-Durchmesser [nm] in Reinstwasser nach			Zeta-Potential in Reinstwasser nach 0 d [mV]
		0 d	5 d	2 a	
Goldnanopartikel	(60±5)	(63±2)	(62±4)	(64±2)	(-49±2)
Silicananopartikel	(51±2)	(96±2)	(97±2)	(90±1)	(-52±3)

Für die Untersuchung von Nanopartikeln mit Silanolatoberfläche mittels cryo-XM/T werden Goldnanopartikel mit Silicaschale synthetisiert. Dabei ist eine direkte Umman- telung von Citrat-funktionalisierten Goldnanopartikeln mit SiO₂ nicht möglich.^[144] Die Synthese SiO₂-ummantelter Goldnanopartikel wird nach einer modifizierten Vorschrift von Graf et al. durchgeführt.^[144] Dabei werden die Goldnanopartikel zunächst mit Polyvinylpyrrolidon (PVP, M = 10 kg/mol, 60 Moleküle PVP pro nm² der Nanopartikelober- fläche) funktionalisiert. Hierbei soll PVP die Affinität der Goldnanopartikeloberfläche zu Silica erhöhen.^[144] Die PVP-ummantelten Goldkolloide werden zentrifugiert und vom

Überstand befreit. Hierbei befinden sich weniger als 1% der eingesetzten Goldnanopartikel im Überstand. Durch Zugabe des Sediments (enthält Goldnanopartikel) wird in das Reaktionsmedium für die Silicaschalenbildung ein zusätzliches Volumen von Wasser von (70 ± 10) μL eingebracht. Die Ummantelung der Goldnanopartikel mit SiO_2 erfolgt durch Umsetzung von Tetraethoxysilan (TEOS) unter der katalytischen Wirkung von Ammoniak und Wasser. Hierbei ist das Ziel, eine homogene und etwa 5 nm dicke Silica-Schale zu erhalten.

Dazu werden für die Synthesen folgende Parameter gewählt (s. Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Übersicht der Parameter während der Ummantelung von Goldnanopartikeln mit SiO_2

Synthese	$V_{\text{total}}^{\text{a)}$ [mL]	$c(\text{Au-NP})^{\text{b)}$ [L^{-1}]	$A_{\text{O,total}}$ [m^2/L]	$c(\text{H}_2\text{O})$ [mol/L]	$c(\text{TEOS})$ [$\mu\text{mol/L}$]/ berechnete Schalendicke [nm]	$c(\text{NH}_3)$ [mol/L]
1	2.58 ± 0.02	$4.03 \cdot 10^{14}$	4.6 ± 0.5	2.9 ± 0.3	$10 \pm 1 / 5$	0.65 ± 0.01
2	2.60 ± 0.02	$4.00 \cdot 10^{14}$	4.5 ± 0.5	2.9 ± 0.3	$30 \pm 1 / 10$	0.64 ± 0.01
3	0.73 ± 0.02	$7.17 \cdot 10^{14}$	8.1 ± 0.8	6.7 ± 1.1	$110 \pm 1 / 20$	0.58 ± 0.01
4	0.71 ± 0.02	$7.38 \cdot 10^{14}$	8.3 ± 0.8	6.8 ± 1.2	$36 \pm 1 / 10$	0.59 ± 0.02
5	0.71 ± 0.02	$7.38 \cdot 10^{14}$	8.3 ± 0.8	6.8 ± 1.2	$36 \pm 1 / 10$	0.59 ± 0.02
6	0.40 ± 0.02	$1.32 \cdot 10^{15}$	15.0 ± 1.0	11.1 ± 2.0	$65 \pm 1 / 10$	0.53 ± 0.02

^{a)} V_{total} : Volumen in der Gesamtreaktion, ^{b)} $c(\text{Au-NP})$: Konzentration der Goldnanopartikel, ^{c)} $A_{\text{O,total}}$: Gesamtoberfläche der eingesetzten Nanopartikel. Es wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt, dass der relative Fehler der Goldnanopartikelkonzentration nach Umsetzung mit PVP und anschließender Aufreinigung $\delta(c(\text{Au-NP})) < 1\%$ und der relative Fehler der Goldnanopartikeloberfläche somit $\delta(A_{\text{O,total}}) < 1\%$ betragen.

In Synthese 1 konnten keine Goldnanopartikel mit homogener Silicaschale dargestellt werden. Bei Umsetzung der Nanopartikel mit TEOS ($10 \mu\text{mol/L}$ entspricht einer berechneten Schalendicke von 5 nm) bildete sich keine im TEM erkennbare Silicaschale (keine TEM-Aufnahme angefertigt). Bei nochmaliger Umsetzung mit TEOS (Synthese 2, insgesamt $30 \mu\text{mol/L}$, errechnete Schale 10 nm) zeigt sich, dass die Goldnanopartikel nicht homogen mit Silica ummantelt wurden. Anhand der TEM-Aufnahme (s. Abbildung 4.4) ist zu erkennen, dass zum Teil die Goldnanopartikel eine nicht geschlos-

sene Silicaschale umgibt (s. Abbildung 4.4.1), dass Goldnanopartikel zusammengewachsen sind (s. Abbildung 4.4.1 und Abbildung 4.4.3), dass es darüber hinaus Goldnanopartikel gibt, die nicht mit Silica ummantelt sind (s. Abbildung 4.4.2) und dass sich Silica-Zweitnukleate gebildet haben (s. Abbildung 4.4.4).

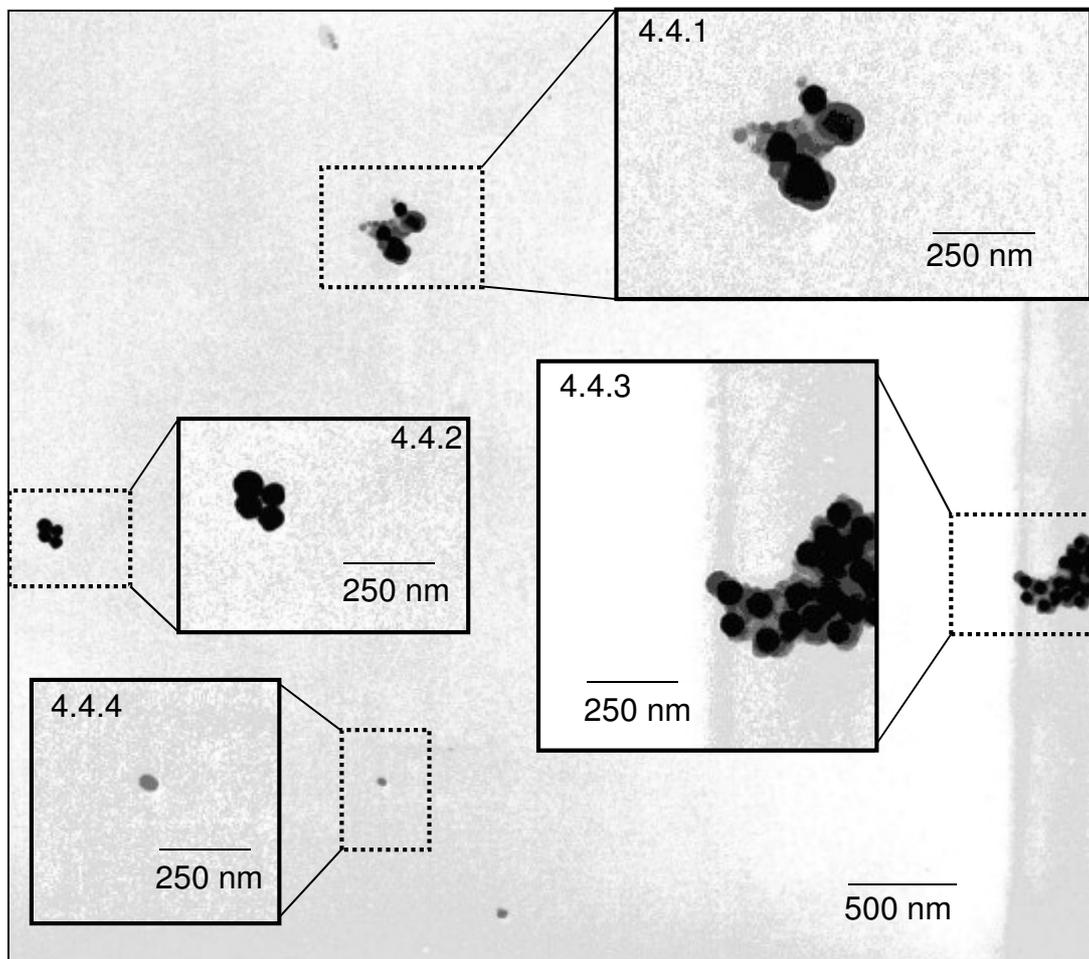


Abbildung 4.4: TEM-Aufnahme von Nanopartikeln aus Ansatz 2.

Die Ummantelung der Goldnanopartikeln mit einer definierten Silicaschale ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Das Schalenwachstum ist eine Funktion der Konzentrationen der Katalysatoren (Ammoniak und Wasser), der Primärpartikel (Konzentration und Oberfläche der Goldnanopartikel), der Konzentration des Silicapräkursors (TEOS) und der molaren Masse des PVP: Graf et al. zeigten, dass eine molare Masse des PVP von 10 kg/mol zu einer hohen Stabilisierung der Goldnanopartikel während des Schalenwachstums und zu homogenen Silicaschalen führt.^[144] Daher wurde in dieser Studie ausschließlich PVP mit dieser molaren Masse verwendet. Da es keine systematischen Untersuchungen in der Literatur gibt, die sämtliche Parameter untersuchen,

die für die Bildung einer Silicaschale um PVP-funktionalisierte Goldnanopartikel relevant sind, werden die Ergebnisse aus dieser Arbeit mit dem Silica-Schalenwachstum von Silicananopartikeln verglichen:

Dabei wird in einigen Publikationen veranschaulicht, dass das Wachstum von Silicaschalen auf ein bestehendes Nanopartikel grundsätzlich auf der Bildung und der anschließenden Aggregation von Silicanukleaten auf Primärnanopartikeln beruht.^{[72],[159],[160],[161],[162]} Somit wird geschlossen, dass die in dieser Arbeit durchgeführte Silicaummantelung von Goldnanopartikeln, bei der ebenfalls Silicanukleate auf bestehende Nanopartikel aggregieren, vergleichbar ist. Chen et al. fanden für das Wachstum von reinen Silicananopartikeln heraus, dass je kleiner Nanokerne sind desto weniger neue Nanokerne bilden sich beim Partikelwachstum mit SiO_2 . Umso größer die Gesamtoberfläche der Primärpartikel ist, desto weniger Sekundärkerne bilden sich. Daher spielt ebenfalls die Konzentration der Primärpartikel bei der Bildung von Zweitnukleaten eine entscheidende Rolle.^[163] Chen et al. zeigten darüber hinaus, dass die Bildung von Zweitnukleaten eine Funktion von der Initialkonzentration von TEOS, der Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse von TEOS (K_h) und der Geschwindigkeitskonstanten der Kondensation der Kieselsäure (K_c) ist. Wenn jedoch die Konzentration an Primärpartikeln zu hoch ist, können die Primärpartikel sich zu nahe kommen und mit Silica zusammenwachsen. Dies ist in diesem Versuch genauso wenig erwünscht wie die Bildung von Zweitnukleaten. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Zugabe von NaCl die Bildung von Sekundärkeimen inhibieren kann. Jedoch werden mit steigender Ionenstärke ebenfalls Dispersionen instabil, sodass Nanopartikel generell aggregieren und somit zusammenwachsen können.^[72, 163]

Ausschließlich ein homogenes und nicht-aggregiertes Nanopartikelsystem lässt eindeutige Rückschlüsse auf die Aufnahme in und die Toxizität der Nanopartikel auf biologische Systeme zu. Ist das Nanopartikelsystem divers, bleibt unklar welche Spezies zur eventuell auftretenden akuten Toxizität führt.

Die oben genannten Geschwindigkeitskonstanten K_h und K_c sind von der Konzentration des Reinstwassers und des Ammoniaks abhängig. Da die Bildung einer homogenen, dünnen Silicaschale eine Funktion der eingesetzten Konzentration von TEOS^[163] und der Katalysatoren (Ammoniak und Reinstwasser) ist, wurde in den folgenden Experimenten die Konzentration an Goldnanopartikeln, die Konzentration an eingesetztem TEOS, Ammoniak und Reinstwasser systematisch variiert (s. Tabelle 4.2). Die Konzentration und molare Masse des PVP wurde hingegen konstant gehalten.

Liz-Marzán et al. zeigten, dass die Bildung einer homogenen Silicaschale um Goldnanopartikel auch bei Wasser als Lösemittel realisierbar ist.^[164]

Bogish et al. veranschaulichten, dass die Bildung von kleinen Silicananokernen bei hohen Konzentrationen an Ammoniak und Wasser auftritt.^[159] In den vorliegenden Experimenten sind die Wasserkonzentrationen deutlich erhöht.

Park et al. und Chen et al. publizierten, dass Partikelwachstum von Silica proportional zur Konzentration von Wasser und zur Konzentration des Ammoniaks ist.^{[163],[165]}

Park et al. verwenden für die Synthese und dem Wachstum von Silicananopartikeln mit geringer Polydispersität 0.2 - 0.35 mol/L Ammoniak und $[H_2O]/[TEOS] = 30 - 55$. Diese geringen Verhältnisse von Wasser zu TEOS sind in dem vorliegenden Versuch nicht realisierbar, da die reinen Goldnanopartikel bereits in Reinstwasser dispergiert sind. Diese Dispersionen werden abzentrifugiert und dem Reaktionskolben zugegeben, sodass das Volumen an zugefügten Reinstwasser in den einzelnen Reaktionen $70 \pm 10 \mu\text{L}$ beträgt. Somit ist das Verhältnis von Wasser zu TEOS in der vorliegenden Arbeit deutlich größer (von 1100 bis 9900) als bei den optimierten Synthesen von Park et al.^[165] (s. Tabelle 4.3) und Chen et al.^[163]

Zudem kommt es bei der Aufkonzentrierung der Goldnanopartikeldispersion zu einem vernachlässigbaren Verlust an Goldnanopartikeln von weniger als 1% (mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt).

Tabelle 4.3: Vergleich der Reaktionsparameter in der vorliegenden Arbeit und der Publikation von Park et al.^[165]

Synthese	$\frac{([H_2O]/[TEOS])_{Dis}}{([H_2O]/[TEOS])_{Park,55}}$	$\frac{([H_2O]/[TEOS])_{Dis}}{([H_2O]/[TEOS])_{Park,30}}$
1	$5.4 \cdot 10^3$	$9.9 \cdot 10^3$
2	$1.8 \cdot 10^3$	$3.3 \cdot 10^3$
3	$1.1 \cdot 10^3$	$2.0 \cdot 10^3$
4	$3.5 \cdot 10^3$	$6.3 \cdot 10^3$
5	$3.5 \cdot 10^3$	$6.3 \cdot 10^3$
6	$3.1 \cdot 10^3$	$5.7 \cdot 10^3$

Für den Vergleich werden die Daten aus der vorliegenden Arbeit ($([H_2O]/[TEOS])_{Dis}$) mit den Daten von Park et al. für $([H_2O]/[TEOS])_{Park,55} = 55$ und $([H_2O]/[TEOS])_{Park,30} = 30$ verglichen.^[165]

Da eine geringere Wachstumsrate zur Bildung einer dünnen homogenen Silicaschale führen kann, wurden in Synthese 3 90% der Konzentration an Ammoniak aus Synthese 2 eingesetzt. In Synthese 2 und 3 wurde die Konzentration an Wasser im Vergleich zur Konzentration von TEOS konstant gehalten ($[H_2O]/[10^{-5}TEOS] \approx 1$ bzw. 0.6).

In der TEM-Aufnahme der Partikel aus Synthese 3 (s. Abbildung 4.5) ist erkennbar, dass sich keine Zweitnukleate gebildet haben.

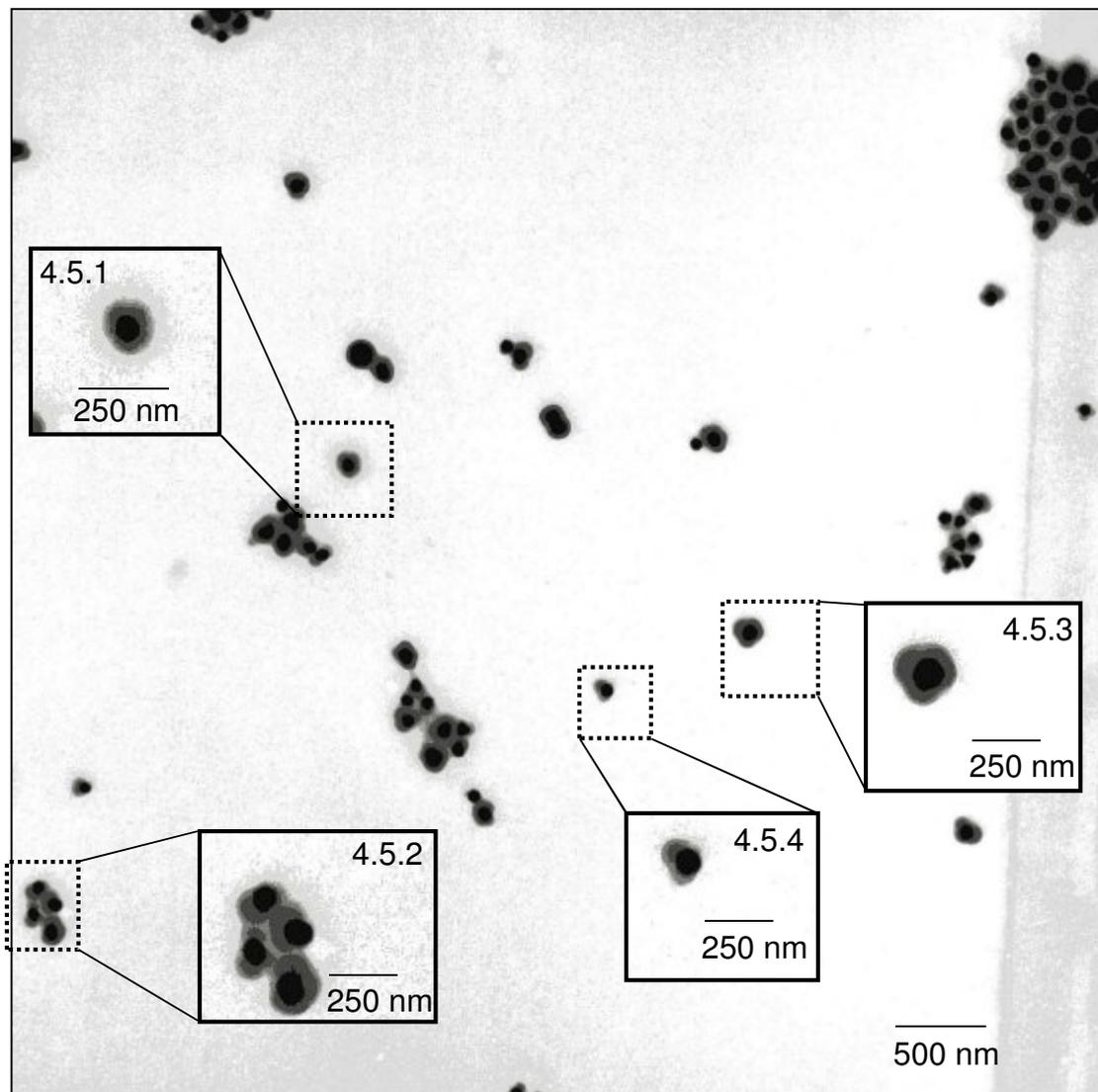


Abbildung 4.5: TEM-Aufnahme von Nanopartikeln aus Ansatz 3.

Zudem ist eine größere Anzahl an Goldnanopartikeln mit einer dünnen SiO_2 -Schale (s. Abbildung 4.5.1) ummantelt als in Synthese 2. Es sind bei zusammengewachsenen Nanopartikeln die einzelnen Silicaschalen erkennbar (s. Abbildung 4.5.2). Die reale durchschnittliche Dicke der Silicaschalen ist mit (26 ± 15) nm zu dick und zu inhomogen

(s. Abbildung 4.5.3 und Abbildung 4.5.4), da die Spezies kein homogenes System repräsentiert. Die berechnete Silicaschale beträgt 20 nm. Es wird geschlussfolgert, dass die eingesetzte Menge an TEOS zu hoch ist, um eine ca. 5 nm dicke Silicaschale zu generieren. Dabei wird anhand der TEM-Aufnahme abgeschätzt, dass die Menge an eingesetztem TEOS um den Faktor 3 verringert werden muss um zu einer dünnen Silicaschale zu gelangen.

In Synthese 4 wurde folglich die Menge an TEOS um ca. 67% reduziert. Hierbei beträgt die berechnete Schalendicke ca. 10 nm. Die Konzentration an Wasser im Verhältnis zu TEOS wurde dabei im Verhältnis zu den vorherigen Synthesen verdoppelt (Synthese 2) bzw. verdreifacht (Synthese 3) ($[H_2O]/10^{-5}[TEOS] \approx 2$), während die Konzentration an Ammoniak zu der vorherigen Synthese (Synthese 3) konstant gehalten wurde.

Dabei ist zu erkennen, dass die Reduzierung der Menge des TEOS zu einer dünnen Silicaschale (4 ± 3) nm führt (s. Abbildung 4.6). Es sind zudem einige wenige (ca. 5%) Goldnanopartikel zusammengewachsen (s. Abbildung 4.7). Die Silica-ummantelten Goldnanopartikel sind somit für nachfolgende Zellversuche geeignet (s. Kapitel 4.1.3) und werden daher weiter charakterisiert.

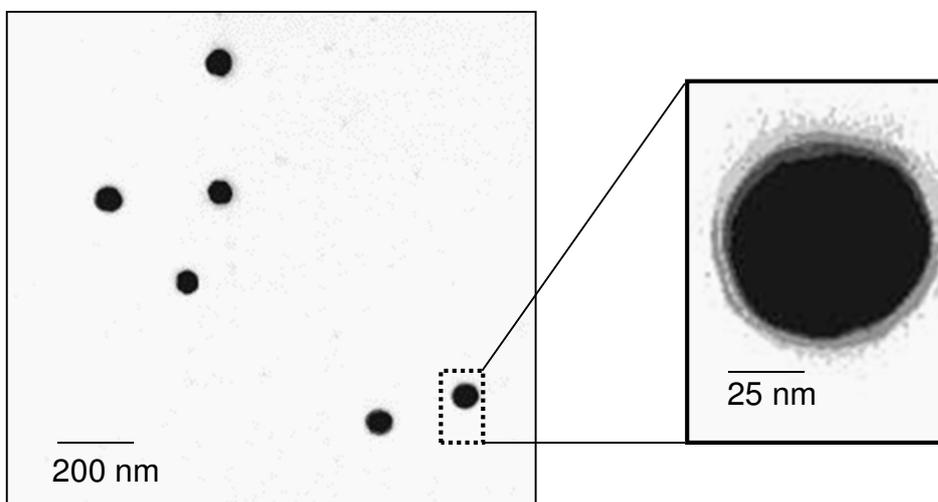


Abbildung 4.6: TEM-Aufnahme von Nanopartikeln aus Ansatz 4.

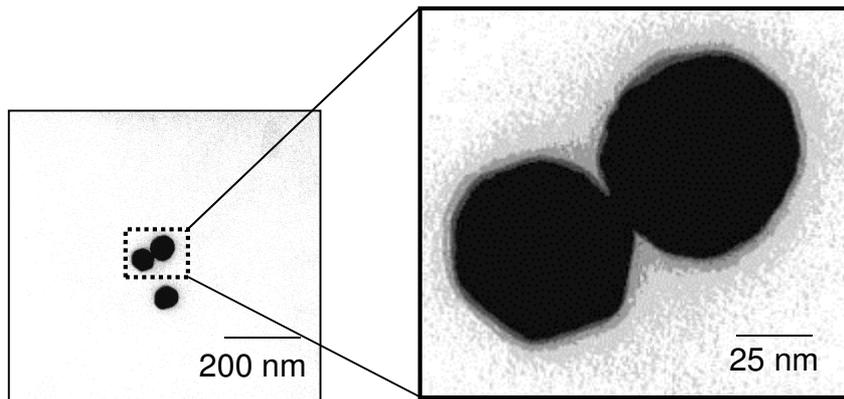


Abbildung 4.7: TEM-Aufnahme von Nanopartikeln aus Ansatz 4.

In Synthese 5 wurden sämtliche Reaktionsparameter analog zu Synthese 4 gelassen, nur dass die Zugabe des TEOS in 3 Etappen in einem zeitlichen Abstand von 30 min erfolgte. Durch diese Syntheseroute sollte die Bildung von zusammengewachsenen Nanopartikeln unterdrückt werden. Park et al. zeigten, für reine Silicananopartikel, je kleiner die Zuflussgeschwindigkeit von TEOS zum Reaktionsmedium ist, desto größer werden die Nanopartikel.^[165] Es wird daher geschlossen, dass bei einer verringerten Zuflussgeschwindigkeit, die Reaktionsgeschwindigkeit verringert wird, sodass die Nanopartikel nicht zusammenwachsen. Die Folge dieser Syntheseroute war jedoch, dass sich keine Silicaschale um die Goldnanopartikel bildete (im TEM analysiert, jedoch keine TEM-Aufnahme angefertigt). Park et al. zeigten, dass wenn die Zuflussgeschwindigkeit von TEOS zum Reaktionsmedium die kritische Übersättigungskonzentration unterschreitet, findet Nukleation in deutlich geringerer Quantität statt.^[165] Daher wird vermutet, dass in Reaktion 5 im Verhältnis zu Reaktion 4 nur wenige Nukleate nach Zugabe des ersten Drittels des TEOS gebildet wurden. Generell wird bei der Bildung von Silicaschalen und bei der Bildung von Silicananopartikeln TEOS zu Kieselsäure hydrolysiert. Jedoch spielen monomere Einheiten an Kieselsäure keine direkte Rolle bei der Bildung von SiO_2 . Kieselsäure kondensiert vielmehr als $\text{Si}_x\text{O}_y(\text{OH})_z$. Wenn von diesen Einheiten eine ausreichend hohe Konzentration vorliegt, bildet sich SiO_2 .^[163] Da die Bildung von SiO_2 indirekt von der Konzentration von TEOS bzw. Kieselsäure und somit von den Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse (K_h) bzw. der Kondensation (K_c) abhängt, besteht die Möglichkeit, dass eine kritische Menge an TEOS vorliegen muss um SiO_2 zu bilden (s. Gleichung (4.1)).

$$[\text{Si}_x\text{O}_y(\text{OH})_z] = f([\text{TEOS}]_0, K_h, K_c = \text{const.}) \quad (4.1)$$

Mit Hilfe des Monomeradditions-Wachstumsmodell (engl.: *Monomer addition growth model*) nach LaMer wie auch nach dem Aggregations-Wachstumsmodell (engl.: *Aggregation growth model*) kann die Bildung von SiO_2 Partikeln und somit auch von Silicaschalen beschrieben werden. Nukleation tritt nach dem erstgenannten Modell auf, wenn die Konzentration von TEOS bzw. Kieselsäure über einem kritischen Wert liegt (Übersättigung). Partikelwachstum tritt durch die Addition von kleinen Nanokernen auf bestehende größere Partikel auf. Diese Theorie wurde von zahlreichen Autoren bewiesen.^{[72],[159],[160],[161],[162]} Zur Stabilisierung der Goldkolloide während des Schalenwachstums und höherer Affinität der Goldoberfläche zu SiO_2 wurde zunächst PVP auf der Oberfläche der Goldkolloide absorbiert.^[144] Durch Adsorption der Silicanukleate auf der Goldnanopartikeloberfläche kann die absolute Partikeloberfläche verringert werden.^[144] Dies ist energetisch bevorzugt.

Nach dem Aggregations-Wachstumsmodell bilden sich zunächst während der Hydrolyse und Kondensation von TEOS kolloidal instabile Kerne mit einer räumlichen Ausdehnung von einigen Nanometern. Generell aggregieren diese Kerne zu größeren Nanopartikeln bzw. Silicaschalen.^[159] Wenn jedoch die Konzentration an TEOS zu gering ist, besteht die Möglichkeit, dass instabile Nanokerne in geringerer Quantität entstehen (Synthese 5). Wird nach erfolgter Nukleation weiteres TEOS zugegeben, so wachsen die Nukleate, während eine Zweitnukleation nicht stattfindet. Hierdurch sind vermutlich stabile Silicananokerne entstanden, die nicht auf den Goldnanopartikeln adsorbieren. Durch den anschließenden Aufreinigungsprozess der Dispersion mittels Zentrifugation wurden vermutlich die Silicananopartikel verworfen, da sich diese Partikel aufgrund der geringen Dichte des SiO_2 im Überstand und nicht im Sediment befanden. Somit konnten bei den anschließenden TEM-Abbildungen (nicht abgebildet) nur Goldnanopartikel ohne Silicaschale und keine Silicananopartikel gefunden werden.^[165]

In Synthese 6 wurde aufgrund der vorherigen Synthesen (Synthese 3 bis 5) die Konzentration an Ammoniak auf etwa 90% im Verhältnis zu Synthese 5 eingestellt, während die Konzentration von Wasser zu TEOS konstant gehalten wurde ($[\text{H}_2\text{O}]/10^{-5}[\text{TEOS}] \approx 2$). Die berechnete Silicaschalendicke beträgt 10 nm.

In der TEM-Aufnahme der resultierenden Nanopartikel (s. Abbildung 4.8) ist erkennbar, dass sich keine vollständige Silicaschale um die Goldnanopartikel gebildet hat, sondern Silicakerne auf der Oberfläche der Goldnanopartikel kondensierten.

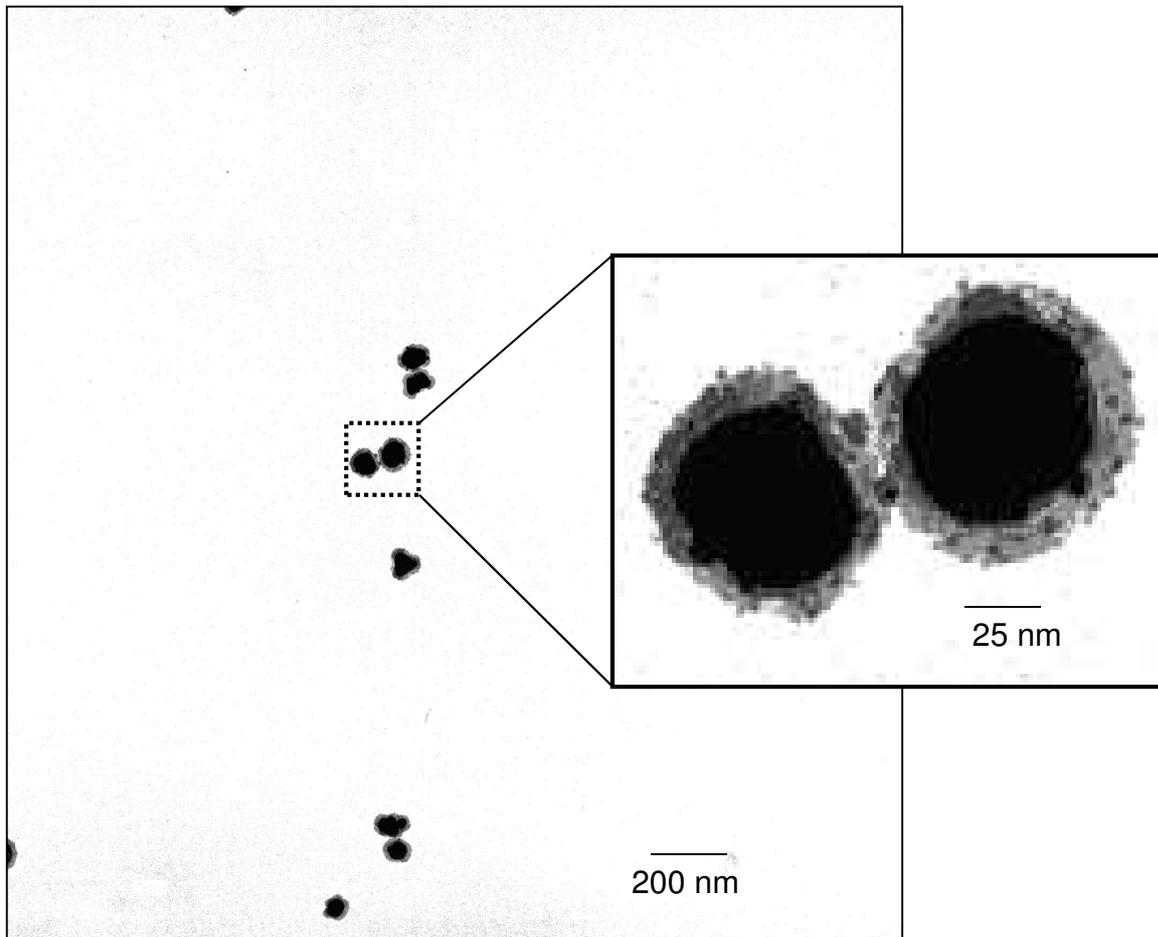


Abbildung 4.8: TEM-Aufnahme von Partikeln aus Ansatz 6.

Dieser Effekt wird von Park et al. für reine Silicananopartikel beschrieben. Dies wird in dieser Arbeit auf das Kern-Schale-Modell übertragen. Umso höher die Gesamtkonzentration an Wasser ist, desto kleinere Silicananokerne aggregieren.^[165]

Dabei wird davon ausgegangen, dass es eine Attraktion von einzelnen Silicananopartikeln zu einander durch Wassermoleküle gibt. Durch Wechselwirkung des elektronegativen Sauerstoffs der Silanolatgruppe mit den Protonen von H_2O kommt es zu einer Verringerung des Abstandes zwischen den Silicananokernen. Wird folglich die Konzentration von Wasser erhöht, so kommt es zu einer Verringerung des Abstandes der Silicananokerne zueinander.^[165] Die Partikelkerne aggregieren infolgedessen stark (s. Abbildung 4.9). Aufgrund der hohen Affinität des PVP zu den Nanokernen binden diese aneinander.^[144] Dementsprechend ist bei der Betrachtung der Wasserkonzentration nicht nur das Verhältnis von Wasser zu TEOS wichtig, sondern ebenfalls die absolute Wasserkonzentration in der Synthese. Chen et al. zeigten zudem, dass hohe Konzentrationen an H_2O und geringere Konzentrationen an NH_3 zur Bildung kleinerer Partikel führt.^[163]

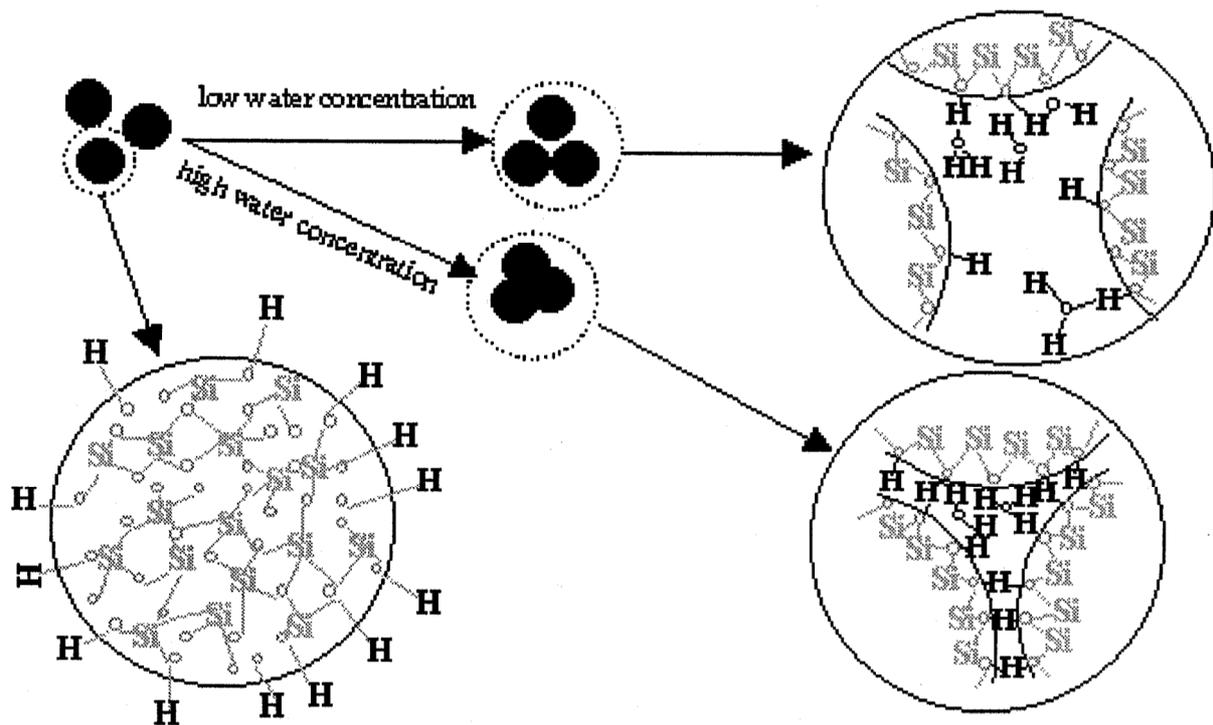


Abbildung 4.9: Effekt der Wasserkonzentration auf die Partikelgröße und die Größenverteilung der Partikel (Lizenz zur Verwendung der Abbildung von Elsevier eingeholt).^[165]

Carcouët et al. und Masalov et al. untersuchten das Wachstum von Silicananopartikeln und fanden heraus, dass das Wachstum nicht molekular erfolgt, sondern sich Nanokerne mit einem Durchmesser von etwa 1 nm bilden, die zusammenwachsen.^{[160],[161]} In Tabelle 4.4 sind die erzielten Schalendicken der einzelnen Synthesen (1 bis 6) zusammengefasst:

Tabelle 4.4: Ansätze und Dicke der generierten Silicaschale.

Ansatz	berechnete Schalendicke [nm]	erhaltene Schalendicke (TEM-Auswertung) [nm]	Anmerkungen
1	5	-	Keine Silicaschalen
2	10	12±8	Sehr divers: zusammengewachsene Nanopartikel, nicht geschlossene Silicaschale, Zweitnukleate, nicht ummantelte Nanopartikel
3	20	26±15	Größere Anzahl an Goldnanopartikeln mit dünner Silicaschale im Verhältnis zu den Nanopartikeln aus Synthese 2, inhomogene Silicaschalen, Zweitnukleate
4	10	4±3	Silicaschalen klein und homogen
5	10	-	Keine Silicaschalen
6	10	12±3	inhomogene, dicke Silicaschalen

Aus der systematischen Untersuchung der Synthese von Goldnanopartikeln mit einer 4 nm Silicaschale wird deutlich, dass hierfür mehr TEOS verwendet werden muss, als berechnet (vgl. Synthese 1 (5 nm berechnet) und 4 (10 nm berechnet)). Es zeigt sich, dass sich bei einer berechneten Silicaschale von 5 nm keine Silicaschale bildet, während sich für eine berechnete Silicaschale von 10 nm eine 4 nm Silicaschale bildet. Für eine Silicaschale von 4 nm ist folglich etwa die 3.6-fache Masse des berechneten TEOS bzw. SiO₂ notwendig. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich neben dem Silica, das auf den Goldnanopartikeln aufwächst, auch Silicananokerne in der Dispersion bilden (s. Abbildung 4.6). Wird eine größere Menge an TEOS (entspricht einer Silicaschalen von 20 nm) zugegeben, so bilden sich dickere und inhomogenere Silicaschalen und die Nanopartikel wachsen zusammen.

Zudem scheint die Ammoniakkonzentration der entscheidende Parameter beim Silicaschalenwachstum zu sein: Vergleicht man die Synthesen 2 (0.64 mol/L NH₃, 100%), 4 (0.59 mol/L NH₃, 92%) und 6 (0.53 mol/L NH₃, 83%) fällt auf, dass in Synthese 2 eine

inhomogene Silicaschale um die Goldnanopartikel gebildet, während die Silicaschale in Synthese 4 homogen war und in Synthese 6 sich kleine Silicakerne auf der Goldnanopartikeloberfläche bildeten. H. Giesche zeigte, dass die Ammoniakkonzentration einen deutlich größeren Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat als die Wasserkonzentration.^[166] An dieser Stelle muss nochmals erwähnt werden, dass Wasser in deutlichem Überschuss eingesetzt wurde. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass eine bestimmte Ammoniakkonzentration (0.59 mol/L) eingesetzt werden muss, um eine homogene und dünne Silicaschale auf die Goldnanopartikel homogen wachsen zu lassen.

Es wird vermutet, dass durch Verringerung der Ammoniakkonzentration und Erhöhung der absoluten Wasserkonzentration in Synthese 6 die Porosität der Silicaschale zunimmt, sodass sich die Silicaschale vergrößert (s. Abbildung 4.8). Das Verhältnis von TEOS zu Wasser wurde hingegen konstant gehalten. Zudem wird vermutet, dass die Zuflussgeschwindigkeit von TEOS bei der Bildung einer Silicaschale eine entscheidende Rolle spielt: Bei einer geringen Zuflussgeschwindigkeit konnte gezeigt werden, dass sich keine Silicaschale um die Goldnanopartikel bildet, sondern vermutlich Silicananopartikel entstehen, die durch die Aufreinigung entfernt werden (vgl. Synthese 4 und 5).

Mit den Kern-Schale-Nanopartikeln aus Synthese 4 kann gezeigt werden, dass mit exakt eingestellten Parametern reproduzierbare Goldnanopartikel mit einer dünnen Silicaschale generiert werden können.

Da die generierten Nanopartikel aus Synthese 4, die kommerziell erhältlichen Goldnanopartikel und die synthetisierten fluoreszierenden Silicananopartikel mit Zellen inkubiert werden sollen, wird im Folgenden die Stabilität der Dispersionen mittels Messungen der dynamischen Lichtstreuung bestimmt um zu gewährleisten, dass die Nanopartikel nicht aggregiert vorliegen. Dabei werden beide Nanopartikelsysteme in Reinstwasser und in einem Zellkulturmedium (engl.: *Keratinocyte growth medium* (KGM-Gold™ BulletKit™)) vermessen.

Bestimmung des Brechungsindex und der dynamischen Viskosität des KGM-Gold™ BulletKit™

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von Nanopartikeln mittels dynamischer Lichtstreuung ist die vorherige Kenntnis der Viskosität und des Brechungsindexes essentiell. Da der Hersteller keine Charakterisierungsdaten zum Zellkulturmedium liefert, werden diese beiden Parameter experimentell bestimmt.

Der Brechungsindex von KGM-Gold™ BulletKit™ bei 25 °C und 589 nm beträgt 1.3362 ± 0.0001 .

Die kinematische Viskosität wird mit einem Mikro-Ostwald-Viskosimeter bestimmt. Dabei wird die Zeit bestimmt, die das Zellkulturmedium benötigt um von Markierung E1 bis Markierung E2 zu fließen (s. Abbildung 3.5). Es wurden 5 Einzelmessungen durchgeführt und ein arithmetisches Mittel von $\nu = (66.6 \pm 0.2)$ s. Die kinematische Viskosität kann durch Einsetzen in Gleichung (4.2) bestimmt werden. Dabei ist die kinematische Viskosität von einer Viskosimeter-abhängigen Konstante K und der Zeit t abhängig.

$$\nu = K(t - \nu) \quad (4.2)$$

Unter der Verwendung von $K = 0.01318$ und einer Hagenbachkorrektur von 0.06 s ergibt sich eine kinematische Viskosität von (0.877 ± 0.002) mm²s⁻¹. Zur Bestimmung der dynamischen Viskosität η wird zudem die Dichte ρ benötigt (s. Gleichung (4.3)). Zur Bestimmung der Dichte des Mediums wird fünfmal jeweils 1 mL des Mediums eingewogen. Dabei beträgt das arithmetische Mittel (1.023 ± 0.001) g*mL⁻¹.

$$\eta = \nu * \rho \quad (4.3)$$

Nach Gleichung (4.3) ergibt sich für die dynamische Viskosität η ein Wert von (0.897 ± 0.003) mPa*s.

DLS-Messungen an Goldnanopartikeln und Goldnanopartikeln mit 4 nm dicken Silicaschale (Synthese 4)

Da die Goldnanopartikel und die Goldnanopartikel mit Silicaschale in Reinstwasser gelagert werden, ist die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers, der Rück-

schlüsse auf die Aggregation der Nanopartikel liefert, notwendig. Zudem ist die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Nanopartikelsysteme in KGM-Gold™ BulletKit™ notwendig, da die humanen Keratinozyten in diesem Zellkulturmedium wachsen gelassen werden und die Nanopartikel damit inkubiert werden. Das Zellkulturmedium enthält zahlreiche Zusätze wie Wachstumsfaktoren, die das Wachstum und die Zellteilungsrate der Keratinozyten begünstigen.^[167] Die Goldnanopartikel sind über 2 a in Reinstwasser stabil (s. Tabelle 4.1). Der Polydispersitätsindex zeigt, dass es sich bei den Goldnanopartikeln um ein monodisperses System handelt (s. Kapitel 2.5.2). Im KGM-Gold™ BulletKit™ ist der hydrodynamische Durchmesser der Goldnanopartikel vergrößert (s. Tabelle 4.5). Somit zeigt sich, dass theoretisch ein durchschnittliches Aggregat ca. 18 monomere Nanopartikeleinheiten zum Zeitpunkt $t = 0$ d beinhaltet (s. Gleichung (4.6)).

$$V_{NP \text{ in } H_2O} = \frac{4}{3} \pi r^3 = (130924 \pm 24938) \text{ nm}^3 \quad (4.4)$$

$$V_{NP \text{ in } KGM} = \frac{4}{3} \pi r^3 = (2309565 \pm 506978) \text{ nm}^3 \quad (4.5)$$

$$\frac{V_{NP \text{ in } KGM}}{V_{NP \text{ in } H_2O}} = 17.6 \pm 5.1 \quad (4.6)$$

Hierbei entspricht $V_{NP \text{ in } H_2O}$ und $V_{NP \text{ in } KGM}$ den Volumina der Goldnanopartikel in Wasser und im KGM-Gold™ BulletKit™ und r dem Radius der Goldnanopartikel, der aus der dynamischen Lichtstreuung erhalten wird. Es muss berücksichtigt werden, dass die Streuintensität des Messsignals mit der sechsten Potenz des Radius zunimmt. Wenn daher einige wenige große Aggregate in der Dispersion vorhanden sind, steigt der hydrodynamische Radius mit der sechsten Potenz des Radius dieser Aggregate an.^[168]

Zudem muss beachtet werden, dass die enthaltenen Proteine im KGM-Gold™ BulletKit™ einen hydrodynamischen Durchmesser von (20 ± 2) nm mit einer großen Größenverteilung und einem PDI von 0.30 aufweisen. Die Proteine wie auch die Nanopartikel tragen daher einen Beitrag zum durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser, der aus der Kumulanten-Anpassung der DLS-Daten erhalten wird, bei.^[64] Nach mehr als fünf Tagen ist der gemessene hydrodynamische Durchmesser der Goldnanopartikel deutlich kleiner als zum Zeitpunkt $t = 0$ d. In der Messung nach $t = 0$ d rea-

gregieren die Nanopartikel mit der Zeit. Dies ist anhand des hydrodynamischen Durchmessers beobachtbar. Bei jeder der einzelnen DLS-Messungen steigt der hydrodynamische Durchmesser an. Der PDI lässt auf eine breite Größenverteilung der aggregierten Nanopartikel schließen. Die Aggregation der Goldnanopartikel ist auf die erhöhte Ionenstärke des KGM-Gold™ BulletKit™ zurückzuführen. Graf et al. zeigten, dass Ionenstärken im biologisch relevanten Bereich zu einer erhöhten Aggregation von Nanopartikeln führt.^[169] Der Hersteller des KGM-Gold™ BulletKit™ (Lonza) stellt keine Daten bezüglich der Zusammensetzung des Mediums bereit. Für vergleichbare Zellkulturmedien wie RPMI (Roswell Park Memorial Institute), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und isotonische Kochsalzlösung können Ionenstärken von 138 mmol/L, 168 mmol/L und 154 mmol/L berechnet werden.^[167] Daher ist es wahrscheinlich, dass das KGM-Gold™ BulletKit™ eine vergleichbare Ionenstärke hat. Die Aggregation kommt folglich aufgrund der erhöhten Ionenstärke des Zellkulturmediums im Verhältnis zu der des Reinstwassers zustande.^[64] Durch Anlagerung von entgegengesetzt geladenen Ionen verkleinert sich die elektrostatische Doppelschicht. Dabei ist die Debyelänge (Abschirmlänge) ein Maß für die Ausdehnung der elektrostatischen Doppelschicht. Die Debyelänge ist definiert als diejenige Länge, auf der das Oberflächenpotential auf das 1/e-fache abfällt.^[170] In Elektrolytlösungen wie KGM-Gold™ BulletKit™ ist die Debyelänge gegeben durch Gleichung (4.7):

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{e^2 N_A \sum c_i z_i^2}} \quad (4.7)$$

Dabei ist λ_D die Debyelänge, ϵ_0 die elektrische Feldkonstante, ϵ_r die Dielektrizitätskonstante der Lösung, k_B die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur, N_A die Avogadrozahl, e die elektrische Elementarladung, z die Wertigkeit und c die Konzentration der Ionen.^[64]

Durch die Erhöhung der Ionenstärke kommt es zur Verkleinerung der elektrostatischen Doppelschicht der Partikel und somit zur Herabsetzung der elektrostatischen Abstoßung der Partikel und folglich zu Aggregation.

Die DLS-Messungen mit Goldnanopartikeln mit Silicaschale zeigen, dass die Nanopartikel in Reinstwasser nach 0 d einen erhöhten hydrodynamischen Durchmesser als der Durchmesser, der durch TEM-Messungen ermittelt wurde (68 ± 8 nm), aufweisen.

Folglich ist das Volumen der leicht aggregierten Nanopartikel in Reinstwasser im Verhältnis zum TEM-Durchmesser verdoppelt. Die Differenz von TEM- zu hydrodynamischen Durchmesser kann nur teilweise durch die räumliche Ausdehnung der Liganden und adsorbierter Lösemittelmoleküle erklärt werden.^[119] In der TEM-Aufnahme (s. Abbildung 4.7) ist zu erkennen, dass in der Probe ebenfalls Dimere vorhanden sind. Die Goldnanopartikel mit Silicaschale haben nach fünftägiger Lagerung einen signifikant kleineren hydrodynamischen Durchmesser von (71 ± 3) nm. Der Polydispersitätsindex von 0.13 ± 0.07 zeigt, dass es sich um eine monodisperse Probe handelt.

Die hydrodynamischen Durchmesser der Silica-ummantelten Goldnanopartikel in Reinstwasser und KGM-Gold™ BulletKit™ sind hingegen nicht signifikant unterschiedlich. Dies bedeutet, dass es zu keiner spontanen Aggregation der Nanopartikel kommt. Dies steht im Gegensatz zu den Goldnanopartikeln in Zellkulturmedium nach 0 d. Folglich sind Nanopartikel mit einer Schale aus SiO_2 zunächst stabiler als Partikel mit Citrat auf der Oberfläche. Nach einer Inkubationszeit von 5 d beträgt der hydrodynamische Durchmesser (125 ± 3) nm und ist somit leicht vergrößert. Die reinen Silicananopartikel haben im biologischen Medium über den Messbereich von 5 d einen im Fehlerintervall konstanten hydrodynamischen Durchmesser (s. Tabelle 4.5). Da die drei Nanopartikelsorten eine enge Größenverteilung des hydrodynamischen Durchmessers von (117 ± 1) nm bis (129 ± 6) nm nach 5 d im biologischen Medium haben, sind diese gut vergleichbar.

Tabelle 4.5: Hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersitätsindex der Goldnanopartikel mit/ohne Silicaschale und der Silicananopartikel in Reinstwasser und KGM-Gold™ BulletKit™.

Nanopartikel	Lösemittel	hydrodynamischer Durchmesser [nm] nach		Polydispersitätsindex (PDI)	
		0 d	>5 d	0 d	>5 d
Goldnanopartikel	Reinstwasser	63±2	62±4	0.13±0.04	0.13±0.09
	KGM-Gold™ BulletKit™	164±6	129±6	0.32±0.02	0.22±0.03
Goldnanopartikel mit SiO ₂ -Schale	Reinstwasser	87±4	71±3	0.18±0.04	0.13±0.07
	KGM-Gold™ BulletKit™	88±2	125±3	0.21±0.04	0.14±0.02
Silicananopartikel	Reinstwasser	96±2	97±2	0.03±0.03	0.05±0.08
	KGM-Gold™ BulletKit™	126±8	117±1	0.17±0.03	0.17±0.04

Aus den DLS-Resultaten lässt sich schließen, dass die Nanopartikel im Zellkulturmedium wenig aggregieren.

4.1.3. Untersuchung von humanen Keratinozyten mittels cryo-XM/T und TEM

Zur Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln mit einer Citratfunktionalisierung (Goldnanopartikel) und Nanopartikeln mit einer Silanolatoberfläche (Goldkerne mit Silicaschale und Silicananopartikel) in den Zellkern von humanen Keratinozyten werden zwei verschiedene Analyseverfahren (cryo-XM/T und TEM), die jeweils Vor- und Nachteile haben, genutzt.

Für die TEM werden die Proben zunächst mit OsO₄, K₄(Fe(CN)₆) und (CH₃)₂AsO₂Na fixiert, mit aufsteigender Ethanolkonzentration entwässert, in Propylenoxid und Epon polymerisiert, semidünn (0.5 µm bis 1 µm) dann ultradünn (70 nm) geschnitten sowie

mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Bei dieser Doppelkontrastiermethode erhöht Uranylacetat den Kontrast von Lipiden und Proteinen, während Bleicitrat den Kontrast von Proteinen und Polysacchariden erhöht.^[171] Ein Nachteil dieser etablierten Prozedur ist, dass Nanopartikel aus dem extrazellulären Bereich gewaschen werden können. Nach erfolgter Probenpräparation können die Proben über Jahre gelagert werden und mittels TEM abgebildet werden. Moderne TEM haben heutzutage Auflösungen bis in den Sub-Ångström-Bereich.^[172] Transmissionselektronenmikroskope sind zudem häufig verfügbar. Das verwendete TEM hat eine Auflösung von etwa 1 nm. Um die biologischen Proben am Speicherring BESSY II mittels cryo-XM/T mikroskopieren zu können, werden diese zunächst cryofixiert. Hierbei wird die biologische Probe in flüssigem Ethan ($T = 183 \text{ K}$) so eingefroren, dass amorphes Eis entsteht. Damit werden die einzelnen Zellbestandteile nicht zerstört, sondern in einem nahezu natürlichen Zustand fixiert. Bei zu hoher oder zu niedriger Temperatur kann es zur Kristallisation des Eises kommen. Dies führt wiederum zur Deformation der Zellen. Bei der cryo-XM/T bei BESSY II können dreidimensionale innere Strukturen mit einer räumlichen Auflösung von ca. 14 nm aufgelöst werden.^[131] Während eine einzelne cryo-XM/T Aufnahme ausschließlich eine Orientierung der Zellen visualisiert, können Tomogramme, Aufnahmen verschiedener Winkel darstellen. Das Ergebnis ist ein Satz von Projektionen. Durch Stapelung der einzelnen Aufnahmen kann ein dreidimensionales Objekt rekonstruiert werden. Hierdurch bekommt man einen dreidimensionalen Eindruck von der Zelle. Aufgrund der Auflösung des cryo-XM/T und aufgrund der Dicke der biologischen Proben, werden Nanopartikel mit einem Durchmesser $> 50 \text{ nm}$, die aus einem Material mit hohem Absorptionsquerschnitt (beispielsweise Gold) bestehen, benötigt.

Ein Vorteil von cryo-XM/T ist, dass biologische Proben, die nanoskalige Strukturen aufweisen, mit elementspezifischem Kontrast (Spektromikroskopie) untersucht werden können.^[131] Dies ist auf die verschiedenen Photoabsorptionsquerschnitte der Rumpfniveau-Absorption zurückzuführen. Die spektrale Auflösung ist etwa um einen Faktor 40,000 höher als bei energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX), die häufig mit TEM kombiniert wird.^[173] Zudem können dicke biologische Proben (bis zu $10 \mu\text{m}$) mittels cryo-XM/T abgebildet werden. Anhand einer einzelnen cryo-XM/T-Aufnahme kann jedoch nicht herausgefunden werden, ob Nanopartikel an den Zellkern adhärirt sind oder vom Zellkern aufgenommen wurden. Da in Transmission gemessen wird, erhält man nur eine zweidimensionale Projektion eines dreidimensionalen

Objekts. Trotz dieser Vorteile ist die Anzahl von verfügbaren Aufbauten limitiert, so dass cryo-XM/T nur zur Untersuchung von wenigen biologischen Proben, die mit Nanopartikeln inkubiert wurden, in der Vergangenheit angewendet wurde.^[143]

Durch die Untersuchung von Proben mit verschiedenen Analyseverfahren sind resultierende Ergebnisse valider als durch Untersuchung mit ausschließlich einem Verfahren.

4.1.3.1. Untersuchung mittels cryo-XM/T

In der folgenden Untersuchung mittels cryo-XM/T sollte herausgefunden werden, ob Nanopartikel mit einer Citrat- oder Silanolatoberfläche mit einem Durchmesser von 60 bzw. 68 nm vom Zellkern primärer humaner Keratinozyten aufgenommen werden können. Dabei ist der Zellkern die bedeutendste subzelluläre Struktur, da hier die DNA-Replikation und -Transkription stattfindet. Da in naher Zukunft Nanopartikel als Boten im Bereich der Gentherapie verwendet werden könnten, ist es wichtig, das Gefahrenpotential und daher die Aufnahme von Nanosystemen in den Zellkern zu bestimmen. Keratinozyten wurden aus humaner Haut gewonnen, kultiviert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (4-(4-Diethylaminostyryl)-1-methyl-pyridinium-iodid, 4-Di-2Asp) markiert. Die Keratinozyten wurden auf mit Formvar beschichtete Goldnetzchen ausgesät. Nachdem die Zellen auf dem Formvarfilm festgewachsen waren, wurden sie über zwei oder 48 h mit Goldnanopartikel mit und ohne Silicaschale inkubiert. Anschließend wurden die Goldnetze bei etwa -160 °C in flüssigem Ethan zügig mittels „plunge freezing“ eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert, sodass sich die Wassermoleküle amorph anordnen.

Vor den cryo-XM/T-Untersuchungen wurden die eingefrorenen Proben mit Fluoreszenzmikroskopie mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm abgebildet. Die cryo-XM/T-Untersuchungen wurden unterhalb der K-Absorptionskante des Sauerstoffs bei 510 eV durchgeführt, da das verwendete Mikroskop einen Messbereich von etwa 250 bis 600 eV hat und Wasser bei 510 eV die höchste Transmission (ca. 90%) besitzt. Durch Markierung der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff konnten die Zellen auf dem Goldnetz mittels eines Fluoreszenzmikroskops, das in das Röntgenmikroskop eingebaut ist, lokalisiert werden. Das Aufnahmefeld des Fluoreszenzmikroskops hat die Größe eines halben Fensters des Goldnetzes (s. Abbildung 3.4) mit einer Größe von 50 µm. Dies wurde nach Zellen abgesehen und dann die nächste Position gewählt.

Teilweise waren gefundene Zellen nicht für die cryo-XM/T-Aufnahmen oder Rohtomographie geeignet. Ein häufiger Grund hierfür war, dass Zellen am Rand des Fensters lokalisiert waren, sodass bei einer Rohtomographie der das Fenster begrenzende Goldsteg die untersuchte Zelle verdecken würde, da dieser bei einer Rotation der Probe vor die Zelle gedreht würde. Zudem waren zahlreiche Zellen in cryo-XM/T-Aufnahmen nicht zu identifizieren. Meist wurden Zellen aus demselben Fenster des Goldnetzes gewählt. Diese Position ist nicht immer auf der Fluoreszenzmikroskopieaufnahme zu erkennen.

Einige Positionen waren unbrauchbar, da keine Zellen oder kein Formvarfilm vorhanden waren. Dieser ist möglicherweise beim Einfriervorgang verloren gegangen, da Temperaturunterschiede von ca. 200 °C und ebenfalls große mechanische Kräfte durch das schnelle Einfrieren herrschten, sodass die Goldnetzchen häufig verbogen waren und für das Einsetzen in den Probenhalter der cryo-XM/T in eine plane Form gebogen werden mussten. Zudem führte eine zu dicke Eisschicht dazu, dass Zellen nicht mehr beobachtet werden konnten. Wenn die Dicke der Eisschicht über 40 µm am Ende des Netzchens betrug, konnte das Goldnetzchen nicht in die Nut des cryo-Probenhalters eingesetzt werden. Die Schichtdicke des Eises konnte folgendermaßen grob abgeschätzt werden. Maser und Wang et al. zeigten, dass bei einer Eisdicke von 10 µm Röntgenstrahlung mit einer Energie von 500 eV so durchdringt, dass Aufnahmen mit hoher Auflösung und hohem Kontrast resultieren.^{[174],[175]} Da Zellen eine vertikale Ausdehnung von ca. 10 µm haben, sind diese bei dieser Eisdicke vollständig eingebettet. Eine Abschätzung der Dicke des Eises kann mittels Lichtmikroskopie erfolgen, indem evaluiert wird, in welchem Bereich sich die Abbildung der Probe fokussieren lässt. Dabei ergaben sich Werte von 50 µm. Diese widersprechen den zuvor genannten Bedingungen. Die Abschätzung der Dicke des Eises mittels Lichtmikroskopie ist folglich ungenau. Der Absorptionsquerschnitt nimmt mit der Dicke des Eises stark zu, sodass es bei einer Änderung der Dicke des Eises von 10 auf 30 µm zu einer etwa zehnfachen Abnahme der transmittierten Strahlung bei 510 eV kommt.^[155] Positionen, die mit einer Eisschicht von >30 µm bedeckt sind, können folglich nicht mit ausreichendem Kontrast abgebildet werden. Wenn die Zellen eine zu dünne Eisschicht aufweisen, kommt es bei längerer Bestrahlung beispielsweise während der Aufnahme einer Probe bei verschiedenen Winkeln (Rohtomographie) zu Strahlenschäden (s. Abbildung 4.10.2). Die Dicke des Formvarfilms hat hingegen einen geringen Einfluss auf

die Strahlendosis. Bei einer Dicke von 50 nm beträgt die Transmission von Röntgenstrahlung bei 510 eV etwa 96%, bei 100 nm ca. 92% und bei 1 µm ungefähr 43%.^[155] Da der Formvarfilm eine Dicke von maximal 100 nm hat, werden folglich nur etwa 8% der Röntgenstrahlung absorbiert.^[155] Andere Materialien, wie Siliziumnitrid, Polypropylen oder Teflon haben vergleichbare Absorptionsquerschnitte wie Formvar.^[155] Wenn das Goldnetzchen um 180° gedreht in den Probenhalter eingesetzt wird, trifft die Röntgenstrahlung zunächst auf den Formvarfilm und nicht auf die schützende Eisschicht. Hierdurch können Strahlenschäden verstärkt auftreten.

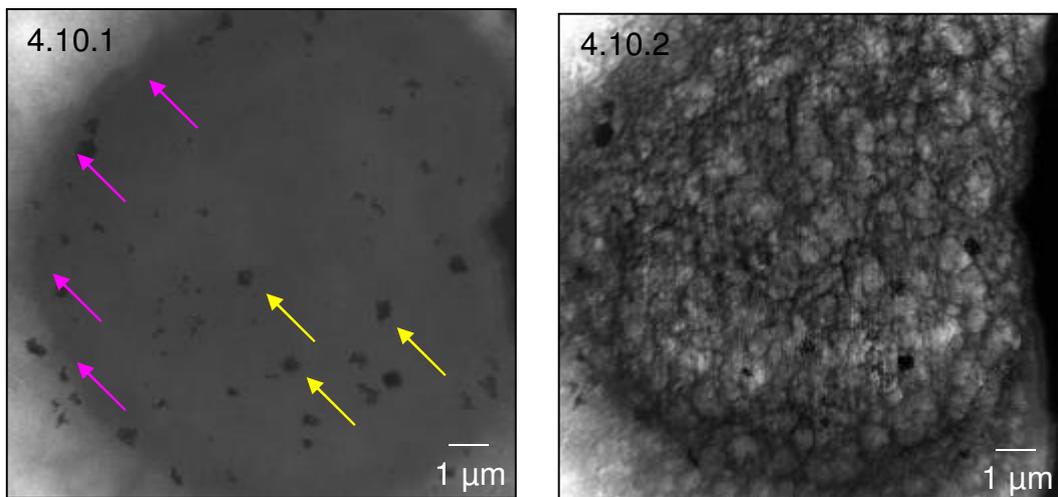


Abbildung 4.10: Cryo-XM/T-Aufnahme eines Keratinozyten mit Goldnanopartikeln (schwarze Strukturen sind Nanopartikel) vor der Aufnahme der Rohtomogramme (Abbildung 4.10.1), nach der Aufnahme der Rohtomogramme mit Strahlenschäden (Abbildung 4.10.2). In Abbildung 4.10.1 ist die Zellkernmembran mit magentafarbenen Pfeilen die Goldnanopartikel mit gelben Pfeilen gekennzeichnet. Inkubationszeit 2 h.

Die Strahlendosis während der cryo-XM/T-Aufnahme (Abbildung 4.10.1) beträgt etwa $5 \cdot 10^7$ Gy und bei der Rohtomographie ca. 10^9 bis 10^{10} Gy (Aufnahme nach Rohtomographie, s. Abbildung 4.10.2).^[136] Die Energiedosis während der Rohtomographie ist so hoch, dass Proteine innerhalb des Zellkerns denaturieren. Während der Denaturierung durch Röntgenstrahlung kommt es zum Bruch kovalenter Bindungen (Depolymerisation). Dabei wird die Probe mit größer werdender Dosis inhomogen. Es entstehen Bereiche auf der Probe, die mehr Röntgenstrahlung absorbieren als andere. Somit sind die Nanostrukturen kaum zu identifizieren. Problematisch sind zudem verschiedene Dicken der Eisschicht innerhalb einer Probe, da folglich die Fokussierung der Probe während der Rohtomographie variiert. Daher sind Zellmembranen und Zellkernmembranen in solchen cryo-XM/T-Aufnahmen kaum oder gar nicht auswertbar. Aus

Abbildung 4.10.1 lässt sich nicht schließen, ob sich die Nanopartikel im Zellkern befinden oder am Zellkern adhärirt sind. Darüber kann ausschließlich die ausgewertete Tomographie Aufschluss geben. Im Folgenden wird beschrieben, wie aus einem Rohtomogramm ein ausgewertetes Tomogramm entsteht:

Um eine Tomographie von Zellen zu erhalten ist eine EDV-gestützte Auswertung der Rohtomogramme notwendig. Zunächst werden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie identifiziert und anschließend mittels cryo-XM/T bei verschiedenen Winkeln abgebildet. Dazu wird ein euzentrischer Probenhalter verwendet, auf dem die Probe befestigt wird und seriell um ca. $\pm 50^\circ$ oder $\pm 60^\circ$ mit 1° - oder 2° -Inkrementen rotiert wird. Werden die einzelnen Aufnahmen abgespielt, so wird hieraus ein Rohtomogramm erhalten. Aus diesem Rohtomogramm muss über eine Rückprojektion ein Tomogramm berechnet werden (s. Abbildung 4.11), da das Koordinatensystem des Rohtomogramms nicht gleich dem Koordinatensystem des Mikroskops und somit nicht gleich dem Koordinatensystem des Tomogramms aufgrund der Rotation der Probe ist. Dazu sind Berechnungen mit dem IMOD-Software-Paket (mit dem graphischen Benutzer-Interface E-Tomo) notwendig. Zu diesem Programm gehören zahlreiche Programme, die in Kapitel 2.5.6.2 beschreiben werden.^{[137],[138]}

Eine übergangslose Rekonstruktion kann durch die Anpassung eines Satzes von Einzelaufnahmen des Rohtomogramms gebildet werden (s. Abbildung 2.23). Das Programm zur Erstellung der Rückprojektion (ETomo) nutzt dazu sämtliche angepasste Aufnahmen eines Satzes von Projektionen in die, die im Kapitel 2.5.6.2 beschriebenen Anpassungen vorgenommen werden. Zur Anpassung werden Marker (in diesem Fall die inkubierten Goldnanopartikel bzw. Silica-ummantelte Goldnanopartikel) innerhalb der Proben verwendet. Die Positionen der Partikel werden zu Projektionsgleichungen angepasst, um die Parameter zu finden und die einzelnen Aufnahmen anzupassen.^[137] In anderen Studien werden die Proben mit Markierungsbojen (Silicananopartikel mit Goldschale) mit einem Durchmesser von 270 nm verwendet.^[136] Schließlich wird die tomographische Rekonstruktion mittels eines reziproken Raum-Algorithmus durchgeführt. Stark vereinfacht ist die Rückprojektion der Einzelaufnahmen des Rohtomogramms in ein Tomogramm in Abbildung 4.11 dargestellt.

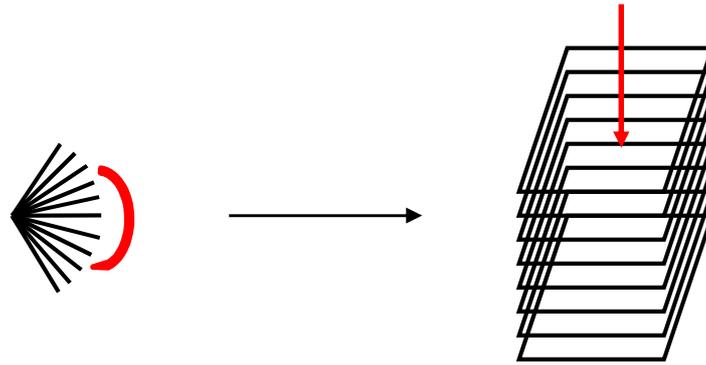


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Umwandlung von einem Rohtomogramm in ein Tomogramm.

Im Folgenden werden die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Schnittbilder der Tomogramme der Zellen analysiert.

4.1.3.2. Untersuchung der Aufnahme von Citrat-funktionalisierten Goldnanopartikeln in humane Keratinozyten

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Erkennbarkeit der Zellmembran und der Zellkernmembran ausgesucht (s. Abbildung 4.12). In den anschließenden cryo-XM/T-Aufnahmen ist zu erkennen, dass sich Nanopartikel ($d = (60 \pm 5)$ nm) im Bereich des Nukleo- und des Zytoplasmas befinden.

In der Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (Abbildung 4.12.1) sind die Zellkern- und die Zellmembran erkennbar. Zur weiteren Untersuchung wurde die Zelle mittels cryo-XM/T untersucht. In Einzelprojektionen des Tomogramms ist erkennbar, dass die mit gelben Pfeilen markierten Nanopartikel aus Abbildung 4.12.2 in anderen Ebenen lokalisiert sind als die mit türkisfarbenen Pfeilen markierten Nanopartikel. Anhand von Abbildung 4.12.3 ist erkennbar, dass sich die Nanopartikel in derselben Ebene befinden wie die Zellkernmembran (mit magentafarbenen Pfeilen gekennzeichnet). Wenn die Partikel mit der Zellkernmembran in einer Ebene liegen, müssen sich die Nanostrukturen im Zellkern befinden. Zudem bewegen sich die Nanopartikel, die sich innerhalb des Zellkerns befinden, in einem kleinen Radius bzw. Nanopartikel, die sich außerhalb des Zellkerns befinden mit einem größeren Radius im Tomogramm. Das Aggregat aus Abbildung 4.12.3, das durch einen gelben Pfeil markiert wird, ist an die Zellkernmembran adhärirt. Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 4.12 wird deutlich, dass eine Tomographie es ermöglicht zu beurteilen, ob Nanopartikel im Zellkern lokalisiert sind.

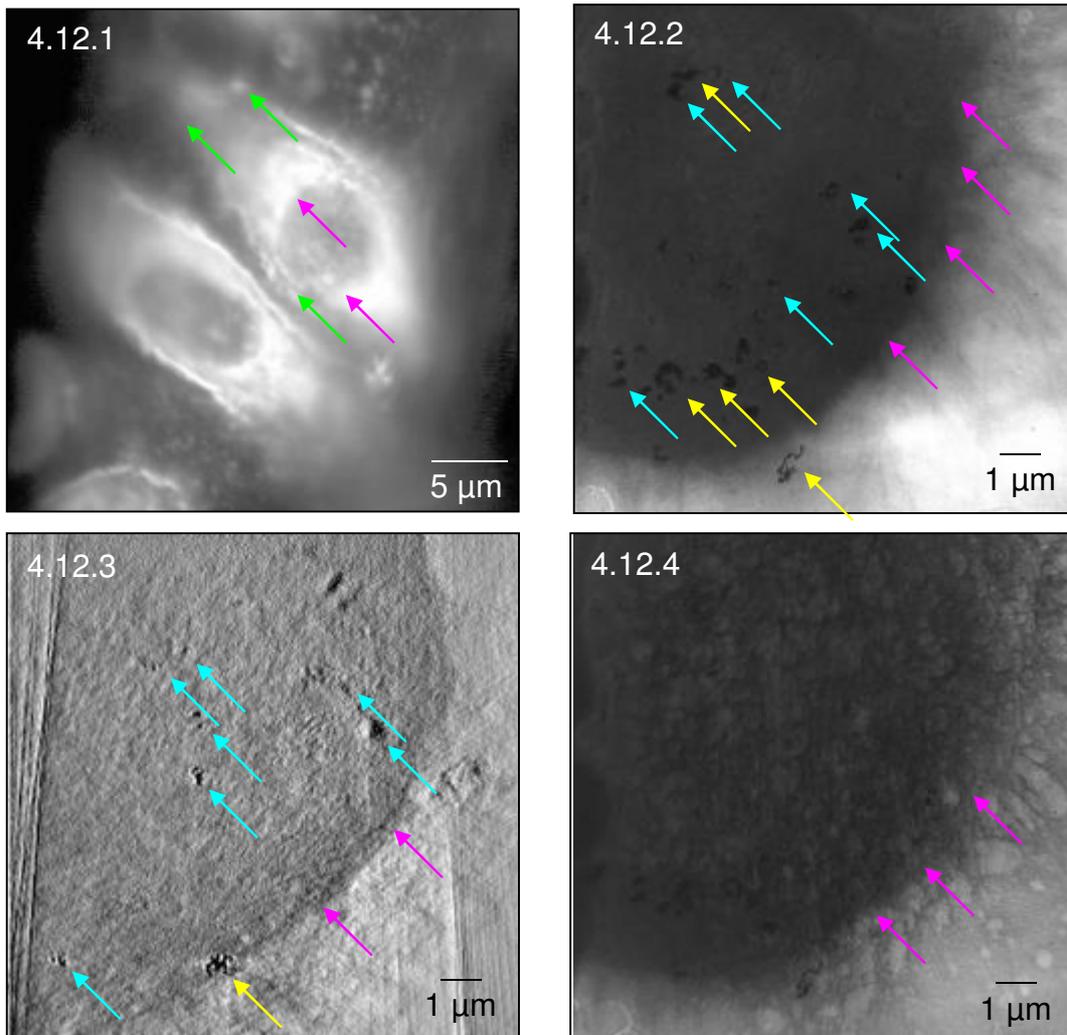


Abbildung 4.12: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme eines Keratinozyten mit Goldnanopartikeln (Abbildung 4.12.1), cryo-XM/T-Aufnahme der markierten Zelle vor der Aufnahme der Rohtomogramme (Abbildung 4.12.2), ausgesuchte Aufnahme aus der Tomographie (Abbildung 4.12.3). Darin ist zu erkennen, dass Nanopartikel in dem Zellkern lokalisiert sind. Cryo-XM/T-Aufnahme nach der Aufnahme der Rohtomogramme mit Strahlenschäden (Abbildung 4.12.4). In Abbildung 4.12.1, Abbildung 4.12.2 und Abbildung 4.12.3 ist die Zellmembran mit grünen Pfeilen, die Zellkernmembran mit magentafarbenen Pfeilen, die Goldnanopartikel, die sich außerhalb des Zellkerns befinden mit gelben Pfeilen, die Goldnanopartikel, die sich innerhalb des Zellkerns befinden, mit türkisfarbenen Pfeilen gekennzeichnet. Inkubationszeit 2 h. Das Tomogramm befindet sich auf einer CD im Anhang: Dateiname: 2_20110617-02-a.

Im Folgenden wurde eine weitere Zelle, die mit Goldnanopartikeln inkubiert wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Cryo-XM/T analysiert (s. Abbildung 4.13). Dabei ist anhand der Tomographie zu erkennen, dass einige Goldnanopartikel in den Zellkern aufgenommen wurden. Es sind neben kleinen Aggregaten ebenfalls Aggregate mit einem Durchmesser von etwa 400 nm innerhalb des Zellkerns zu finden.

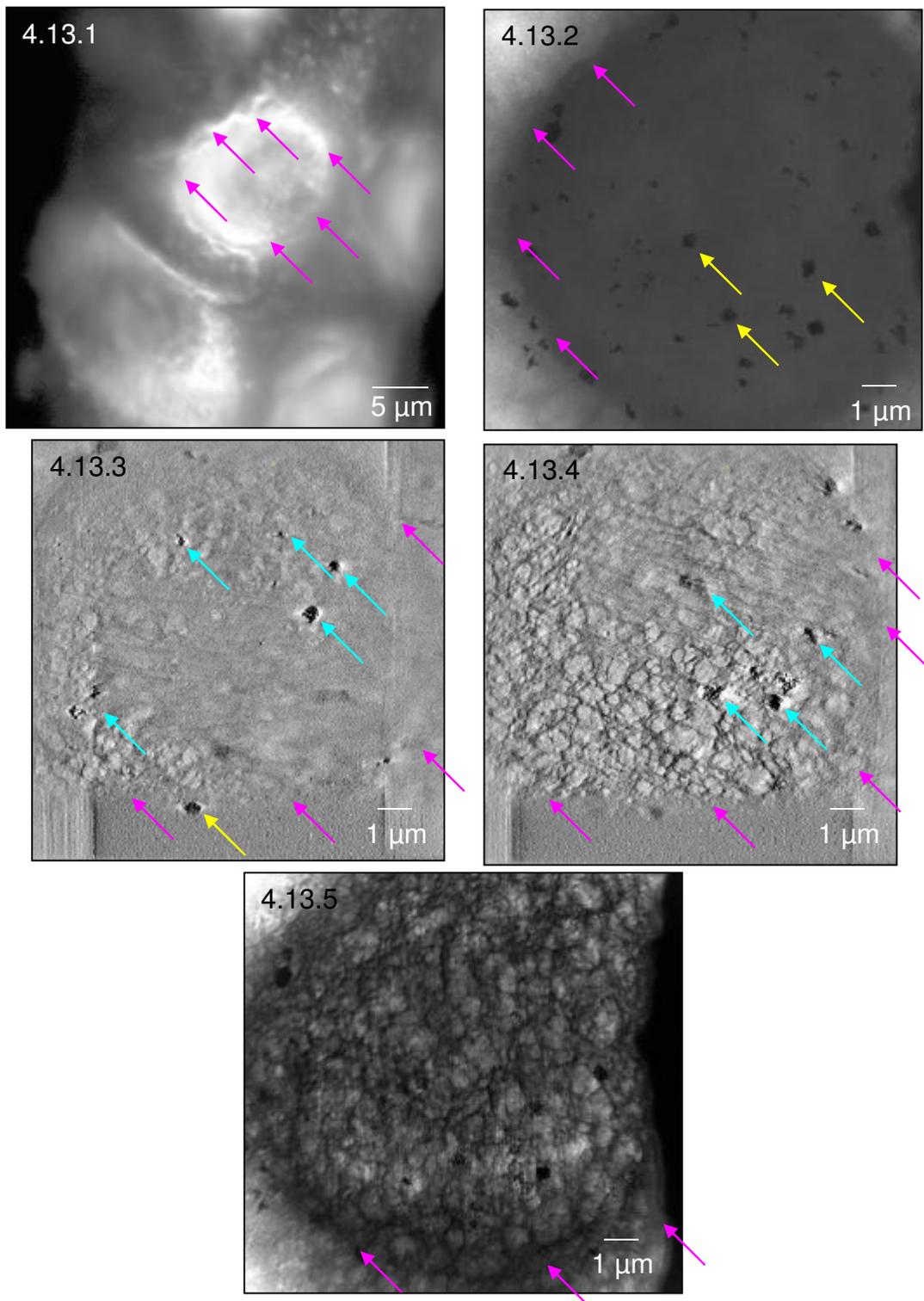


Abbildung 4.13: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme eines Keratinozyten mit Goldnanopartikeln nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden vor der Aufnahme der Rohtomogramme (Abbildung 4.13.1). Cryo-XM/T-Aufnahme (Abbildung 4.13.2) der markierten Zelle vor der Aufnahme der Rohtomogramme. Die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen Pfeilen gekennzeichnet. In den ausgesuchten Aufnahmen zur Tomographie (Abbildung 4.13.3 und Abbildung 4.13.4) ist zu erkennen, dass sich die Nanopartikel im Zellkern befinden. Nanopartikel, die sich im Zellkern befinden sind mit türkisarbenen, Nanopartikel, die sich außerhalb des Zellkerns befinden mit gelben Pfeilen gekennzeichnet. Cryo-XM/T-Aufnahme (Abbildung 4.13.5) des Keratinozyten nach der Rohtomographie mit zahlreichen Strahlenschäden. Das Tomogramm befindet sich auf einer CD im Anhang: Dateiname: 5_20110617-01-a.

In Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13 ist zu erkennen, dass nur Goldnanopartikelaggregate im Zellkern lokalisiert sind. In Abbildung 4.14 ist zu erkennen, dass einzelne Nanopartikel im Zellkern lokalisiert sind. Diese sind jedoch aufgrund der Auflösung des cryo-XM/T von ca. 14 nm kaum zu erkennen. Es ist fraglich, ob Nanopartikel im Zytoplasma aggregieren und dann vom Zellkern aufgenommen werden oder einzelne Nanopartikel vom Zellkern aufgenommen werden und anschließend im Karyoplasma aggregieren.

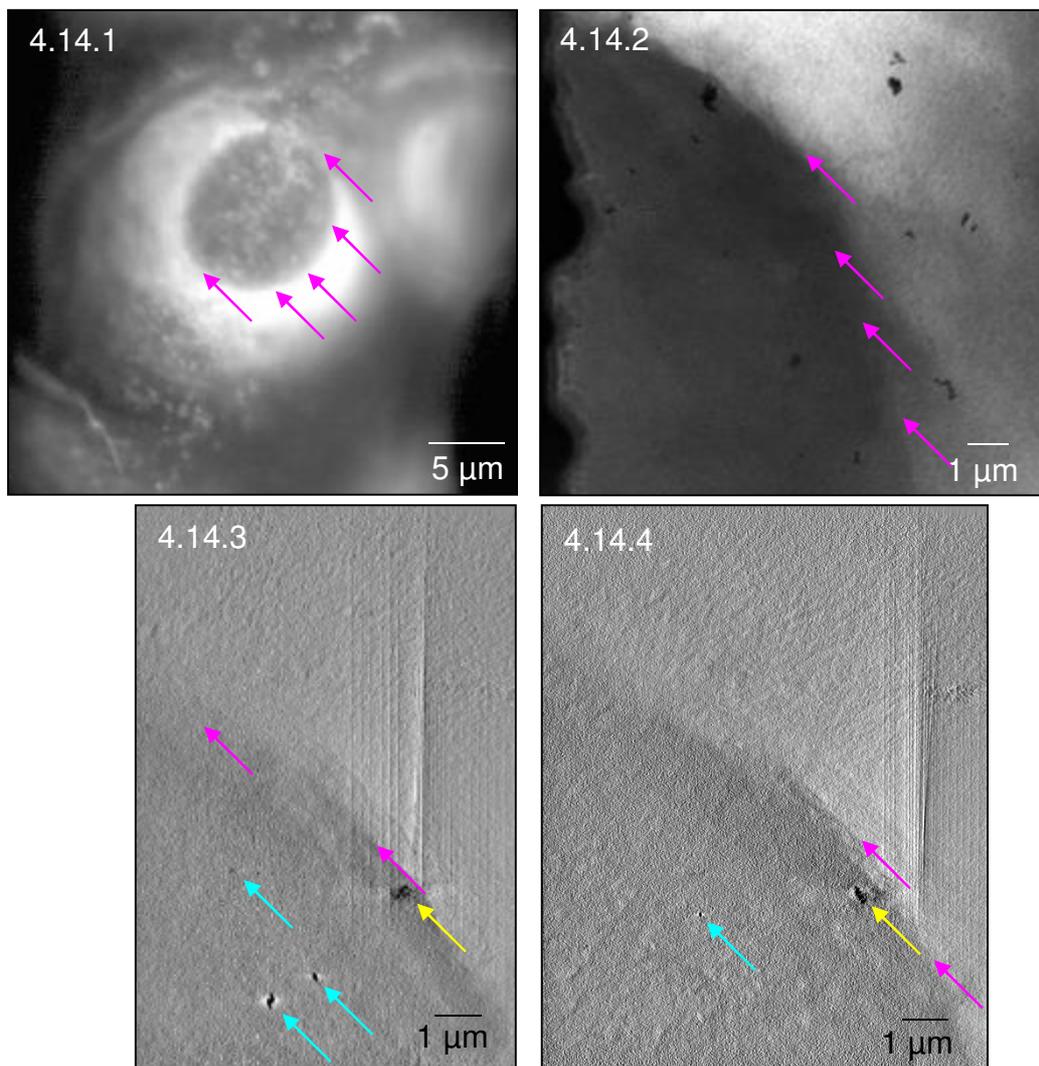


Abbildung 4.14: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (Abbildung 4.14.1) eines Keratinozyten mit Goldnanopartikeln ($d = (60 \pm 5) \text{ nm}$) nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden vor der Aufnahme der Rohtomogramme (-60° bis $+60^\circ$ mit 2° -Schritten). Cryo-XM/T-Aufnahme (Abbildung 4.14.2) der markierten Zelle vor der Aufnahme der Rohtomogramme. Die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen Pfeilen gekennzeichnet. In den ausgesuchten Aufnahmen zur Tomographie (Abbildung 4.14.3 und Abbildung 4.14.4) ist zu erkennen, dass sich einzelne Nanopartikel im Zellkern befinden. Nanopartikel, die sich im Zellkern befinden, sind mit türkisfarbenen Pfeilen, Aggregate, die sich außerhalb des Zellkerns befinden mit gelben Pfeilen gekennzeichnet. Das Tomogramm befindet sich auf einer CD im Anhang: Dateiname: 4_20110617-03-a.

Im Folgenden wurde eine weitere Zelle, die mit Goldnanopartikeln inkubiert wurde, mittels cryo-XM/T analysiert (s. Abbildung 4.15). Anhand der cryo-XM/T-Aufnahme (Abbildung 4.15.2) ist zu vermuten, dass Nanopartikel innerhalb des Zellkerns lokalisiert sind. Das Tomogramm befindet sich auf einer CD im Anhang: Dateiname: 20110617-05-a.

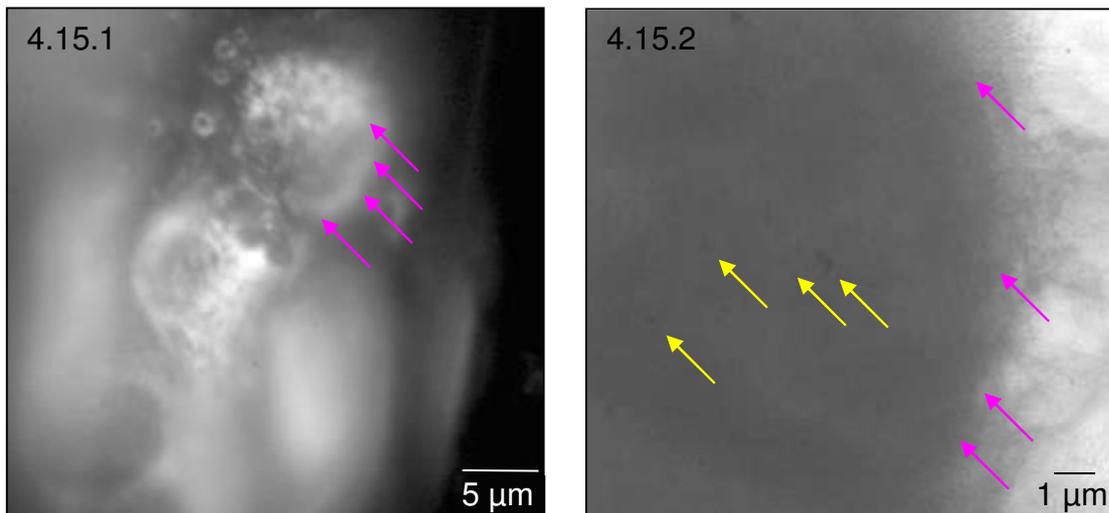


Abbildung 4.15: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (Abbildung 4.15.1) und cryo-XM/T-Aufnahme (Abbildung 4.15.2) eines Keratinozyten an dessen Kernmembran Goldnanopartikel adhärnt sind. Die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen Pfeilen gekennzeichnet. Nanopartikel, die sich außerhalb des Zellkerns befinden sind mit gelben Pfeilen gekennzeichnet.

Aus Abbildung 4.12, Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14 lässt sich schließen, dass Citrat-funktionalisierte Goldnanopartikel mit einem TEM-Durchmesser von (60 ± 5) nm und einem hydrodynamischen Durchmesser von (63 ± 2) nm in Reinstwasser in den Zellkern aufgenommen werden.

Die Diskussion zu den erhaltenen Ergebnissen erfolgt in Kapitel 4.1.3.6.

4.1.3.3. Untersuchung der Aufnahme von Goldnanopartikeln mit einer 4 nm Silicaschale in humane Keratinozyten

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Erkennbarkeit der Zellmembran und der Zellkernmembran ausgesucht. In den anschließenden cryo-XM/T-Aufnahmen ist zu erkennen, dass sich Nanopartikel ($d = (68\pm 8)$ nm) im Bereich des Zytoplasmas befinden.

In der cryo-XM/T-Aufnahme (s. Abbildung 4.16.1) ist zu vermuten, dass Silica-ummantelte Goldnanopartikel in das Nukleoplasma des humanen Keratinozyten aufgenom-

men wurden. Im Verhältnis zu zuvor abgebildeten Keratinozyten, die mit Goldnanopartikeln inkubiert wurden (vgl. Kapitel 4.1.3.2), wurden zahlreiche Aggregate in den Keratinozyten aufgenommen. Anhand des Rohtomogramms (im Anhang: prealign1.wmv) kann man zudem vermuten, dass Nanopartikel in den Zellkern aufgenommen wurden. Diese Vermutung wird durch das Tomogramm nicht bestätigt (s. Tomogramm im Anhang: tomo1.wmv). In den Schnittebenen über (s. Abbildung 4.16.2) und unter (s. Abbildung 4.16.4) dem humanen Keratinozyten ist zu erkennen, dass Nanopartikel im Zytoplasma aggregiert und/oder an der Zellkernmembran adhäriert sind.

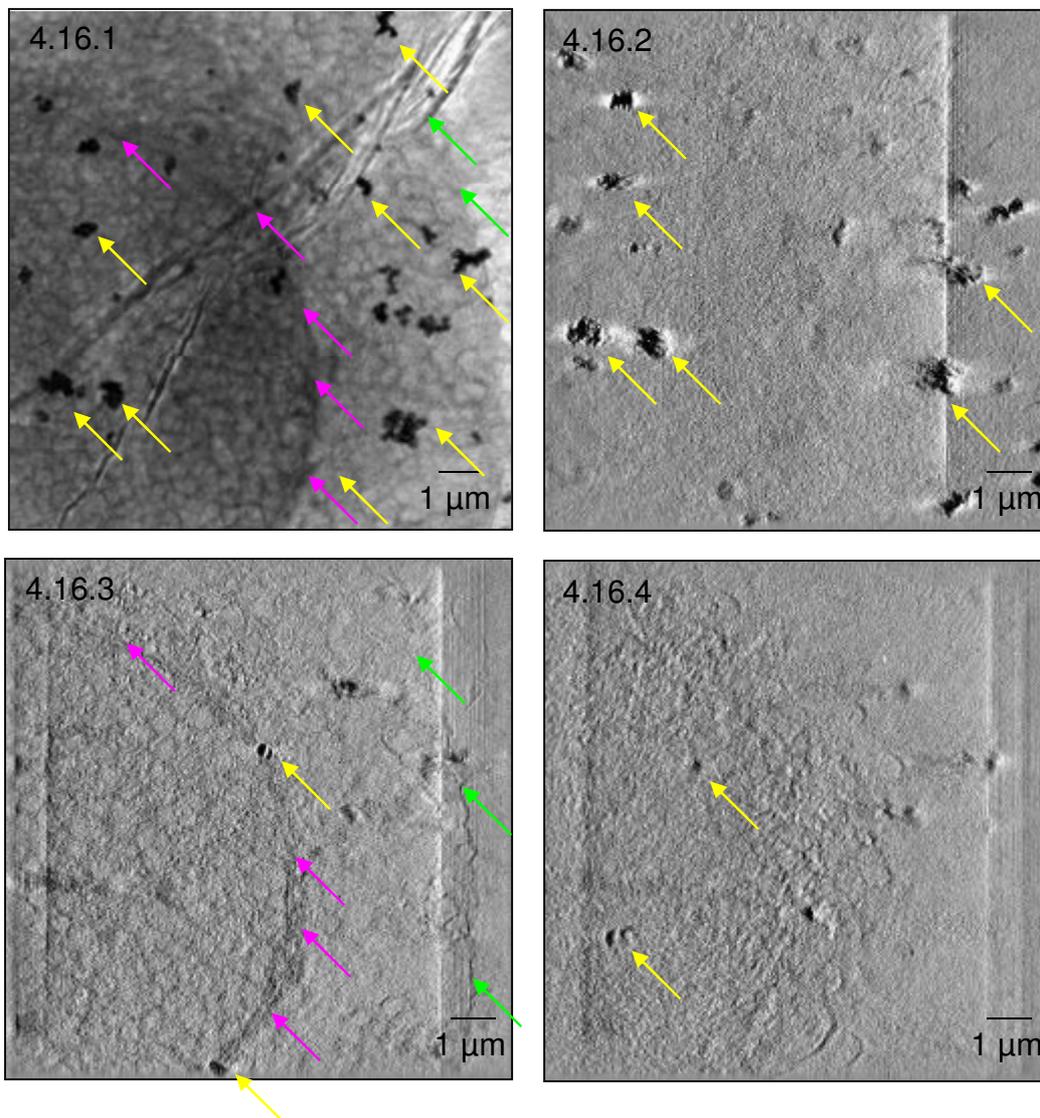


Abbildung 4.16: Cryo-XM/T-Aufnahme (Abbildung 4.16.1) eines Keratinozyten mit Goldnanopartikeln mit einer 4 nm Silicaschale ($d = (68 \pm 8) \text{ nm}$) nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden vor der Aufnahme der Rohtomogramme (-50° bis $+50^\circ$ mit 1° -Schritten). Ausgewählte cryo-XM/T-Aufnahmen aus dem Tomogramm (Abbildung 4.16.2, Abbildung 4.16.3 und Abbildung 4.16.4) zeigen, dass Nanopartikel innerhalb des Keratinozyten lokalisiert sind. Nanopartikel, die sich außerhalb des Zellkerns befinden sind mit gelben Pfeilen markiert. Die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen Pfeilen, die Zellmembran mit grünen Pfeilen gekennzeichnet.

Bei einer ausgewählten Schnittebene, die auf die Zellkernmembran fokussiert ist, kann man erkennen, dass keine Nanopartikel in den Zellkern aufgenommen wurden (s. Abbildung 4.16.3). Im Verhältnis zu zuvor aufgenommenen cryo-XM/T-Aufnahmen ist in Abbildung 4.16 die Zellmembran des Keratinozyten eindeutig erkennbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei zuvor abgebildeten Zellen die Zellmembran nach Inkubation der Citrat-funktionalisierten Goldnanopartikel durch die Nanopartikel geschädigt und porös wurde.

Es wurden zudem Keratinozyten untersucht, die sowohl Aggregate als auch einzelne Silica-ummantelte Goldnanopartikel aufweisen. Es kann aus dem Rohtomogramm (s. Anhang: 20110618-02-a) nicht geschlussfolgert werden, ob die Aggregate und die einzelnen Nanopartikel innerhalb oder außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind. Für diese Keratinozyten wird hier repräsentativ einer dargestellt (s. Abbildung 4.17).

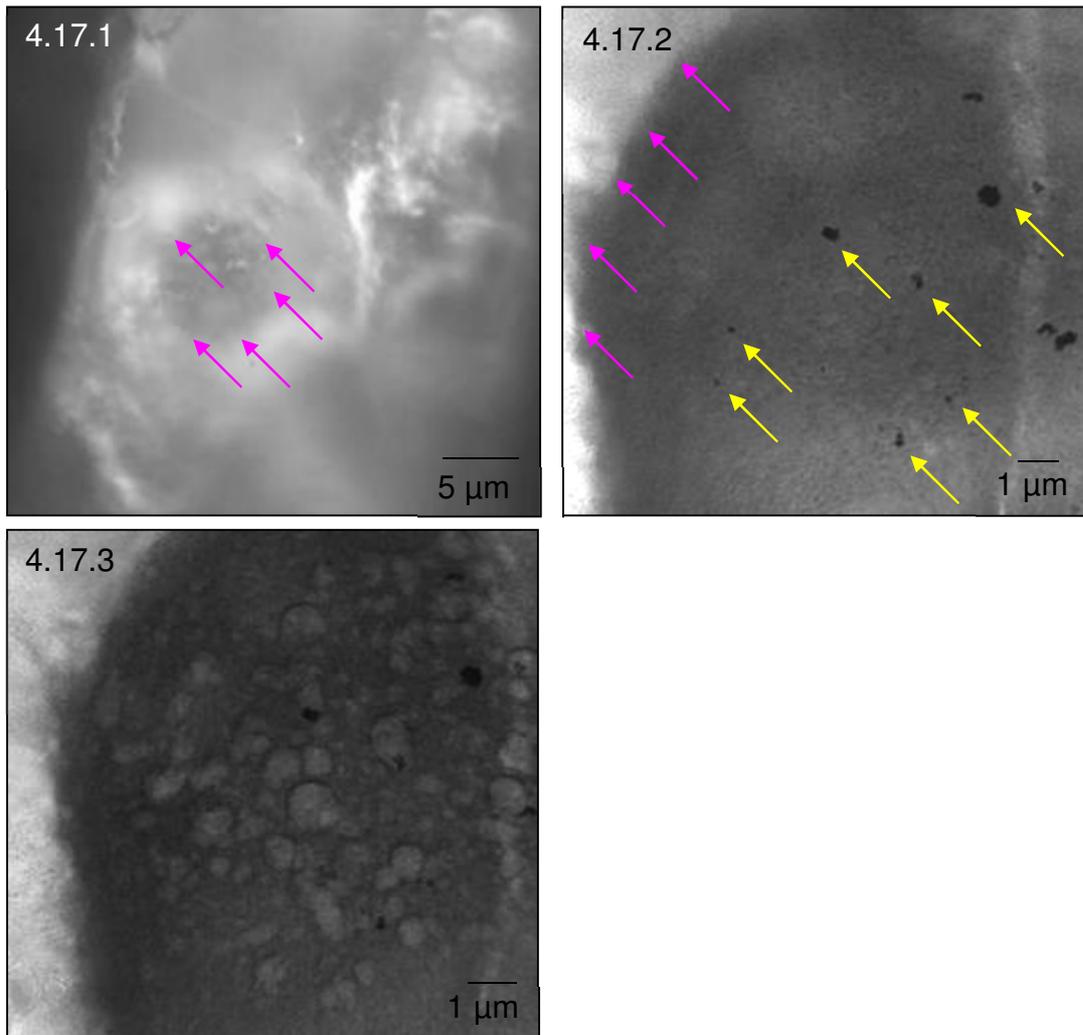


Abbildung 4.17: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (Abbildung 4.17.1) eines Keratinozyten, der mit Goldnanopartikeln mit einer 4 nm dicken Silicaschale ummantelt ist. In der cryo-XM/T-Aufnahme vor/nach der Aufnahme der Rohtomogramme (Abbildung 4.17.2/3) ist zu erkennen, dass einzelne Nanopartikel und Aggregate in den Keratinozyten aufgenommen wurden. Aus dem Tomogramm kann man nicht schließen, ob Nanopartikel in den Zellkern aufgenommen wurden. Die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen, Nanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, wurden mit gelben Pfeilen markiert.

Es wurden in Keratinozyten sowohl Aggregate als auch einzelne Silica-ummantelte Goldnanopartikel gefunden. Dabei ist unklar, ob es während der Inkubation der Nanopartikel mit den humanen Keratinozyten außerhalb der Zelle oder innerhalb der Zelle zur Aggregation kam. In den Aufnahmen und Tomogrammen können keine Silica-ummantelten Goldnanopartikel innerhalb des Zellkerns der humanen Keratinozyten gefunden werden. Mittels cryo-XM/T konnte kein Unterschied zwischen der quantitativen Aufnahme bzw. des Aufnahmeweges von Goldnanopartikeln bzw. Goldnanopartikeln mit einer 4 nm dicken Silicaschale in das Zytoplasma humaner Keratinozyten festgestellt werden.

Es wurde gezeigt, dass Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel innerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, während sich Goldnanopartikel mit Silicaschale vermutlich außerhalb des Zellkerns befinden. Die Nanopartikel sind im Zytoplasma zum Großteil lokal in hohen Konzentrationen zu finden, sodass vermutet wird, dass die Partikel über Endozytose ins Zytoplasma gelangen. Miaczynska et al. zeigten, dass Endosomen als Signalgeber zwischen der Plasmamembran und dem Zellkern fungieren,^[176] sodass ein möglicher Aufnahmeweg in den Zellkern über eine endosomale Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle erfolgen könnte.

4.1.3.4. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung

Zur weiteren Untersuchung von humanen Keratinozyten, die mit Nanopartikeln inkubiert wurden, wird ein Verfahren (TEM) gewählt welches eine deutlich höhere Auflösung aufweist als cryo-XM/T. Das verwendete TEM hat eine Auflösungsgrenze von ca. 1 nm. Daher wurden humane primäre Keratinozyten mit Nanopartikeln inkubiert und anschließend mittels TEM abgebildet. Als Nanopartikelsysteme wurden neben Citrat-funktionalisierten Goldnanopartikeln Silanolat-stabilisierte Silicananopartikel (s. Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.2.4) verwendet. Die Silicananopartikel ersetzen die zuvor verwendeten Goldnanopartikel mit einer 4 nm dicken Silicaschale, da die Auflösung des TEM hoch genug ist und die Probendicke klein genug ist, um Nanopartikel mit geringerer Dichte und Elemente mit geringerer Ordnungszahl zu visualisieren. Zudem lassen sich Silicananopartikel einfacher als Goldnanopartikel mit Silicaschale darstellen.

4.1.3.5. Untersuchung der Aufnahme von Silicananopartikel in humane Keratinozyten

Zunächst wurden humane Keratinozyten mit Silicananopartikeln ($d = (51 \pm 2)$ nm) inkubiert und mittels TEM untersucht. Dabei beträgt die Inkubationszeit 2 h. In Abbildung 4.18 ist ein humaner Keratinozyt mittels TEM abgebildet.

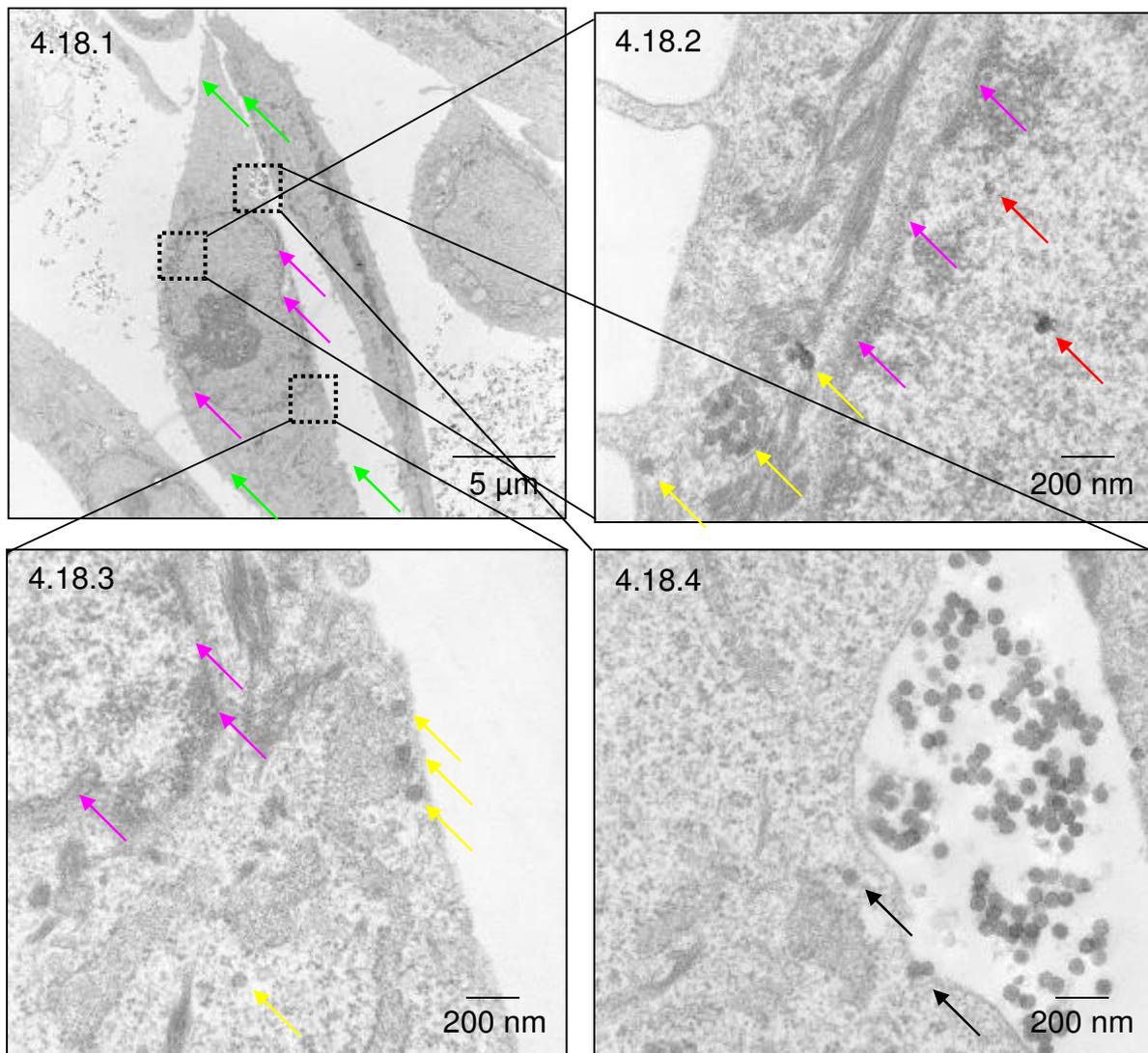


Abbildung 4.18: TEM-Aufnahme eines humanen Keratinozyten, der mit Silicananopartikeln ($d = (51 \pm 2) \text{ nm}$) inkubiert (2 h) wurde (s. Abbildung 4.18.1). Silicananopartikel sind sowohl im Zytosol als auch in Endosomen/Lysosomen lokalisiert (s. Abbildung 4.18.2, Abbildung 4.18.3 und Abbildung 4.18.4). Die Zellmembran ist mit grünen, die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen, Nanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, mit gelben Pfeilen markiert. Mit roten Pfeilen werden Strukturen gekennzeichnet, die sich innerhalb vom Zellkern befinden, jedoch nicht der Größe der Nanopartikel entsprechen (s. Abbildung 4.18.2). Es sind keine Nanopartikel im Zellkern lokalisiert. Die gepunkteten schwarzen Kästchen zeigen hierbei den Bereich, der in der nachfolgenden Teilabbildung mit höherer Vergrößerung dargestellt wird (vgl. Abbildung 4.18.1/2).

Die Zellmembran ist intakt und es sind subzelluläre Strukturen erkennbar. Zudem sind Nanopartikel in Vesikeln als auch unverkapselt im Zytosol lokalisiert. Das bedeutet, dass die Nanopartikel entweder via Endozytose aufgenommen wurden und teilweise an das Zytosol abgegeben wurden oder einige Nanopartikel über einen anderen Aufnahmeweg direkt in das Zytosol der Zelle gelangen. Bei den Vesikeln kann nicht zwischen frühen Endosomen ($\text{pH} = 6$), späten Endosomen ($\text{pH} \sim 5$ bis 6) und Lysosomen ($\text{pH} \sim 4.5$ bis 5) unterschieden werden.^[104] Daher werden im Folgenden die Vesikel als Endosomen/Lysosomen bezeichnet. In Abbildung 4.18.1 und Abbildung 4.18.4 ist zu

erkennen, dass die Nanopartikel sich Nahe der Zelle befinden und diese beginnt sich einzustülpen. Folglich nimmt der humane Keratinozyt die Nanopartikel entweder über eine rezeptorgesteuerte Endozytose oder über die unspezifische Pinozytose auf.^[107]

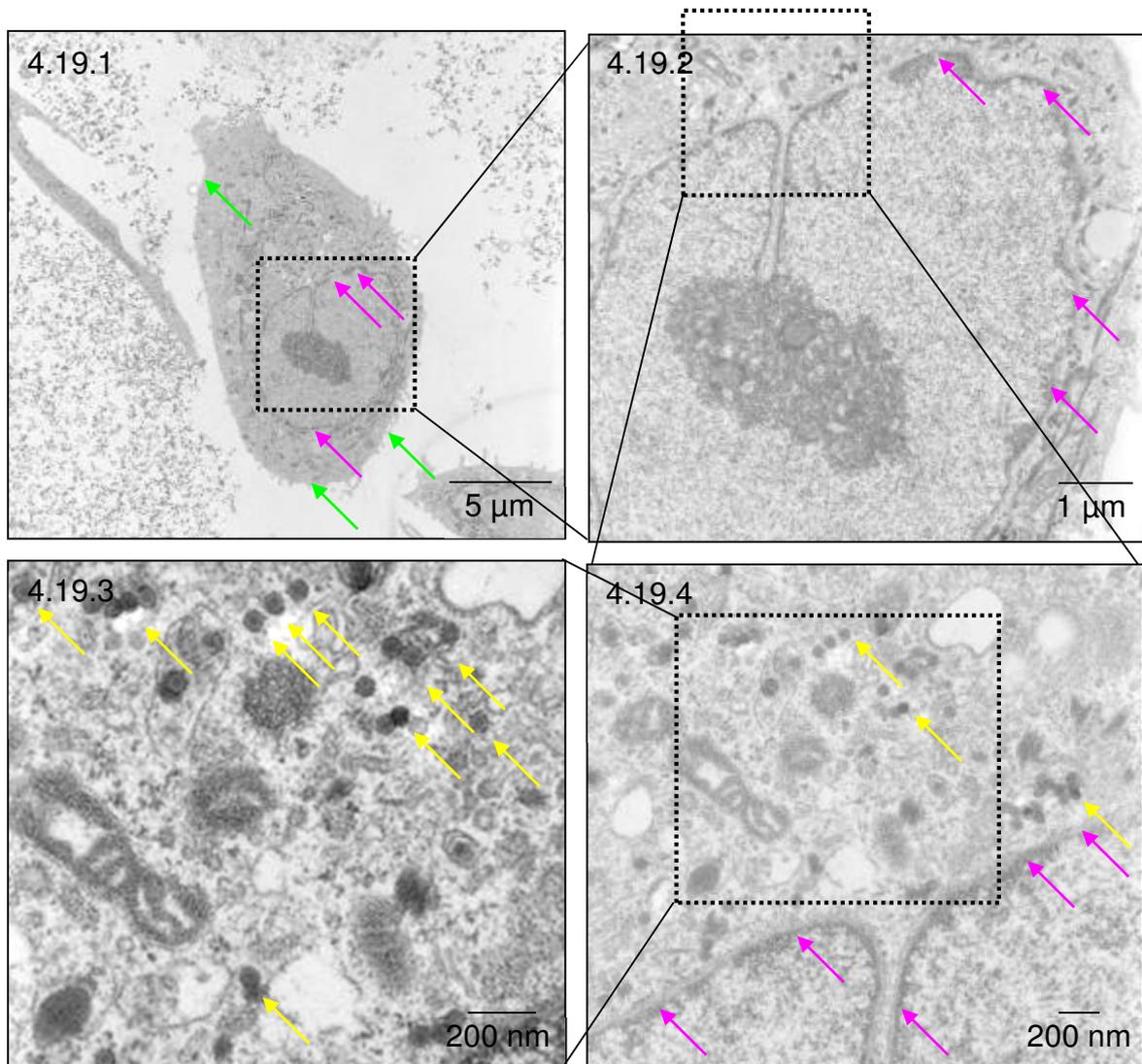


Abbildung 4.19: TEM-Aufnahme eines humanen Keratinozyten, der mit Silicananopartikeln inkubiert (2 h) wurde (s. Abbildung 4.19.1). Es sind keine Nanopartikel im Zellkern lokalisiert (s. Abbildung 4.19.2). Silicananopartikel sind sowohl im Zytosol als auch in Endosomen/Lysosomen lokalisiert (s. Abbildung 4.19.3 und Abbildung 4.19.4). Die Zellmembran ist mit grünen, die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen, Nanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind mit gelben Pfeilen markiert.

Zudem ist erkennbar, dass wenige Nanopartikel nicht-verkapselt von der Zelle aufgenommen werden (s. Abbildung 4.18.4, mit schwarzem Pfeil markiert). In Abbildung 4.18.3 ist erkennbar, dass vier Nanopartikel von der Zelle aufgenommen wurden und diese ebenfalls nicht verkapselt wurden. Über welchen Mechanismus diese Nanopartikel in die Zelle aufgenommen wurden, ist nicht bekannt. Teilweise sind dunkle Strukturen im Zellkern erkennbar (s. Abbildung 4.18.2, gekennzeichnet durch rote Pfeile).

Die Größe, der Strukturen entspricht dabei nicht der Größe und der Größenverteilung der inkubierten Silicananopartikel.

In anderen Zellen, die mit Silicananopartikeln inkubiert wurden, sind Nanopartikel im Zytosol und in Vesikeln (s. Abbildung 4.19.3 und Abbildung 4.19.4) und ebenfalls nicht im Zellkern (s. Abbildung 4.19.2) lokalisiert.

Es befinden sich zahlreiche Silicananopartikel im extrazellulären Raum (s. Abbildung 4.19.1 und Abbildung 4.20.1).

In einigen TEM-Aufnahmen kann die Aufnahme von Silicananopartikeln in einen Keratinozyten dokumentiert werden (s. Abbildung 4.20). Die Nanopartikel sind meist in Vesikeln lokalisiert.

Folglich werden einige wenige Silicananopartikel von den untersuchten humanen Keratinozyten aufgenommen. Teilweise sind dunkle Strukturen im Zellkern erkennbar (s. Abbildung 4.20.4, gekennzeichnet durch rote Pfeile). Die Größe, der Strukturen entspricht dabei nicht der Größe und der Größenverteilung der inkubierten Silicananopartikel. In sämtlichen untersuchten Zellen sind die Zellmembran und die Zellkernmembran intakt. Mittels TEM kann durch die Inkubation von Silicananopartikeln mit humanen Keratinozyten und die Aufnahme der Silicananopartikel in humane Keratinozyten keine Verringerung der Viabilität der Zellen beobachtet werden.

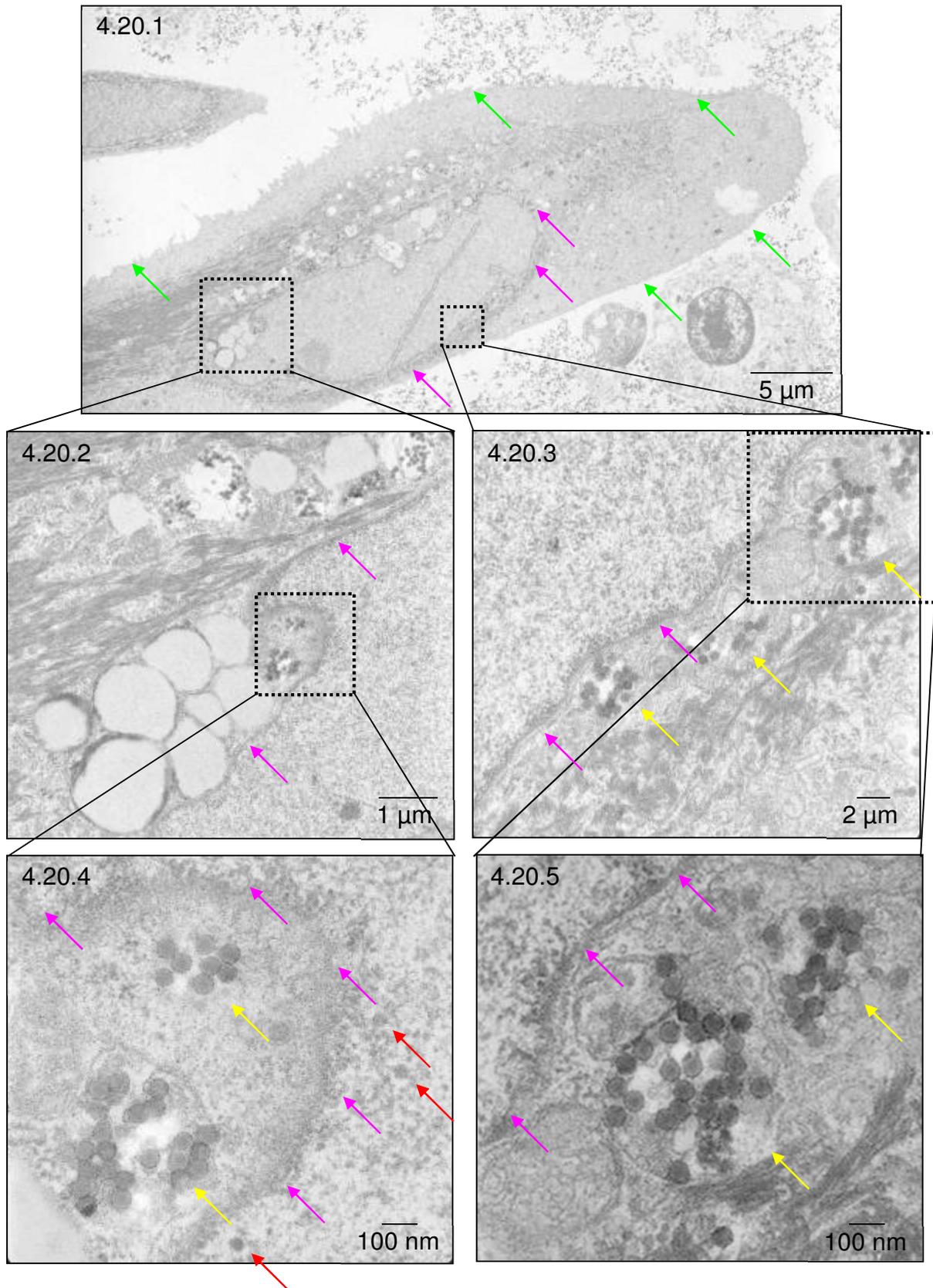


Abbildung 4.20: TEM-Aufnahme eines humanen Keratinozyten, der mit Silicananopartikeln inkubiert wurde (s. Abbildung 4.20.1). Silicananopartikel sind sowohl im Zytoplasma als auch in Endosomen/Lysosomen und nicht im Zellkern lokalisiert (s. Abbildung 4.20.2, Abbildung 4.20.3, Abbildung 4.20.4 und Abbildung 4.20.5). Die Zellmembran ist mit grünen, die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen, Nanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind mit gelben Pfeilen markiert. Strukturen, die innerhalb des Zellkerns lokalisiert sind jedoch nicht der Größe und der Größenverteilung der Nanopartikel entsprechen, sind mit roten Pfeilen markiert.

4.1.3.6. Untersuchung der Aufnahme von Goldnanopartikeln in humane Keratinozyten

Es wurden humane Keratinozyten mit Goldnanopartikeln ((60 ± 5) nm) für 2 h inkubiert und mittels TEM abgebildet. Dabei ist zu erkennen, dass die Zellen, die mit Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln inkubiert wurden zahlreiche Nanopartikel aufgenommen haben (s. Abbildung 4.21).

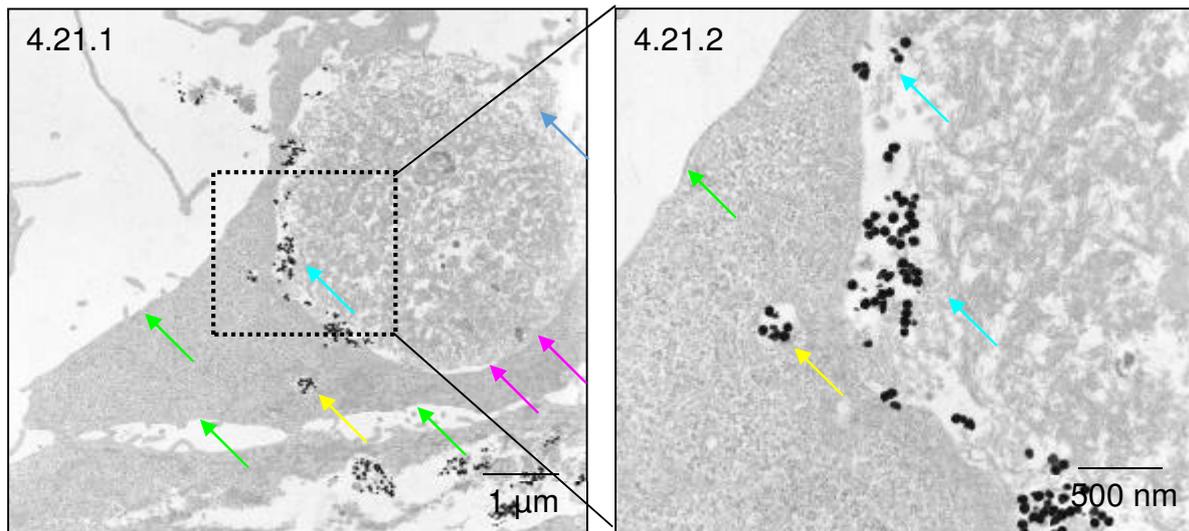


Abbildung 4.21: TEM-Aufnahme eines humanen Keratinozyten, der mit Goldnanopartikeln inkubiert wurde (s. Abbildung 4.21.1 und Abbildung 4.21.2). Es sind viele Nanopartikel im Bereich des Zellkerns lokalisiert. Die Goldnanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, befinden sich in Endosomen/Lysosomen. Die Zellmembran ist mit grünen, die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen, Nanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind mit gelben und Nanopartikel, die innerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, mit türkisfarbenen Pfeilen markiert. Die Öffnung des Zellkerns zum extrazellulären Bereich ist mit einem blauen Pfeil markiert.

Die Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel sind in großer Anzahl im Bereich des Zellkerns lokalisiert. Es ist weder eine intakte Zellmembran noch eine intakte Zellkernmembran erkennbar. Es ist verwunderlich, dass die Öffnung hin zum extrazellulären Bereich oben rechts in Abbildung 4.21.1 lokalisiert ist, jedoch die Goldnanopartikel im Zellkern unten links lokalisiert sind. Zudem befinden sich weitere Nanopartikel in Vesikeln in der Zelle und im extrazellulären Raum.

In einem anderen humanen Keratinozyten ergibt sich ein anderes Bild. Die Goldnanopartikel sind zwar ebenfalls in einer Vielzahl im Bereich des Zellkerns lokalisiert. Jedoch scheint die Zellmembran intakt zu sein. Die Zellkernmembran ist hingegen nicht zu erkennen (s. Abbildung 4.22). Es befinden sich nur wenige Nanopartikel im extrazellulären Raum.

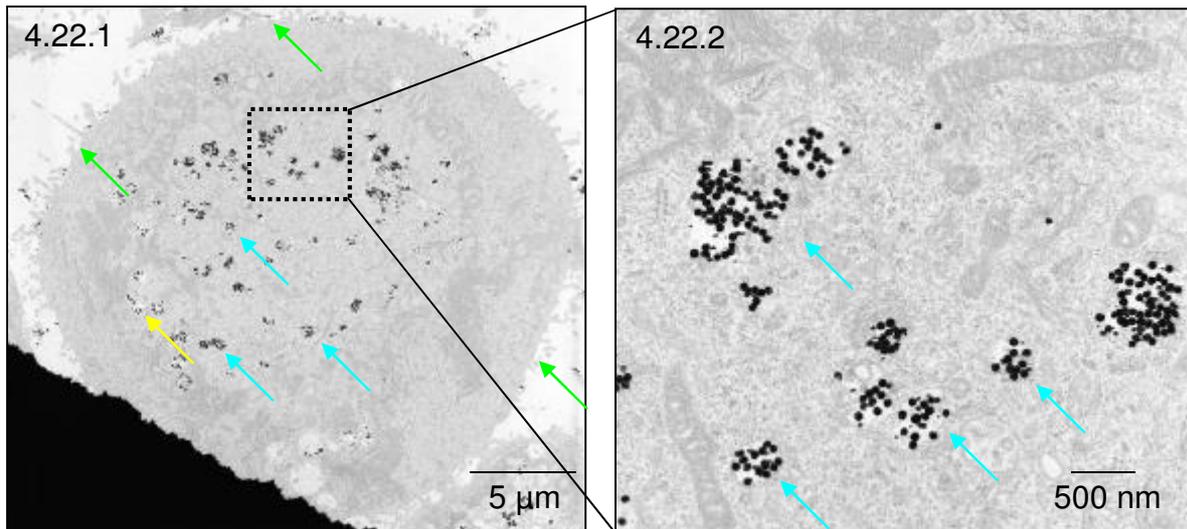


Abbildung 4.22: TEM-Aufnahme eines humanen Keratinozyten, der mit Goldnanopartikeln inkubiert wurde (s. Abbildung 4.22.1 und Abbildung 4.22.2). Es sind viele Nanopartikel im Bereich des Zellkerns lokalisiert. Die Goldnanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, befinden sich in Endosomen/Lysosomen. Die Zellmembran ist mit grünen, Nanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind mit gelben und Nanopartikel, die innerhalb des Zellkerns lokalisiert sind mit türkisarbenen Pfeilen markiert. Die Zellkernmembran hat sich zum Teil aufgelöst.

In einem weiteren Keratinozyten ist erkennbar, dass keine Goldnanopartikel in den Zellkern aufgenommen wurden. Der Zellkern wird jedoch deutlich durch die Goldnanopartikel deformiert (s. Abbildung 4.23). Die Nanopartikel sind zum Teil an die Zellkernmembran adhäriert (s. Abbildung 4.23.4, mit schwarzem Pfeil markiert).

Chithrani et al. vermuten, dass sich nach Inkubation von Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln mit DMEM/FCS primäre Amine an die Nanopartikeloberfläche binden, so dass die Nanopartikel ein positives Zeta-Potential besitzen.^[81] In der Literatur wird dokumentiert, dass Goldnanopartikel mit einer positiven Oberflächenladung in höherer Konzentration von Zellen aufgenommen werden,^[177] da positiv geladene Nanopartikel stärker mit der negativ geladenen Zellmembran wechselwirken. Somit ist erklärbar, dass in unserer Studie die Goldnanopartikel in solch hoher Quantität um den Zellkern lokalisiert sind und diesen deformieren.

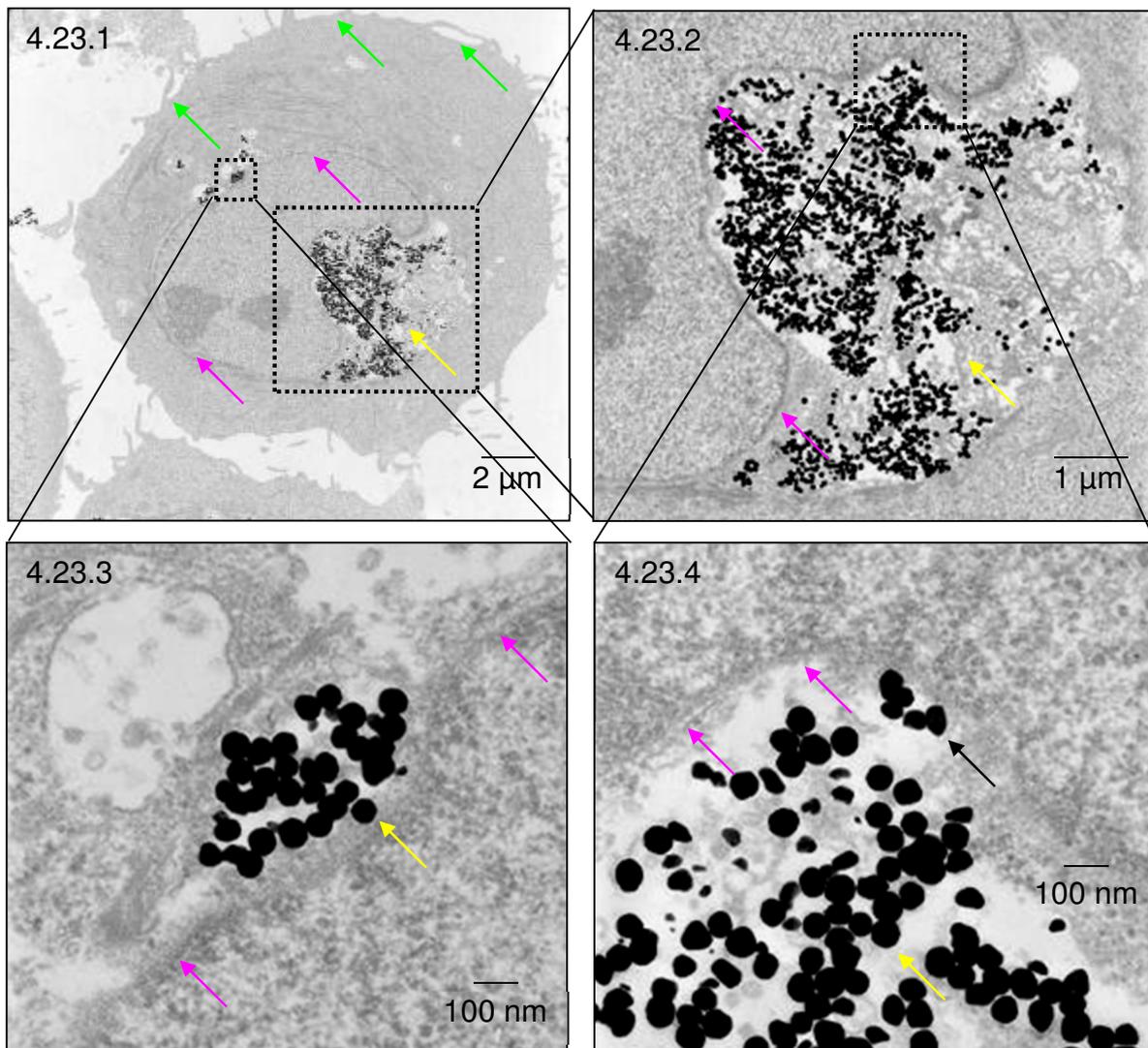


Abbildung 4.23: TEM-Aufnahme eines humanen Keratinozyten, der mit Goldnanopartikeln inkubiert wurde (s. Abbildung 4.23.1). Es sind viele Nanopartikel an der Zellkernmembran adhärirt (s. Abbildung 4.23.2, Abbildung 4.23.3 und Abbildung 4.23.4). Die Goldnanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, befinden sich in Endosomen/Lysosomen. Die Zellmembran ist mit grünen, die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen, Nanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, mit gelben Pfeilen markiert. Es sind keine Nanopartikel im Zellkern lokalisiert. Der Zellkern ist jedoch durch die Goldnanopartikel deformiert.

In Abbildung 4.24 ist zu erkennen, dass Goldnanopartikel von der Zellkernmembran umschlossen sind. Zudem befinden sich die Partikel in einigen Vesikeln innerhalb der Zelle. Dabei scheint die Zellmembran intakt zu sein. An der Zellmembran sind keine Nanopartikel adhärirt.

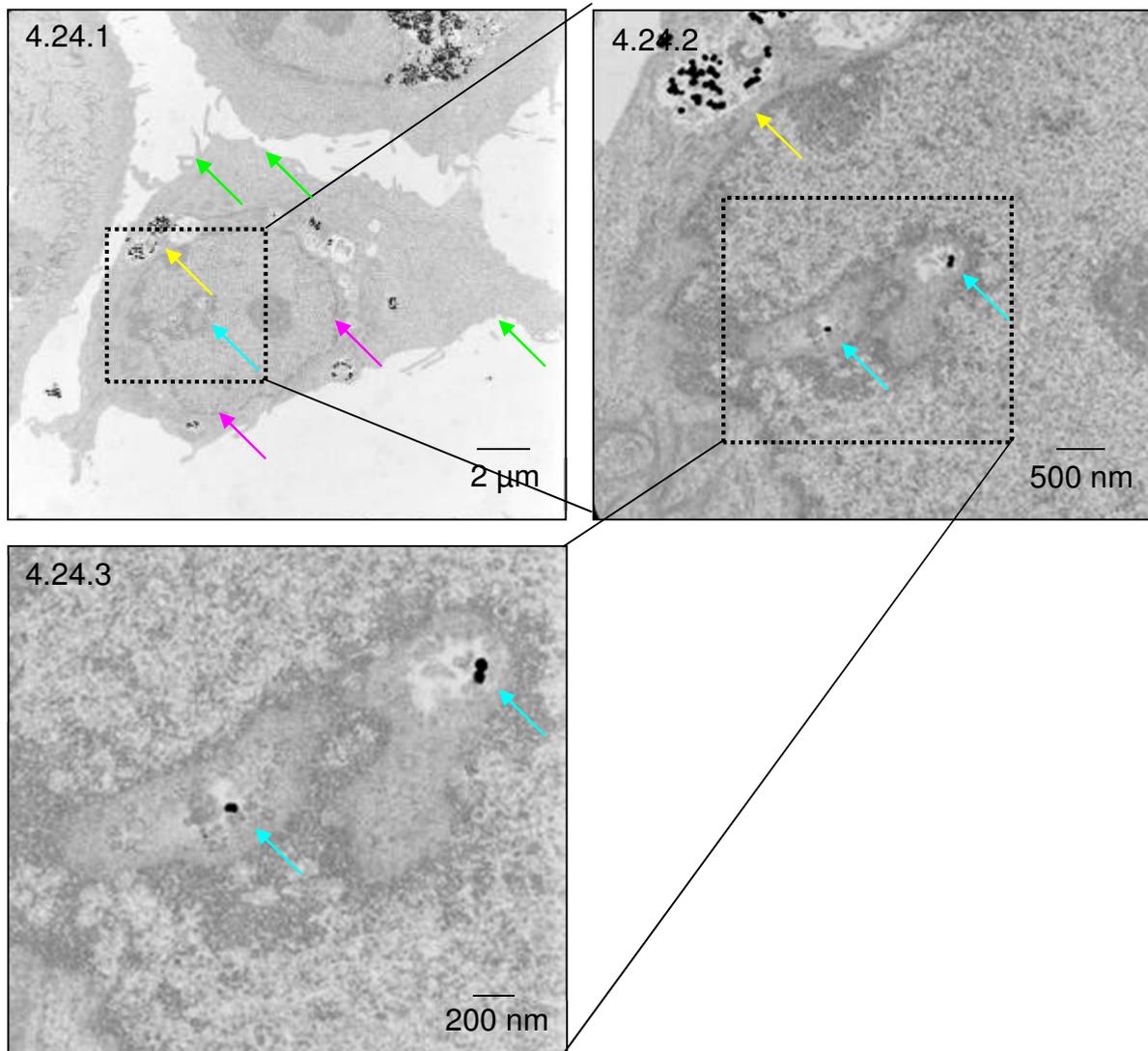


Abbildung 4.24: TEM-Aufnahme eines humanen Keratinozyten, der mit Goldnanopartikeln inkubiert wurde (s. Abbildung 4.24.1). Es sind viele Nanopartikel um die Zellkernmembran lokalisiert (s. Abbildung 4.24.2). Drei Nanopartikel befinden sich in Vesikeln, die vom Zellkern umgeben sind (s. Abbildung 4.24.3). Die Goldnanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, befinden sich in Endosomen/Lysosomen. Die Zellmembran ist mit grünen, die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen, Nanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind mit gelben und die Nanopartikel, die sich in einem Vesikel innerhalb des Zellkerns befinden, mit türkisfarbenen Pfeilen markiert.

In Abbildung 4.25 ist erkennbar, dass ein humaner Keratinozyt deutlich mit Goldnanopartikeln beladen ist. Dabei sind viele Nanopartikel auch im Zellkern lokalisiert.

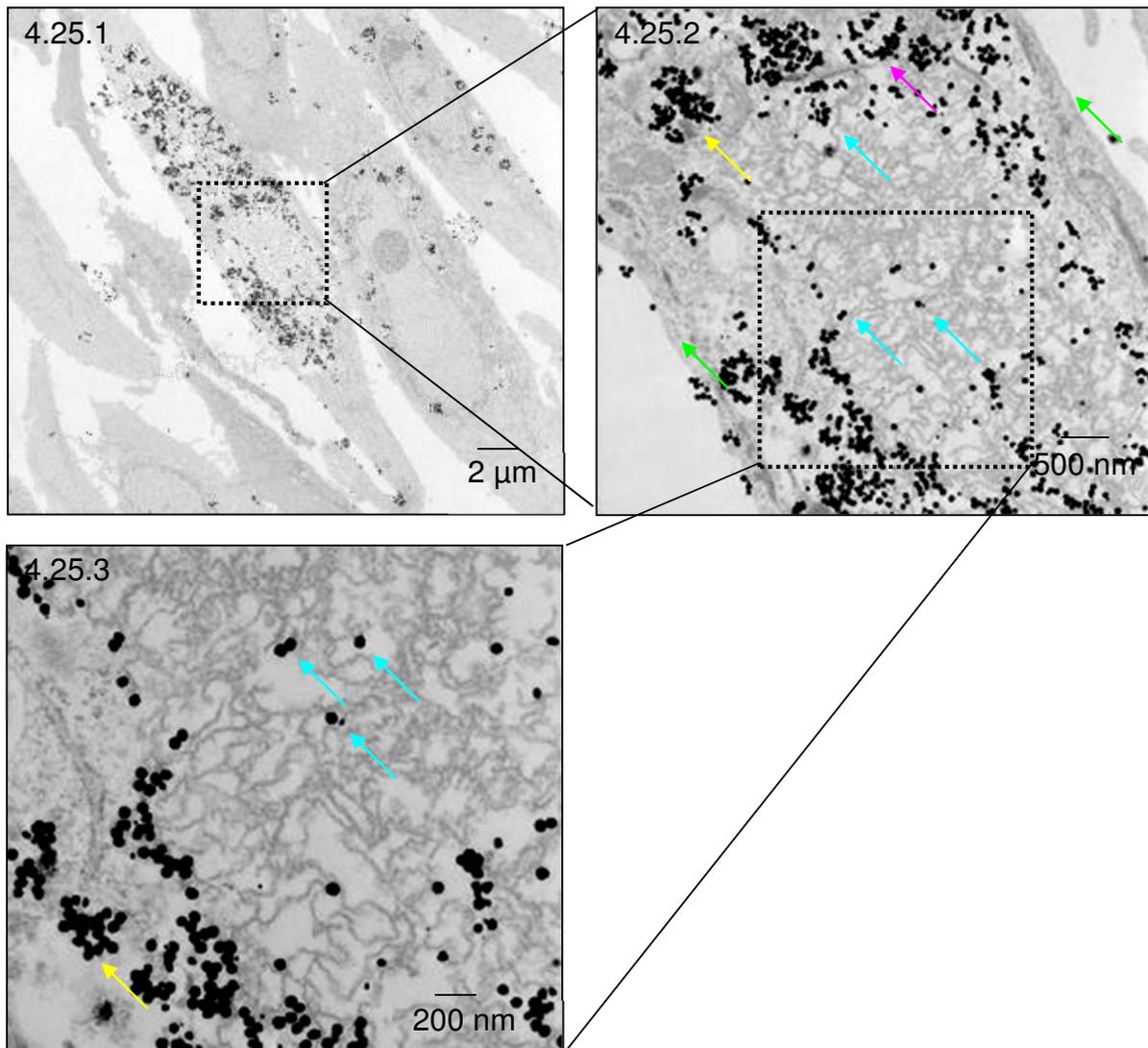


Abbildung 4.25 TEM-Aufnahme eines humanen Keratinozyten, der mit Goldnanopartikeln inkubiert wurde (s. Abbildung 4.25.1). Es sind viele Nanopartikel im Bereich des Zellkerns lokalisiert (s. Abbildung 4.25.2 und Abbildung 4.25.3). Die Zellmembran ist mit grünen, die Zellkernmembran ist mit magentafarbenen, Nanopartikel, die außerhalb des Zellkerns lokalisiert sind mit gelben und Nanopartikel, die innerhalb des Zellkerns lokalisiert sind, mit türkisfarbenen Pfeilen markiert.

Die Literatur zur akuten Zytotoxizität von Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln gegenüber Zellen ist divers. Forscher nutzen in Ihren unterschiedlichen Laboren verschiedene Zellsysteme, sodass ein Vergleich der Ergebnisse erschwert wird. Zudem werden meist die untersuchten Nanopartikel nicht hinsichtlich der Stabilität im Zellkulturmedium untersucht, sodass fraglich ist, ob die Nanopartikel nicht aggregiert vorliegen. Connor et al. zeigten, dass Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel mit einem TEM-Durchmesser von 18 nm und Konzentrationen von 0 bis $3 \cdot 10^{-1}$ mmol/L gegenüber humanen Zellen (K562 Zellen) keine akute Zytotoxizität aufweisen.^[178]

Chen et al. inkubierten Citrat-funktionalisierte Goldnanopartikel mit TEM-Durchmessern von 3 bis 100 nm und Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-1} mmol/L mit HeLa-Zellen

(humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms). Dabei konnte keine akute Zytotoxizität festgestellt werden.^[179] Qu et al. zeigten, dass Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 20 nm und einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-1}$ mmol/L keine akute Zytotoxizität bei humanen Dermal-Fibroblasten aufweisen.^[180] Vijayakumar et al. zeigten, dass mit steigender Konzentration von Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von ca. 20 nm die Zytotoxizität zunimmt. Bei einer maximalen Konzentration von $7 \cdot 10^{-1}$ mmol/L beträgt die Zellviabilität (MTT-Assay) nur ca. 70%.^[181] Uboldi et al. untersuchten Goldnanopartikel mit Citrat-Funktionalisierung mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 20 bis 30 nm und zeigten eine Abnahme der Zellproliferation von humanen Lungenadenokarzinom-Epithelzellen bei einer Goldkonzentration von $7 \cdot 10^{-1}$ mmol/L nach 72 h auf ca. 80%.^{[79],[80]} Die Autoren verwendeten in einem zweiten Zellversuch Goldnanopartikel mit einer deutlich geringeren Citratbeladung. Die Toxizität gegenüber Zellen verringerte sich drastisch. Es kann geschlossen werden, dass die Belegungsdichte von Citrat auf Nanopartikeln eine entscheidende Rolle bei der Toxizität spielt. Lu et al. inkubierten Citrat (5 mM) ohne Nanopartikel mit humanen Magenkrebszellen. Die Viabilität der Zellen sank nach 72 h auf fast 0%.^[182]

In unserer Studie haben wir eine Gold-, Goldsilicakonzentration von $9 \cdot 10^{-1}$ mmol/L bzw. eine Silicakonzentration von 3 mmol/L (jeweils 182 mg/L) verwendet. Hierbei besitzen die Goldnanopartikel 96% der Masse der Goldnanopartikel mit Silicaschale. Daher wird die Differenz in der Konzentration ($9 \cdot 10^{-1}$ mmol/L) vernachlässigt. Es wurden etwa zehnmal mehr Silicananopartikel als Goldnanopartikel im TEM-Experiment eingesetzt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Citrat-funktionalisierten Goldnanopartikel im Verhältnis zu den Silicananopartikeln in höherer Konzentration aufgenommen werden, obwohl die Goldnanopartikel in deutlich geringerer Quantität inkubiert wurden. Die hohe Goldkonzentration, gepaart mit einer gewissen unbestimmten Citratkonzentration auf den Goldnanopartikeln, führt zur akuten Zytotoxizität, da akute Zytotoxizität eine Funktion der Konzentration von Goldnanopartikeln und von Citrat ist. Dabei zeigen die vorher genannten Studien, dass Goldnanopartikel ab einer Konzentration von ca. 0.5 mmol/L toxisch sind.

Es ist auffällig, dass eine große Anzahl an Goldnanopartikeln im Verhältnis zu Silicananopartikeln von den humanen Keratinozyten aufgenommen wird und sich perinuclear lokalisiert (s. Abbildung 4.23).

Chithrani et al. zeigten, dass die Aufnahme von Goldnanopartikeln in Zellen eine Funktion der Größe der Nanopartikel ist. Dabei werden Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm ungefähr doppelt so stark aufgenommen wie Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10 nm und etwa dreimal so stark aufgenommen wie Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm.^[81] Aufgrund des Umwicklungseffekts (engl.: *wrapping effect*) kann erklärt werden, dass Nanopartikel mit einem Durchmesser von 50 nm in höherer Quantität aufgenommen werden, da dies energetisch begünstigt ist.^[183] Für die Umhüllung eines Nanopartikels mit einer Biomembran sind 2 Faktoren wichtig: Erstens die Freie Energie, die ein Ergebnis der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung ist, und zweitens die Rezeptordiffusionskinetik. Mit mathematischen Anpassungen wurde herausgefunden, dass Nanopartikel mit einem Durchmesser von 27 bis 30 nm die schnellste Umwicklungszeit (engl.: *wrapping time*) und der schnellsten rezeptor-vermittelten Endozytose unterliegen.^[184]

Zudem führt die Citratfunktionalisierung im Verhältnis zu anderen Funktionalisierungen zu einer erhöhten Aufnahme der Nanopartikel.^[81]

Es stellt sich die Frage wieso Goldnanopartikel in solch hoher Konzentration im Verhältnis zu Silicananopartikeln von Zellen aufgenommen werden. Da das Oberflächenpotential bei beiden Nanopartikelsystemen (Silicananopartikel: -51.8 ± 2.8 mV), Goldnanopartikel: -49.0 ± 1.9 mV) im Rahmen der Fehlergrenzen identisch ist, kann der Grund für die unterschiedlichen aufgenommenen Konzentrationen und die beträchtlichen morphologischen Unterschiede der Zellen nicht im Zeta-Potential der verschiedenen Nanopartikel liegen. Daher wird vermutet, dass die Oberflächenmoleküle (Citrat und Silanolat) verschieden mit essentiellen Molekülen im extra- und im intrazellulären Raum reagieren. Treuel et al. zeigten, dass Cystein bzw. Proteine, die Cystein enthalten, an die Goldoberfläche von Goldnanopartikeln über die Thiolgruppe binden. Hierbei sprechen die Autoren von der Bildung einer „harten Proteincorona“, da die Bindung kovalent ist.^[185] Zudem könnte die Bindung von Cystein bzw. Proteinen, die Cystein enthalten zu einem positivem Zeta-Potential der Nanopartikel führen. Darüber hinaus wird Cystein die indirekte Rolle zu Teil, Zellen vor oxidativem Stress zu schützen. Wong et al. veranschaulichten, dass Zellmedien, die mit L-Cystein versetzt sind, zu einer deutlich höheren Viabilität von Parasiten (*Entamoeba histolytica*) führen als Medien, die kein Cystein enthalten.^[186] Parasiten sind vom zellulären Aufbau ähnlich zu Zellen des menschlichen Organismus. Somit kann vermutet werden, dass die Bindung von Cystein bzw. Cystein-Proteinen an Goldnanopartikel, die Konzentration von freiem

Cystein bzw. Cystein-Proteinen so stark verringert, dass dies zur akuten Toxizität gegenüber humanen Keratinozyten führt. Darüber hinaus wird durch die Bindung des Cysteins bzw. der Cystein-Proteine gegebenenfalls eine nicht unbeträchtliche Menge an Citrat freigesetzt. Wie schon vorher gezeigt wurde, inkubierten Lu et al. Citrat (5 mmol/L) mit humanen Magenkrebszellen. Die Viabilität der Zellen sank nach 72 h auf fast 0%.^[182] Dem entgegen steht eine Studie von Majzik et al. Die Autoren beschreiben einen Mechanismus, bei dem Citrat von der Goldoberfläche durch Cystein ersetzt wird und sich eine organische Doppelschicht mit terminalem Citrat bildet.^[187]

Es ist erkennbar, dass die in dieser Studie inkubierten Citrat-funktionalisierten Goldnanopartikel zu morphologischen Veränderungen (Porosität der Zellmembran und Auflösung der Zellkernmembran) der Zellen führen. Somit wird vermutet, dass in unserer Studie die Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel von den Zellkernen der humanen Keratinozyten aufgenommen werden und dies zur Erniedrigung der Viabilität der humanen Keratinozyten führt.

Nanopartikel mit einer Silanolatoberfläche (Silicananopartikel und Goldnanopartikel mit Silicaschale) verändern hingegen nicht die Morphologie der Zellen und führen nicht zu einer Porosität der Zellmembran. Zudem werden die Silicananopartikel nicht so stark aufgenommen und scheinen die Viabilität zudem nicht zu beeinträchtigen. Obwohl in unserer TEM-Studie zehnmal mehr Silicananopartikel als Goldnanopartikel mit den Zellen inkubiert wurden, nahmen die Zellen Goldnanopartikel in höherer Quantität auf als Silicananopartikel.

Lu et al. zeigten, dass Leberkarzinomzellen (HepG2 Zellen), die mit Silicananopartikeln mit einem TEM-Durchmesser von etwa 50 nm inkubiert wurden, bis zu einer Konzentration von 640 mg/L eine Viabilität > 90% aufweisen.^[188]

Jin et al. zeigten hingegen, dass die Zellviabilität von Lungenkrebszellen (A549), die mit vergleichbaren Nanopartikeln inkubiert wurden, ab einer Konzentration von 100 mg/L < 90% bzw. etwa 60% (Inkubationszeit 48 h bzw. 72 h) beträgt.^[189] Liang et al. inkubierten ähnliche Nanopartikel mit humanen Keratinozyten (HaCaT) und zeigten, dass die Viabilität der Zellen bei einer Konzentration von 100 mg/L auf etwa 50% fällt und bei einer Konzentration von 200 mg/L auf ca. 40% fällt.^[190]

Eine Charakterisierung der Nanopartikel hinsichtlich der Stabilität in physiologischen Medien wurde in den drei Studien nicht dokumentiert.

In unserer Studie können wir mit zwei verschiedenen, unabhängigen Analyseverfahren (cryo-XM/T und TEM) nachweisen, dass Goldnanopartikel mit Citrat-Funktionalisierung in höherer Quantität als Silicananopartikel bzw. Goldnanopartikel mit Silicaschale mit Silanolat-Funktionalisierung von humanen Keratinozyten aufgenommen werden. Darüber hinaus werden Goldnanopartikel mit Citrat-Funktionalisierung vom Zellkern der humanen Keratinozyten aufgenommen. Dies führt zu einer verminderten Viabilität. Mit cryo-XM/T kann zum Teil visualisiert werden, wie stark die einzelnen Zellen geschädigt wurden. Anhand der Tomogramme wird deutlich, dass Citrat-funktionalisierte Goldnanopartikel im Verhältnis zu Nanopartikeln mit Silanolatoberfläche (Goldnanopartikel mit Silicaschale) im Zellkern der humanen Keratinozyten lokalisiert sind. Die stärkere Schädigung der Zellen durch Citrat-funktionalisierte Goldnanopartikel kann anhand von TEM-Aufnahmen bestätigt werden.

4.2. Untersuchung der Wechselwirkung von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie mit humanen Zellen

Silbernanopartikel werden aufgrund der antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften in zahlreichen Konsumprodukten eingesetzt. Dazu zählen Reinigungssprays,^[4] Nuckel und Babyflaschen,^[6] Beißringe als Zahnwachstumshilfe für Babys,^[7] Zahnpasta,^[9] Textilien und Deodorants,^[10] Kühlschränke^[11] und Waschmaschinen.^[12] Der Marktanteil an kommerziell erhältlichen Produkten, die Silbernanopartikel enthalten (N = 437), gemessen an allen Produkten, die Nanopartikel enthalten (N = 1801) liegt bei etwa 24% (stand Oktober 2014).^[4] Damit repräsentieren Produkte, die Silbernanopartikel enthalten, unter sämtlichen „Nanoprodukten“ den größten Anteil. Aufgrund der bekannten antiseptischen Wirkungsweise von Silber werden Silbernanopartikel bei der Behandlung von Verbrennungen,^[191] bei der Oberflächenbeschichtung von Kathetern^[192] und in Implantaten^[193] eingesetzt. Durch den vielfältigen Einsatz von Silbernanopartikeln in zahlreichen Produkten kann ein intensiver Kontakt mit Menschen nicht verhindert werden. Es wurde herausgefunden, dass die Zytotoxizität von Silbernanopartikeln gegenüber Zellen eine Funktion der Freisetzung von Silberionen ist.^[43] Die Freisetzung zytotoxischer Silberionen ist wiederum eine Funktion des pH-Wertes und der Sauerstoffkonzentration in der Dispersion.^[44] Hierbei ist noch nicht geklärt, ob und wie sich anisotrope Silbernanopartikel auflösen und wie diese Nanosysteme auf Organismen wirken.

Im Folgenden werden daher anisotrope, trigonal-prismatische Silbernanopartikel synthetisiert und die Auflösung der Nanopartikel mit der Auflösung isotroper, sphärischer Analoga in verschiedenen Medien verglichen. Darüber hinaus wird die quantitative Aufnahme der Silbernanopartikel mit unterschiedlicher Morphologie in zwei verschiedenen Zellsystemen untersucht.

Dabei werden Zellsysteme untersucht, die erstens als Modell für die Epidermis (Oberhaut) fungieren, nämlich humane Keratinozyten. Diese Zellen repräsentieren immortalisierte Zellen, die eine hohe Kapazität zur Differenzierung und Proliferation haben. Da bei den ursprünglichen Kulturbedingungen eine geringe Differenzierungsrate der humanen Keratinozyten bei kleinen Calciumkonzentrationen (ca. 0.1 mM) und bei hohen Temperaturen (ca. 38.5 °C) erzielt wurde, bezeichnet man diese Zellen als HaCaT-Zellen. Dies steht für „*Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes*“.^[73] Zweitens werden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) verwendet, die nicht

transformierte, nicht immortalisierte Gewebezellen repräsentieren. hMSC können in verschiedenen Geweben wie Knochenmarkgewebe, Fettgewebe sowie Muskelgewebe gefunden werden. hMSC sind zudem in den Prozess der Geweberegeneration involviert, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass diese Zellen mit zytotoxischen Silbernanopartikeln nach Exposition interagieren hoch ist.^{[78].[153]}

4.2.1. Synthese und Charakterisierung von trigonalen Silbernanoprismen

Zur reduktiven thermischen Synthese von trigonalen Silbernanoprismen werden zu einer Silbernitratlösung (0.1 mM, 25 mL) unter Rühren nacheinander Lösungen von Trinatriumcitrat (30 mM, 1.5 mL), Polyvinylpyrrolidon (M = 29 kg/mol, 0.7 mM, 1.5 mL), Wasserstoffperoxid (30%, 60 μ L) und Natriumborhydrid (0.1 M, 226 μ L) gegeben.^[50] Nach Zugabe der Natriumborhydridlösung verfärbt sich das Reaktionsgemisch für 2 bis 5 s gelb. Anschließend entfärbt sich das Reaktionsgemisch. Durch die Gelbfärbung (s. Abbildung 4.26.2) kann geschlussfolgert werden, dass sich aufgrund der hohen lokalen Konzentration des Reduktionsmittels im Reaktionsgemisch Nukleate bilden,^[194] die jedoch thermodynamisch instabil sind und somit direkt wieder in die Edukte zerfallen.



Abbildung 4.26: Farbumschläge während der Synthese von trigonalen Silbernanoprismen vor der Zugabe von NaBH_4 (s. Abbildung 4.26.1), nach der Zugabe von NaBH_4 (s. Abbildung 4.26.2) und am Ende der Reaktion (s. Abbildung 4.26.3).

Anschließend werden die trigonalen Silbernanoprismen mittels TEM, DLS und elektrophoretischer Lichtstreuung (ELS, Bestimmung des Zeta-Potentials) charakterisiert (s. Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Charakterisierungsdaten zu trigonalen Silbernanoprismen.

Kantenlänge [nm]	Prismendicke [nm]	d_{hydr} [nm]	PDI	Zeta-Potential [mV]	Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis [nm ⁻¹]
(42±15)	(8±1)	(27±1)	(0.39±0.04)	-(29±1)	(0.41±0.10)

Aufgrund der Oberflächenfunktionalisierung mit Citrat und PVP besitzen die untersuchten trigonalen Silbernanoprismen ein negatives Zeta-Potential $-(29\pm 1)$ mV. Messungen zur dynamischen Lichtstreuung wurden durchgeführt, um den kugeläquivalenten hydrodynamischen Durchmesser und die kolloidale Stabilität der trigonalen Silbernanoprismen darzustellen. DLS kann bei anisotropen Nanopartikeln nur in Kombination mit anderen analytischen Verfahren verwendet werden, um strukturelle Informationen zu gewinnen. Durch Kombination mit TEM bietet die DLS statistisch repräsentative Daten bezüglich des effektiven hydrodynamischen Durchmessers der anisotropen Nanopartikel.^[195] Der effektive kugeläquivalente TEM-Durchmesser der trigonalen Silbernanoprismen beträgt (22 ± 6) nm. Die Differenz aus dem TEM- und dem DLS-Durchmesser $((27\pm 1)$ nm) resultiert aus dem verkleinerten Diffusionskoeffizienten^[196] eines anisotropen trigonalen Silbernanoprisma, der räumlichen Ausdehnung des Liganden und adsorbierter Lösemittelmoleküle auf der Nanopartikeloberfläche^[119] und durch den verkleinerten Diffusionskoeffizienten^[196] eines anisotropen trigonalen Silbernanoprisma. Es wird daher geschlossen, dass die Kolloide nicht aggregiert vorliegen. Aufgrund der anisotropen Form der Nanopartikel und der signifikanten Varianz der Kantenlänge entspricht der PDI (0.39 ± 0.04) einer polydispersen Probe (s. Kapitel 2.5.2). Anhand der TEM-Aufnahme ist zu erkennen, dass die trigonalen Silbernanoprismen mit einheitlicher Morphologie, nicht aggregiert, jedoch mit polydisperser Größenverteilung vorliegen (s. Abbildung 4.27.1). Als Vergleichssystem zu trigonalen Silbernanoprismen dienen sphärische Silbernanopartikel, die in der AG Epple (Universität Duisburg-Essen) synthetisiert und charakterisiert wurden (s. Abbildung 4.27.2).

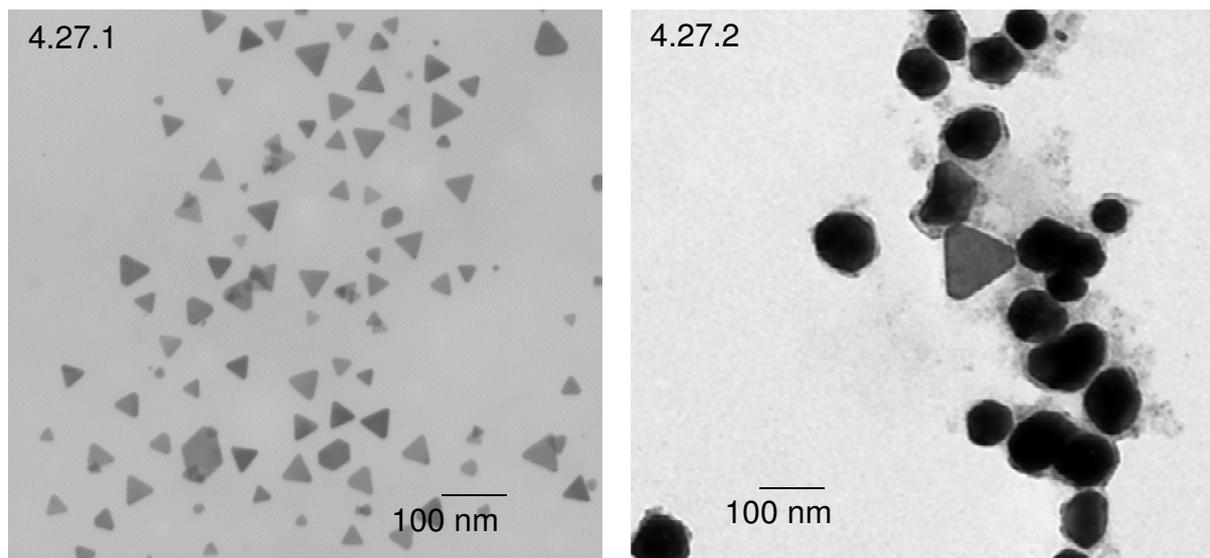


Abbildung 4.27: TEM-Aufnahmen von trigonalen Silbernanoprismen (s. Abbildung 4.27.1) und größtenteils sphärischen Silbernanopartikeln (s. Abbildung 4.27.2)

Die sphärischen Nanopartikel werden ebenfalls mittels TEM, DLS und ELS untersucht (s. Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Charakterisierungsdaten zu sphärischen Silbernanopartikeln.^[197]

TEM-Durchmesser [nm]	DLS-Durchmesser [nm]	Zeta-Potential [mV]	Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis [nm ⁻¹]
70±25	75±20	~-30	0.09±0.02

Die sphärischen Silbernanopartikel liegen folglich nicht aggregiert vor. Das Oberfläche/Volumen-Verhältnis ist bei den trigonalen Silbernanoprismen gegenüber den sphärischen Analoga um den Faktor 4.6 ± 1.5 erhöht.

Das Zeta-Potential beider Partikelsorten ist identisch und der hydrodynamische Durchmesser der Sphären gegenüber den Prismen um einen Faktor von 2.8 ± 0.8 erhöht.

4.2.2. Auflösung von trigonalen Silbernanoprismen und Silbernanosphären

Da vermutet wird, dass die zytotoxischen Eigenschaften von Silbernanopartikeln eine Funktion der Freisetzung von Silberionen ist, wurde in der folgenden Studie untersucht, ob Silbernanopartikel verschiedener Morphologie sich unterschiedlich auflösen.

Die Auflösung von sphärischen Silbernanopartikeln wurde bereits in verschiedenen externen Studien untersucht.^{[43],[44]}

Die Auflösung von trigonalen Silbernanoprismen mit einer Konzentration von 25 mg/L wurde in dieser Studie zunächst in vier verschiedenen Medien untersucht. Dazu wurden Reinstwasser, isotonische Kochsalzlösung (Ionenstärke (I) = 154 mmol/L), RPMI (Zellkultur-Medium, das im Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde, I = 138 mmol/L) und RPMI mit 10% fetalem Kälberserum (RPMI/FCS) (I = 124 mmol/L) verwendet, da diese Medien dem Zytoplasma in aufsteigender Reihenfolge exakter entsprechen. Zur Abtrennung von freigesetzten Silberionen von Silbernanopartikeln nach verschiedenen Lagerungszeiten werden Zentrifugationsfiltrationseinheiten (Amicon®) verwendet. Durch Verwendung der Zentrifugationsfiltrationseinheiten genügen kurze Zentrifugationszeiten (15 min), um Nanopartikel von Silberionen zu trennen. Nach Abtrennung der Silberionen können diese quantitativ mittels AAS bestimmt werden. In einigen vorherigen Studien wurden Filtersysteme mit einem MWCO von 100 kDa verwendet, um freie Silberionen von Silbernanopartikeln zu trennen und um anschließend zu untersuchen, wie sich Silbernanopartikel auflösen.^[43] Eine Pore mit einem MWCO von 100 kDa entspricht in etwa einer Porengröße von 9 nm.^[198] Somit können nicht nur Silberionen, sondern auch Silbernanopartikel durch die Filter penetrieren. In einer Studie zur Untersuchung der Auflösung von Silbernanopartikeln wurden Filtersysteme mit einem MWCO von 3 kDa verwendet.^[44] Dies entspricht einer Porengröße von 1-2 nm. Die Autoren beschreiben, dass nach 24 h sich ca. 15% des Silbers der Nanopartikel aufgelöst hat. Jedoch hatten die untersuchten polydispersen Nanopartikel einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von ca. 2 nm. Folglich ist es auch hier möglich, dass die Nanopartikel durch die Filter penetrieren und somit die Nanopartikel das Messsignal in der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) liefern.

In vorherigen Studien wurde nicht untersucht, in welcher Quantität Silberionen von den Filtern absorbiert werden. Daher wurde in dieser Studie zunächst getestet, in welcher Quantität Silberionen die Membranen der Zentrifugationsfiltrationseinheiten mit verschiedenen Ausschlussgrenzen (Molecular Weight Cut-Off (MWCO)) passieren können. Dazu wurden Zentrifugationsfiltrationseinheiten mit einem MWCO von 3 und 50 kDa mit verschiedenen Konzentrationen an Silbernitrat in Reinstwasser und RPMI/FCS verwendet (s. Abbildung 4.28).

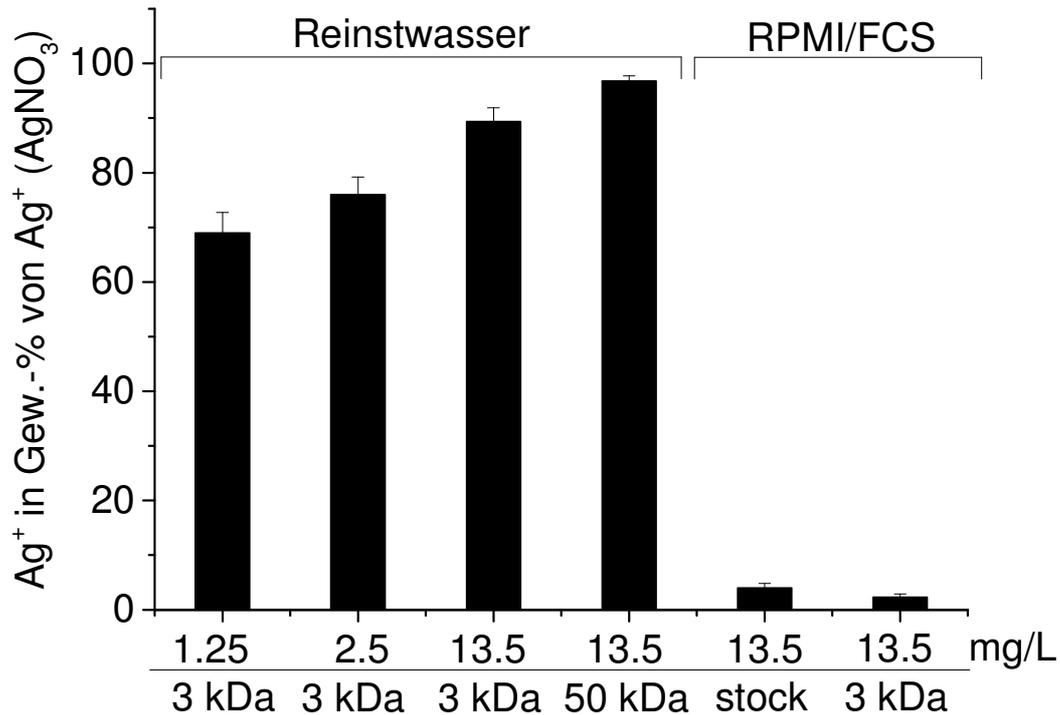


Abbildung 4.28: Diffusion von Silberionen aus Silbernitrat durch Zentrifugationsfiltrationseinheiten in Abhängigkeit der Porengröße (in kDa), der Konzentration des eingesetzten Silbers (in mg/L) und des Lösemittels. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf Silber, nicht aber auf Silbernitrat.

Dabei ist zu erkennen, dass bei einer Silberionenkonzentration von (1.25 ± 0.01) mg/L $(69 \pm 4)\%$ der Silberionen durch eine 3 kDa-Membran diffundieren. Somit werden (0.39 ± 0.01) µg der Silberionen an die Membran gebunden. Da die Membran eine aktive Membranfläche von 3 cm^2 hat, beträgt die Absorption (0.13 ± 0.02) µg/cm². Wird die Konzentration an eingesetzten Silberionen verdoppelt, so erhöht sich der relative Anteil der diffundierten Ionen auf $(76 \pm 4)\%$. Hierbei werden (0.20 ± 0.03) µg/cm² der Silberionen an die Membran gebunden. Wird die Konzentration der eingesetzten Silberionen auf (13.50 ± 0.01) mg/L erhöht, so beträgt der diffundierte Anteil ca. $(89 \pm 3)\%$ und der absorbierte Anteil (0.45 ± 0.11) µg/cm². Wird ein Filter mit einem MWCO von 50 kDa verwendet, so passieren $(97 \pm 1)\%$ der Silberionen die Membran. Der absorbierte Anteil beträgt lediglich (0.14 ± 0.01) µg/cm². Die verringerte Absorption von Silberionen durch einen Filter mit einem MWCO von 50 kDa kann durch die verringerte Wahrscheinlichkeit der Interaktion der Silberionen mit der regenerierten Cellulose der Membran erklärt werden, da der MWCO dieses Filters um das ca. 17-fache vergrößert ist. Wird Silbernitrat zu RPMI/FCS gegeben, kann kaum Silber mittels AAS detektiert werden. Dies

ist dabei davon unabhängig, ob die Probe als nichtfiltrierte Lösung (Stammlösung (stock)) oder als filtrierte Lösung (3 kDa) gemessen wird.

Zur Untersuchung der Freisetzung von Silberionen aus trigonalen Silbernanoprismen wurde darauf verzichtet, Filter mit einem MWCO von 50 kDa (Porengröße etwa 7 nm)^[198] zu verwenden. Stattdessen werden zur Untersuchung der Auflösung der Nanopartikel Zentrifugationsfiltrationseinheiten mit einem MWCO von 3 kDa (Porengröße etwa 1-2 nm) verwendet, um die Penetration von Silbernanopartikeln zu unterdrücken. Während des Auflöseprozesses werden die Dispersionen in den einzelnen Medien in Zentrifugationsfiltrationseinheiten mit einem MWCO von 3 kDa gelagert. Somit wird gewährleistet, dass nach absolvierter Lagerung der Silberprismen, diese innerhalb von 15 min mittels Zentrifugation vom Medium getrennt werden können, um anschließend die Konzentration an freien Silberionen mittels AAS zu bestimmen.

In Abbildung 4.29 ist die Auflösung trigonaler Silbernanoprismen in verschiedenen Medien dargestellt. Dabei wurde die Gesamtmenge an Silberionen im Dialysat bezogen auf die eingesetzte Menge an Silber in relativen Masseanteilen gegen die Lagerungszeit aufgetragen.

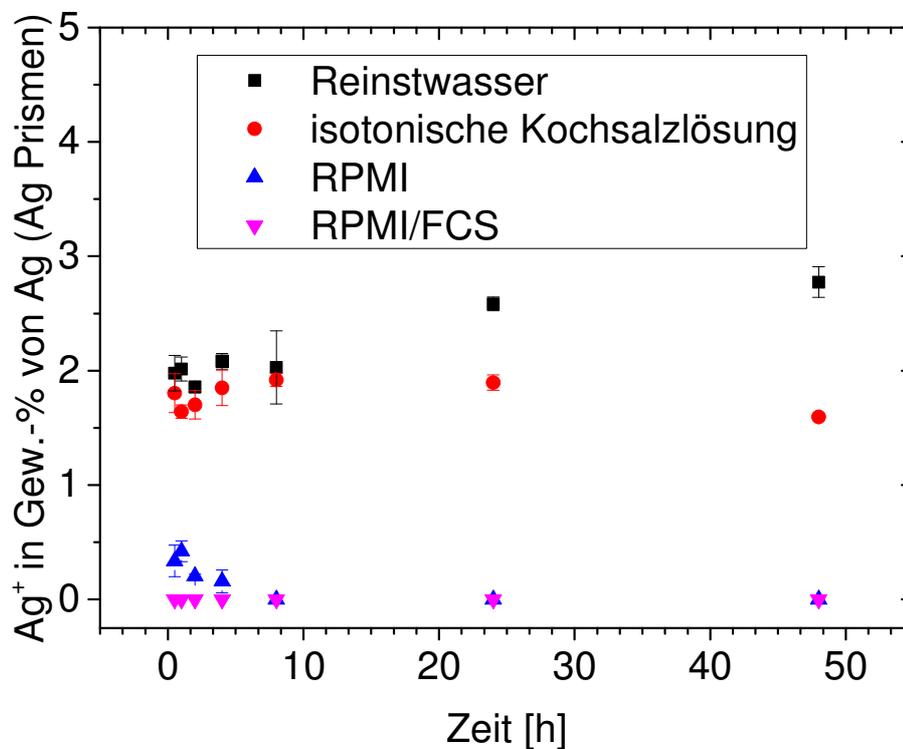


Abbildung 4.29: Auflösung von Silbernanoprismen in Reinstwasser in Anwesenheit von Luftsauerstoff, isotonischer Kochsalzlösung, RPMI und RPMI/FCS.

Anhand der Daten aus Abbildung 4.29 ist zu erkennen, dass in Reinstwasser nach 48 h ca. 2.8% an freien Silberionen detektiert werden können. In isotonischer Kochsalzlösung liegt der Anteil bei etwa 1.6% und in RPMI und RPMI/FCS können wie erwartet keine freien Silberionen detektiert werden. Zum einen können die verschiedenen Ionenstärken der Medien die Auflösung der Nanoprismen beeinflussen, zum anderen sind in isotonischer Kochsalzlösung sämtliche ionischen Anteile und in RPMI 78% bzw. RPMI/FCS 71% der Anionen Chloridionen. Silberchlorid hat eine Löslichkeit von ca. 1.88 mg/L.^[199] Somit kann vermutet werden, dass freie Silberionen direkt nach Freisetzung an Chloridionen binden und Silberchlorid ausfällt. Ausgefallenes AgCl kann nicht durch die 3 kDa-Filter diffundieren und somit kann Silber, das als Silberchlorid gebunden ist, nicht mittels AAS detektiert werden. In RPMI sind darüber hinaus schwefelhaltige Aminosäuren und Dimere solcher Aminosäuren (L-Methionin und L-Cystein) enthalten, die dafür bekannt sind Silberionen zu binden. In RPMI/FCS sind zudem Proteine u.a. bovines Serumalbumin enthalten. Es wird vermutet, dass Proteine zudem Silberionen binden.^[200] In Reinstwasser kann beobachtet werden, dass es zu einer signifikanten Freisetzung von Silberionen nach 17 h kommt. In Reinstwasser sowie in isotonischer Kochsalzlösung ist zudem ein Versatz bei $t = 0$ h der Silberkonzentration zu erkennen. Es sind folglich vor Beginn des Auflöseprozesses Silberionen (ca. 2%) in den Dispersionen vorhanden. Da die trigonalen Silbernanoprismen nach der Synthese für 2 h zentrifugiert werden um überschüssige Edukte und Nebenprodukte der Reaktion zu entfernen, die die Auflösung der Nanopartikel beeinflussen können, ist es möglich, dass hierbei 2% Silberionen aus den Nanopartikeln freigesetzt werden. Anhand der vergrößerten Darstellung des Auflöseprozesses in Reinstwasser und isotonischer Kochsalzlösung ist erkennbar, dass es zu einer Sättigung nach etwa 48 h in Reinstwasser kommt (s. Abbildung 4.30). In der vergrößerten Darstellung ist ersichtlich, dass es in isotonischer Kochsalzlösung zunächst zu einer Freisetzung von Silberionen kommt und anschließend die Konzentration an freien Silberionen sinkt. Es wird vermutet, dass es hierbei zu einer Konkurrenzreaktion kommt. Während Silberionen freigesetzt wurden, kommt es zur Bildung von Silberchlorid und damit zur Reduzierung der Konzentration freier Silberionen. Die Daten für die Auflösung in Reinstwasser lassen sich durch folgende Fitfunktion (s. Gleichung (4.8)), die schon in anderen Veröffentlichungen verwendet wurde, anpassen.^[43]

$$\frac{d[Ag]}{dt} = -k * [Ag] \Rightarrow [Ag^+]_t = [Ag^+]_{final}(1 - e^{-kt}) + [Ag^+]_0 \quad (4.8)$$

Hierbei beträgt $[Ag^+]_0 = 2\%$. Folglich sind vor Beginn der Auflösung Silberionen in der Dispersion enthalten. Die Geschwindigkeitskonstante beträgt $k = (0.035 \pm 0.012)h^{-1}$ und die Silberionenkonzentration nach dem Auflöseprozess $[Ag^+]_{final} = (1.0 \pm 0.2)\%$. Aus der Studie der Penetration von Silberionen durch die 3 kDa-Membran ist ersichtlich, dass ein Teil der Silberionen, der sich aus den trigonalen Silbernanoprismen in Reinstwasser gelöst hat, von den Filtern absorbiert wird. Wird davon ausgegangen, dass während der Auflösung von trigonalen Silbernanoprismen etwa 30% der freigesetzten Silberionen vom Filter absorbiert werden, kommt man zu einem Wert für $[Ag^+]_{final}$ in Reinstwasser von etwa 1.4%.

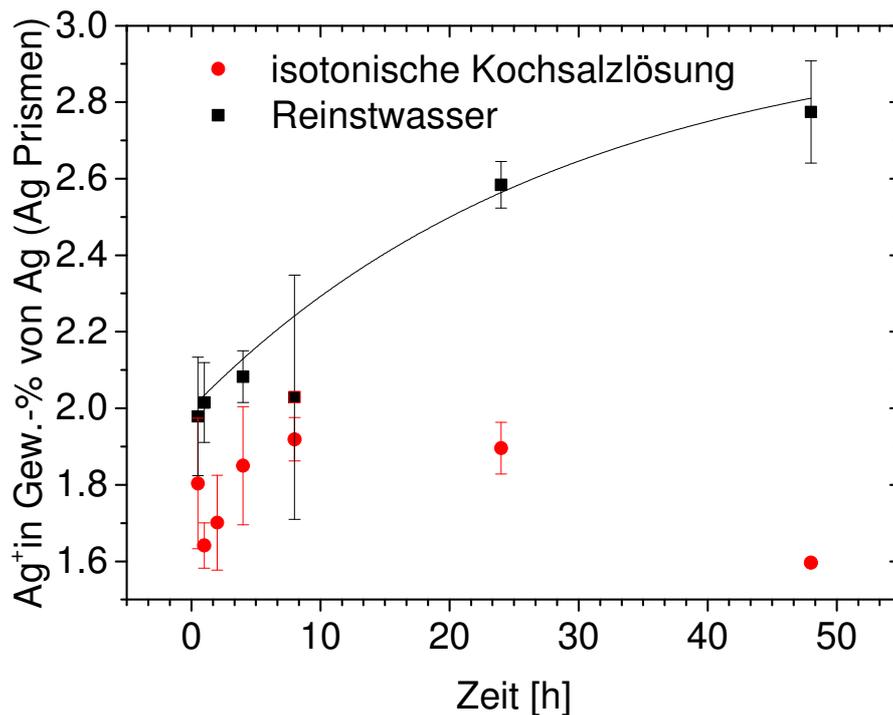


Abbildung 4.30: Vergrößerte Darstellung der Auflösung von Silbernanoprismen in Reinstwasser und isotonomischer Kochsalzlösung (pH = 7). Bei der Anpassungsfunktion beträgt das Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0.9823$.

Es wurde vor Durchführung der Auflösung der Silbernanoprismen vermutet, dass der Anteil an Silberionen, der aus den Silbernanoprismen herausgelöst wird, höher ist als bei sphärischen Analoga. Kittler et al. und Liu et al. zeigten jedoch, dass bei sphärischen Analoga deutlich höhere Masseanteile freigesetzt werden. So werden bei Kittler

et al. bezüglich Citrat-funktionalisierter Silbernanopartikel etwa $[\text{Ag}^+]_{\text{final}} = 11.5\%$ bzw. 15% in Abhängigkeit von der eingesetzten Silberkonzentration ($c_0 = 140 \text{ mg/L}$ bzw. 320 mg/L) freigesetzt. Kittler et al. vermuten daher, dass die Geschwindigkeitskonstante k und die freigesetzte Konzentration an Silberionen antiproportional zur Konzentration der Silbernanopartikel sind.^[43] Da in unserer Studie eine deutlich geringere Konzentration (25 mg/L) an Nanopartikeln eingesetzt wurde, kann dies der Grund für die verringerte Freisetzung der Silberionen sein. Vergleicht man die Geschwindigkeitskonstanten, die Kittler et al. in Ihren Versuchen für die Auflösung von Silbernanopartikeln fanden, zeigt sich, dass sich mit steigender Silbernanopartikelkonzentration die Geschwindigkeitskonstante verringert. Silbernanopartikel mit einer Konzentration von 50 mg/L haben demnach eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 0.017 \text{ h}^{-1}$.^[43] In unserem Versuch ist die Konzentration an trigonalen Silbernanoprismen um 50% verringert. Hieraus resultiert eine um etwa 50% erhöhte Geschwindigkeitskonstante $k = (0.035 \pm 0.012) \text{ h}^{-1}$.

Es wurde versucht, die Messergebnisse aus der AAS mit anderen Messmethoden zu verifizieren. Dazu wurden zunächst Experimente an einem Raster-Transmissionselektronenmikroskop (STEM)-Detektor eines Rasterelektronenmikroskops (REM) durchgeführt. Trigonale Silbernanoprismen wurden in Reinstwasser ($\text{pH} = 7$) für verschiedene Zeiträume gelagert und anschließend mittels STEM abgebildet (s. Abbildung 4.31).

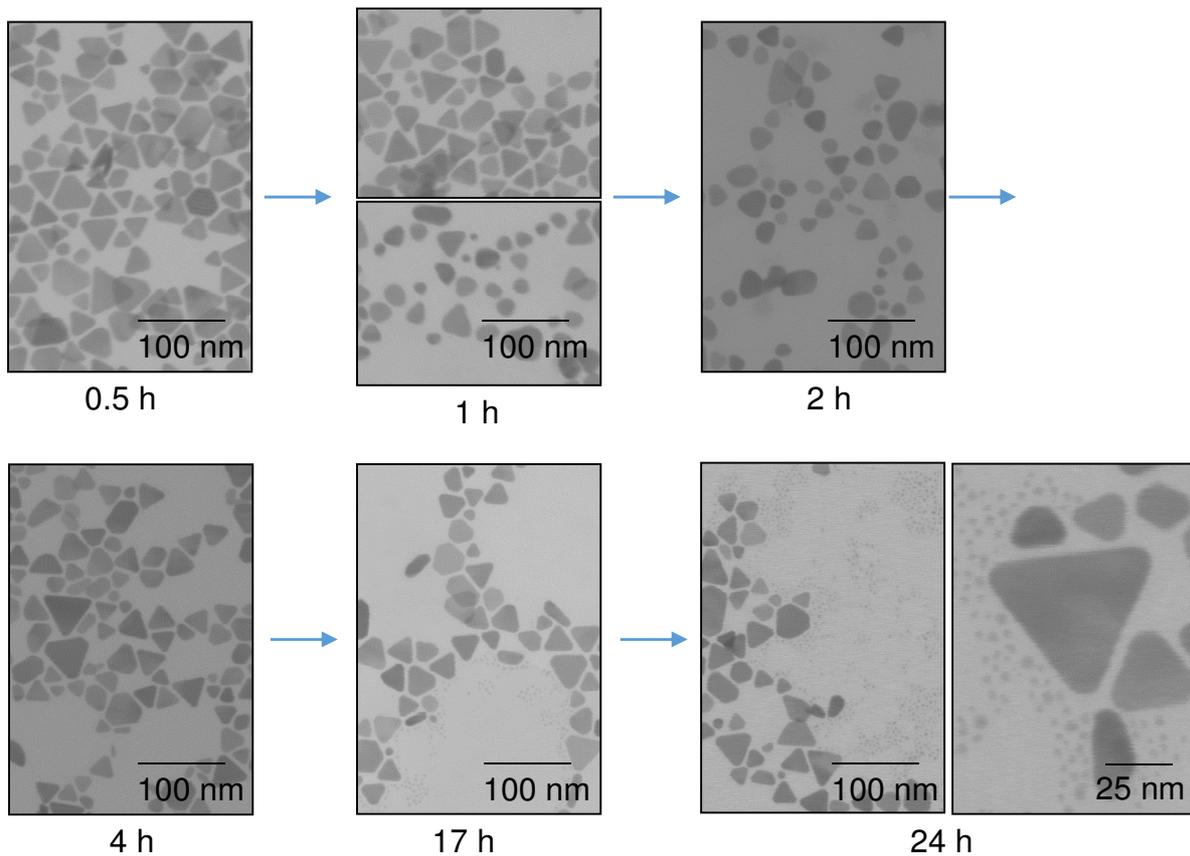


Abbildung 4.31: STEM-Aufnahmen der Auflösung von trigonalen Silbernanoprismen zu verschiedenen Lagerungszeiten (0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 17 h und 24 h). Es wurden mindestens 752 Nanopartikel pro Probe ausgemessen.

Dabei ist zu erkennen, dass sich nach 17 h zwei Fraktionen bilden. Die erste Fraktion besteht aus nicht angelösten Nanoprismen. Diese liegen auch nach 24 h unangelöst oder wenig angelöst vor. Die zweite Fraktion besteht aus kleinen sphärischen Nanopartikeln mit einem Durchmesser von < 5 nm.

In den STEM-Aufnahmen werden die Projektionsflächen der trigonalen Silbernanoprismen nach verschiedenen Lagerungszeiten dargestellt. Die Abnahme der Projektionsfläche eines trigonalen Silbernanoprismas korreliert nicht linear mit der Auflösung eines trigonalen Silbernanoprismas. Daher müssen die Daten für die Projektionsflächen zunächst in Volumina umgerechnet werden.

Die kleinen sphärischen Nanopartikel sind nach einer Lagerungszeit von 24 h in deutlich höherer Quantität (ca. 89%) vorhanden (s. Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32). Zu Beginn sind keine kleinen Kerne in den STEM-Aufnahmen zu finden.

Da mittels AAS in vorherigen Versuchen gezeigt wurde, dass nur eine kleine Menge an Silberionen aus den Prismen freigesetzt wird, erscheint es unwahrscheinlich, dass die kleinen Silbernanopartikel aus ehemalige Silbernanoprismen stammen.

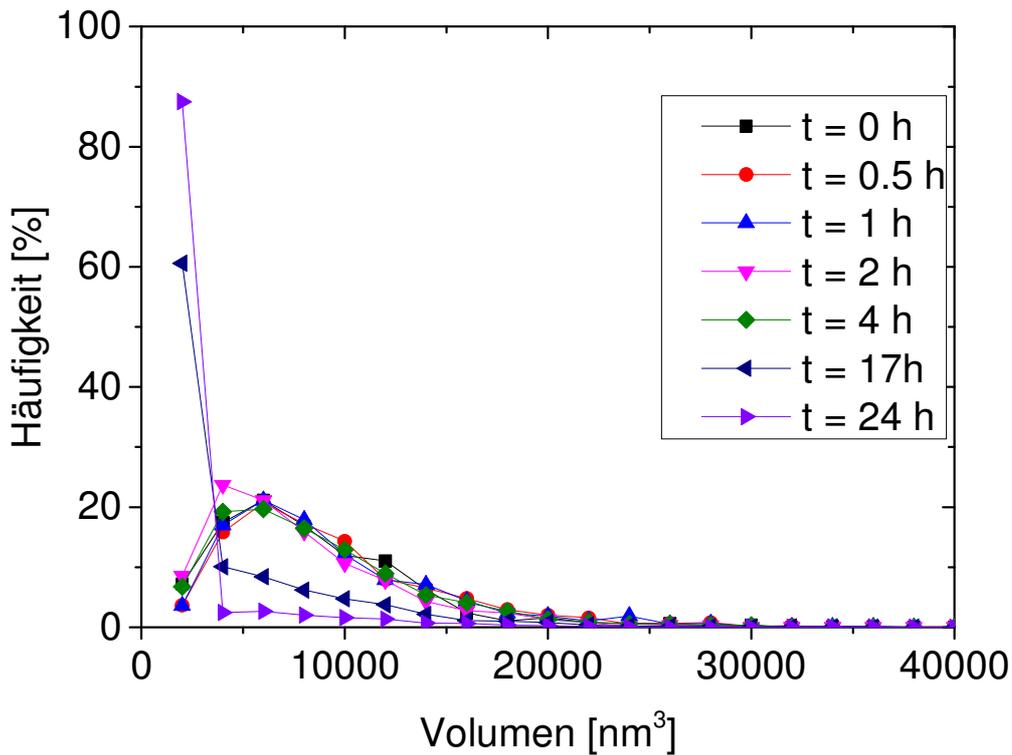


Abbildung 4.32: Häufigkeit der aus den Flächen berechneten Volumina der Nanopartikel in Abhängigkeit der Lagerungszeit (STEM-Daten). Es wurden pro Probe mindestens 752 Nanopartikel ausgemessen.

Um zu überprüfen, wie die kleinen Nanopartikel entstanden sind, wurden daher zwei verschiedene Konzentrationen an Silberionen (Silbernitratlösung mit einer Konzentration von 0.125 mg/L und 1.25 mg/L bezüglich Ag (entsprechend 0.5% bzw. 5% der Silbernanoprismenkonzentration zu Beginn der Auflösung der Ag-Prismen)) auf ein Kupfernetzchen getropft und mittels STEM untersucht.

Dabei ist zu erkennen, dass sich hierbei Nanostrukturen mit einer Größe von < 5 nm bilden (s. Abbildung 4.33). Diese Nanopartikel sind von der Größe vergleichbar mit den kleinen Nanopartikeln, die auf dem Kupfernetz nach einer Lagerungszeit von 24 h gefunden wurden (vgl. Abbildung 4.31).

Somit kann geschlussfolgert werden, dass die kleinen Nanopartikel aus Abbildung 4.31 nicht stark angelöste Nanoprismen sind, sondern aus dem kleinen Anteil aus Silberionen von Silbernanoprismen entstanden sind. Dabei beträgt dieser Anteil ca. 3% des Silbers aus Nanoprismen (mittels STEM bestimmt). Es wird davon ausgegangen, dass die kleinen Nanostrukturen aus Ag_2O bestehen.^[201] Hierbei reagieren Silberionen mit atmosphärischem Luftsauerstoff zu Ag_2O .

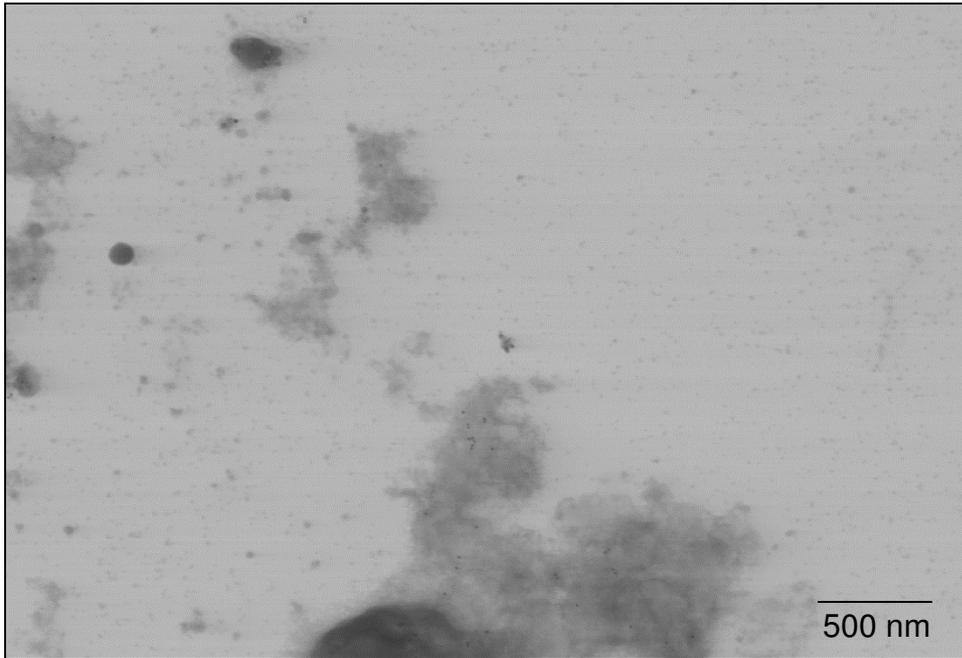


Abbildung 4.33: STEM-Aufnahme einer eingetrockneten Silbernitratlösung (0.125 mg/L bezüglich Ag). Eine STEM-Aufnahme zu eingetrockneter Silbernitratlösung mit einer Konzentration von 1.25 mg/L wird an dieser Stelle nicht abgebildet, da diese ähnlich der hier gezeigten STEM-Aufnahme ist.

Anschließend wurde die Auflösung von trigonalen Silbernanoprismen und Silbernanosphären in verschiedenen Medien (Reinstwasser (pH = 7), Acetatpuffer (pH = 4), isotonischer Kochsalzlösung (pH = 7) und isotonischem Acetatpuffer (pH = 4)) mittels UV/VIS-Spektroskopie und STEM nach 0 h und 24 h untersucht. Anhand der UV/VIS-Spektren der trigonalen Silbernanoprismen in Reinstwasser nach 0 und 24 h zeigt sich, dass sich die Nanopartikel analog zu STEM- und AAS-Ergebnissen sich kaum verändern (s. Abbildung 4.34).

In Acetatpuffer (pH = 4) ist die Absorption unmittelbar nach Überführung in den Puffer deutlich geringer als in Reinstwasser (blaue Kurve für 0 h in Abbildung 4.34), bleibt dann jedoch in den folgenden 24 h nahezu konstant (magentafarbene Kurve in Abbildung 4.34). In isotonischer Kochsalzlösung und isotonischem Acetatpuffer ist die Absorption unmittelbar nach Überführung in das jeweilige Medium noch geringer, danach ändert sich in den nächsten 24 h die Absorption nur noch wenig (s. Abbildung 4.34).

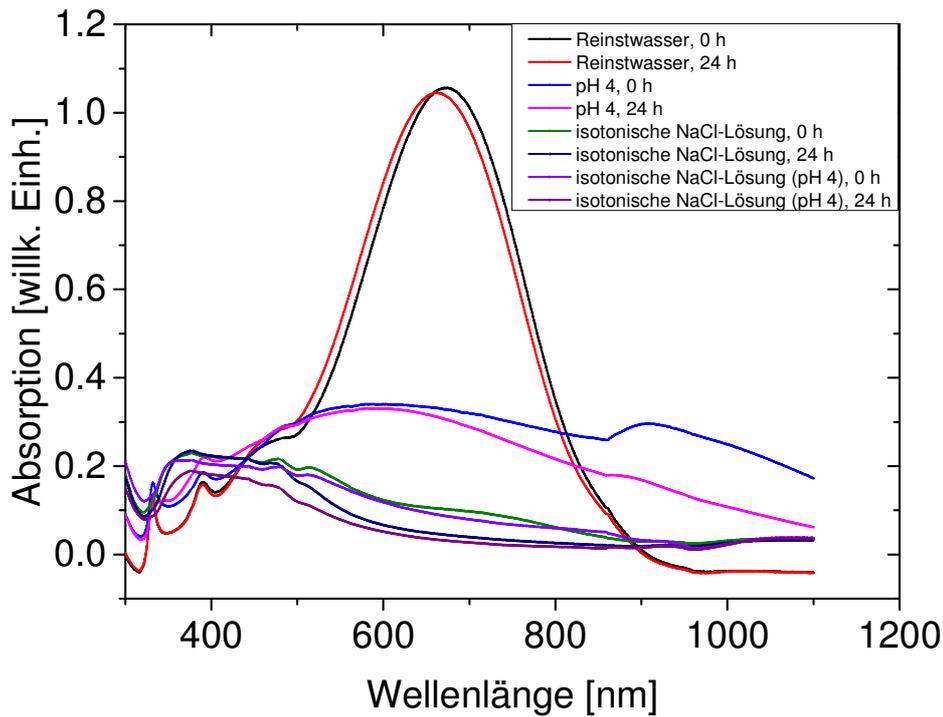


Abbildung 4.34: UV/VIS-Spektren der trigonalen Silbernanoprismen ($c = 70 \text{ mg/L}$) in verschiedenen Medien (Reinstwasser ($\text{pH} = 7$), Acetatpuffer ($\text{pH} = 4$), isotonischer Kochsalzlösung ($\text{pH} = 7$) und isotonischem Acetatpuffer ($\text{pH} = 4$)) nach 0 h und 24 h.

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit STEM-Aufnahmen, die von den Nanopartikeln nach Lagerung in den einzelnen Medien angefertigt wurden. Dabei zeigt sich, dass trigonale Silbernanoprismen, die in Acetatpuffer ($\text{pH} = 4$) gelagert wurden, nur partiell angelöst wurden (s. Abbildung 4.35).

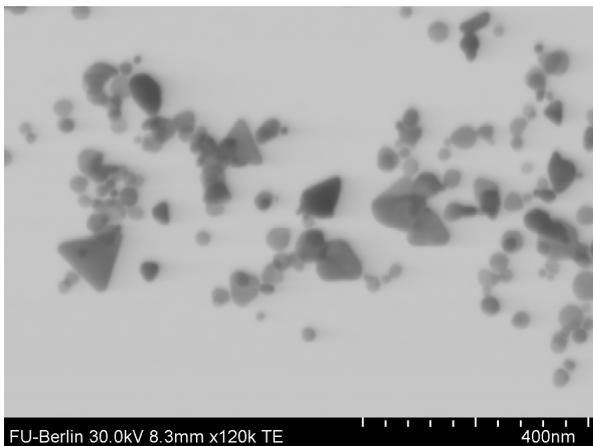


Abbildung 4.35: STEM-Aufnahme von ehemaligen trigonalen Silbernanoprismen nach Lagerung in Acetatpuffer über 24 h.

Im Verhältnis dazu sind trigonale Silbernanoprismen, die in isotonischer Kochsalzlösung und isotonischem Acetatpuffer (pH = 4) gelagert wurden, nach 24 h deutlich abgerundet mit einem Durchmesser der abgerundeten Plättchen von jeweils (16 ± 4) nm (s. Abbildung 4.36.1/2). Das Ergebnis ist analog zu den vorherigen UV/VIS-Messungen, da die Absorptionen der Nanopartikel in isotonischer Kochsalzlösung (pH = 7) und isotonischem Acetatpuffer (pH = 4) vergleichbar und deutlich geringer als in Acetatpuffer (pH = 4) sind. Zudem ist an dieser Studie erkennbar, dass die trigonalen Silbernanoprismen deutlich stärker in der Gegenwart von Chloridionen angelöst werden, als in der Gegenwart von Protonen. Hierfür ist die große Affinität von Chloridionen für Silberionen ($\Delta H_f^0 = -127.01 \text{ KJ/mol}$) verantwortlich. Silberchlorid hat eine Löslichkeit von 1.88 mg/L in Wasser.^[199]

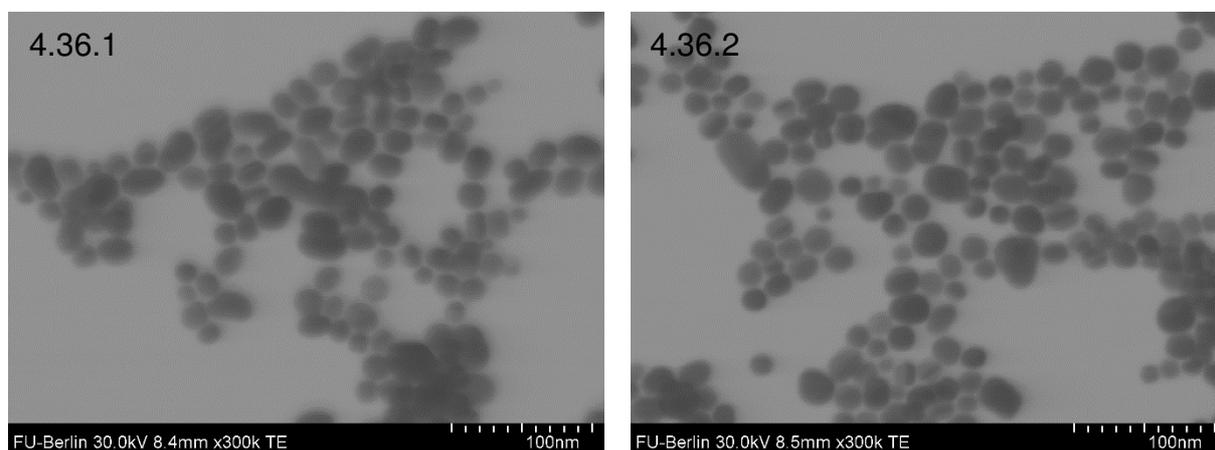


Abbildung 4.36: STEM-Aufnahmen von trigonalen Silbernanoprismen nach Lagerung in isotonischem Acetatpuffer (pH = 4) (s. Abbildung 4.36.1) und isotonischer Kochsalzlösung (pH = 7) (s. Abbildung 4.36.2).

Anschließend werden die sphärischen Nanopartikel ($c = 140 \text{ mg/L}$) mittels UV/VIS-Spektroskopie in verschiedenen Medien (Reinstwasser (pH = 7), Acetatpuffer (pH = 4), isotonischer Kochsalzlösung (pH = 7) und isotonischem Acetatpuffer (pH = 4)) untersucht. Die Konzentration wurde im Vergleich zu den Prismen verdoppelt, da die Absorption in der UV/VIS-Spektrometrie bei 70 mg/L zu gering war. Hierbei zeigt sich, dass die Anlösung der Silbernanosphären deutlich länger dauert als die Anlösung der trigonalen Silbernanoprismen. Die Auflösung der Silbernanosphären in Acetatpuffer kann mit einer Kinetik 1. Ordnung beschrieben werden (s. Gleichung (4.9), für $B = 0 \text{ willk. Einh.}, k_2 = 0 \text{ h}$). Die Auflösung der Silbernanosphären in salzhaltigen Lösungen folgt einem biexponentiellen Prozess. Somit können die Daten nicht mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden, sondern mit einer biexponentiellen

Funktion, d. h. es finden mehrere Prozesse mit deutlich unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten statt (s. Gleichung (4.9)). Dies ist darauf zurückzuführen, dass es in den salzhaltigen Lösemitteln (isotonische Kochsalzlösung und isotonischer Acetatpuffer) neben einer Auflösung durch Protonen zusätzlich zu einem Ausfällen der Silberionen mit Chloridionen kommt.

$$y = A * \exp(-k_1 t) + B * \exp(-k_2 t) + y_0 \quad (4.9)$$

Hierbei entspricht y der Extinktion zum Zeitpunkt t , y_0 der Extinktion für $t \rightarrow \infty$, A, B den präexponentiellen Faktoren und k_1, k_2 den Geschwindigkeitskonstanten. In Abbildung 4.37 sind die Maxima der einzelnen UV/VIS-Spektren der Silbernanosphären in verschiedenen Dispersionsmitteln (Reinstwasser (pH = 7), Acetatpuffer (pH = 4), isotonische Kochsalzlösung (pH = 7) und isotonischer Acetatpuffer (pH = 4)) in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die Auflösung der Silbernanosphären bevorzugt in Acetatpuffer, isotonischer Kochsalzlösung und isotonischem Acetatpuffer abläuft. Es findet analog zu trigonalen Silbernanoprismen keine erkennbare Auflösung in Reinstwasser statt.

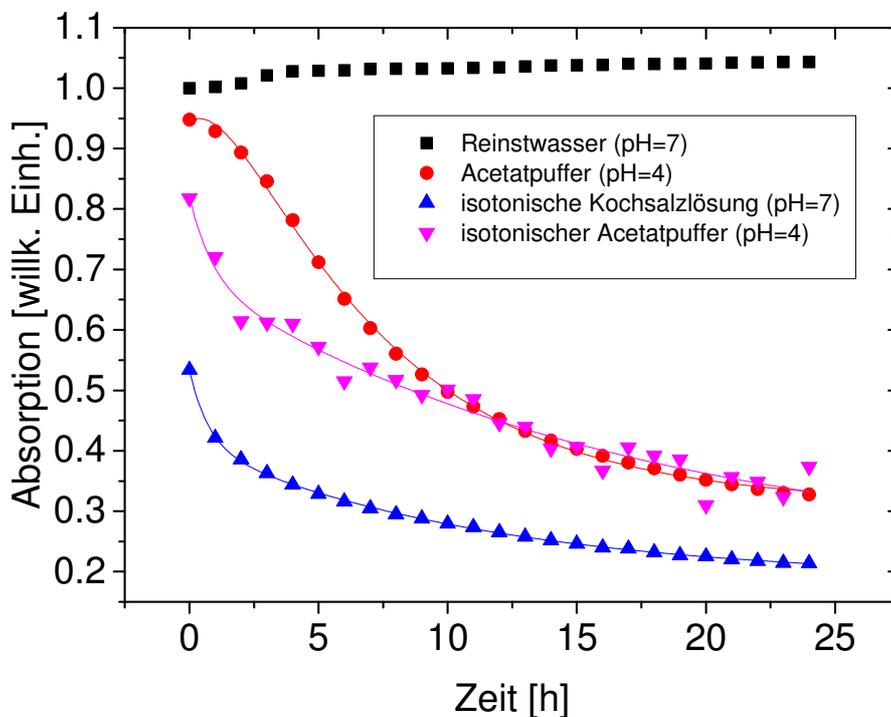


Abbildung 4.37: Auftragung der maximalen Absorption der einzelnen UV/VIS-Spektren der Silbernanosphären ($c = 140 \text{ mg/L}$) in verschiedenen Medien (Reinstwasser (pH = 7) bei 431 nm, Acetatpuffer (pH = 4), bei 433 nm, isotonischer Kochsalzlösung (pH = 7), bei 426 nm und isotonischem Acetatpuffer (pH = 4), bei 433 nm) in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Ergebnisse der Anpassung der Auflösung der Silbernanosphären in verschiedenen Medien sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Anpassung der zeitabhängigen Auflösung der Silbernanosphären in Acetatpuffer, isotonischer Kochsalzlösung und isotonischem Acetatpuffer.

Medium	A [willk. Einh.]	B [willk. Einh.]	k_1 [h ⁻¹]	k_2 [h ⁻¹]	y_0 [willk. Einh.]
Acetatpuffer	0.75±0.02	-	0.11±0.01	-	0.26±0.02
isotonische Kochsalzlösung	0.12±0.01	0.22±0.01	1.4±0.1	0.09±0.01	0.19±0.01
isotonischer Acetatpuffer	0.14±0.04	0.47±0.07	1.2±0.8	0.06±0.03	0.22±0.10

Anschließend wurden STEM-Aufnahmen von Silbersphären nach Lagerung in Reinstwasser (pH = 7), Acetatpuffer (pH = 4), isotonischer Kochsalzlösung (pH = 7) und isotonischem Acetatpuffer (pH = 4) angefertigt. Dabei zeigt sich, dass die Silbersphären in Reinstwasser nach 24 h kaum angelöst werden (s. Abbildung 4.38). Dies Ergebnis ist analog zu den aufgenommenen UV/VIS-Spektren (vgl. Abbildung 4.37).

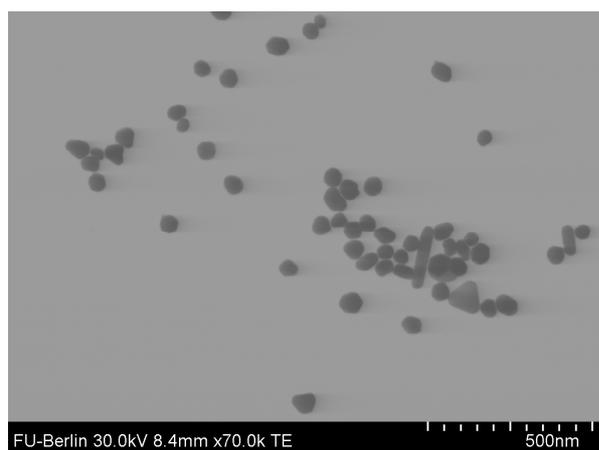


Abbildung 4.38: STEM-Aufnahme von Silbernanosphären nach Lagerung in Reinstwasser (pH = 7) für 24 h.

In Acetatpuffer (pH = 4) werden die Silbernanosphären deutlich stärker angelöst als die trigonalprismatischen Analoga (s. Abbildung 4.39 und vgl. mit Abbildung 4.35). Dabei haben die angelösten Sphären einen TEM-Durchmesser von (16 ± 5) nm.

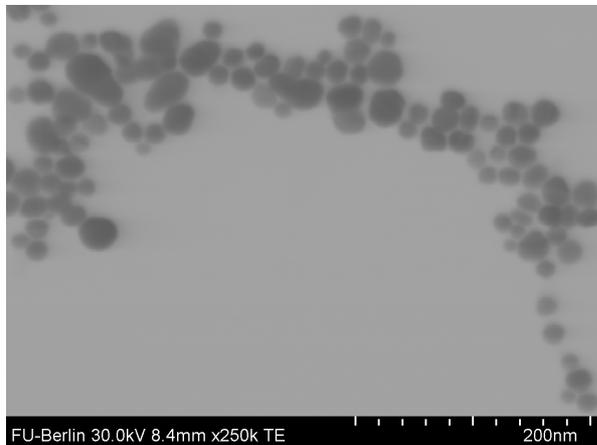


Abbildung 4.39: STEM-Aufnahme von Silbernanosphären nach Lagerung in Acetatpuffer (pH = 4) für 24 h.

Aufnahmen von Silbernanosphären, die in isotonischer Kochsalzlösung und isotonischem Acetatpuffer für 24 h gelagert wurden, konnten nicht angefertigt werden, da sehr viel Natriumchlorid auf den Kupfernetzchen kristallisierte. Anhand der UV/VIS-Spektren (vgl. Abbildung 4.34 und Abbildung 4.37) zeigt sich, dass die Auflösung der Silbernanosphären langsamer verläuft als die Auflösung der trigonalen Silbernanoprismen. Anhand der STEM-Aufnahmen ist jedoch erkennbar, dass die Silbernanosphären nach einer Lagerung von 24 h in Acetatpuffer ca. 99% ihres Volumens eingebüßt haben, während die trigonalen Silbernanoprismen nur zu etwa 74% angelöst wurden. Die Anlösung der trigonalen Silbernanoprismen läuft favorisiert in isotonischen Medien (isotonische Kochsalzlösung und isotonischer Acetatpuffer) ab (vgl. Abbildung 4.34). Aufgrund des vergrößerten Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses kann erklärt werden, dass die trigonalen Silbernanoprismen deutlich schneller angelöst werden. Nach kurzer Zeit werden die trigonalen Silbernanoprismen kaum mehr angelöst, während die Silbernanosphären sich innerhalb von 24 h in sämtlichen Medien (außer Reinstwasser) weiter auflösen. Die Oberflächenenergie der Spitzen der trigonalen Silbernanoprismen ist groß, sodass die Auflösung der Spitzen und die Freisetzung von Silberionen sehr schnell ablaufen. Folglich sind die trigonalen Silbernanoprismen zügig passiviert, während die Passivierung der Sphären länger dauert.

Es konnte mit AAS und STEM jeweils veranschaulicht werden, dass die Auflösung nach einer Lagerungszeit von 17 h in Reinstwasser signifikant wird, jedoch sehr gering

ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass trigonale Silbernanoprismen schneller, jedoch in geringerem Maße im Verhältnis zu ihren sphärischen Analoga in Acetatpuffer (pH 4) aufgelöst werden. Hierfür gibt es mehrere Gründe: Die trigonalen Silbernanoprismen sind außer mit PVP auch mit Citrat funktionalisiert. Kittler et al. zeigten, dass Citrat-funktionalisierte Silbernanopartikel deutlich geringe Konzentrationen ($[Ag^+]_{final} \approx 15\%$) an Silberionen freisetzen als PVP-funktionalisierte Silbernanopartikel ($[Ag^+]_{final} \approx 45\%$). Möglich ist, dass eine Doppelfunktionalisierung mit Citrat und PVP zu einer deutlich höheren Passivierung der Nanoprismen führt, die in einer geringeren Auflösung der Prismen resultiert.

In vorherigen Studien von Kittler et al. und Liu et al. wurden quantitativ sehr hohe Freisetzungen in Reinstwasser dokumentiert.^{[43],[44]} Es ist möglich, dass in den externen Studien von Kittler et al. (Porengröße 9 nm) und Liu et al. (Porengröße 1-2 nm) Silbernanopartikel durch die Membran diffundiert sind und in anschließenden AAS-Messungen nicht nur Silberionen sondern auch Silbernanopartikel zum Messsignal beitrugen. In unserer Studie kann die Penetration von trigonalen Silbernanoprismen, die eine deutlich größere räumliche Ausdehnung im Verhältnis zu den Nanopartikeln von Liu et al. haben, durch die Membran aufgrund der geringen Porengröße von etwa 1-2 nm ausgeschlossen werden.

4.2.3. Untersuchung der Aufnahme von trigonal-prismatischen und sphärischen Silbernanopartikeln in Zellen

Mediziner, Zellbiologen und Toxikologen versuchen zu erforschen, welche Eigenschaften Nanopartikel haben müssen um von biologischen Systemen aufgenommen zu werden. Hierbei spielen zahlreiche Faktoren, wie Material, Größe, Oberflächenfunktionalisierung und Zeta-Potential der Nanopartikel eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass die Form der Nanopartikel eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme in Zellsysteme spielt. Beispielsweise wurde herausgefunden, dass krankheitserregende Pilzsporen und Bakterien aufgrund ihrer Form von bestimmten Zellsystemen aufgenommen werden.^{[82],[202]} Es wird daher angenommen, dass auch die Form von Nanopartikeln eine Rolle bei der Aufnahme in biologische Systeme spielt: Gratton et al. zeigten, dass positiv geladene Polymernanopartikel verschiedener Form unterschiedlich stark von Gebärmutterhalskrebszellen aufgenommen werden. Hierbei werden Stäbchen gefolgt von Sphären, Zylindern und Würfeln bei einer Größe von

über 100 nm in höherer Konzentration aufgenommen.^[82] In Studien mit sub-100-nm Goldnanopartikeln zeigt sich, dass Sphären gegenüber Stäbchen in höherer Quantität von Brustkrebszellen aufgenommen werden.^{[85],[150]} Aus diesen Studien kann abgeleitet werden, dass die unterschiedliche Form von Nanopartikeln zu einer verschiedenen quantitativen Aufnahme führt.

Die Aufnahme von trigonalen Silbernanoprismen im Vergleich zu Sphären wurde in der Literatur noch nicht untersucht. Zur Untersuchung der Aufnahme und der biologischen Effekte trigonal-prismatischer (Kantenlänge: (42 ± 15) nm, Prismendicke: (8 ± 1) nm) und sphärischer Silbernanopartikel (Durchmesser: (70 ± 25) nm) in Zellen werden zwei verschiedene Zellsysteme (hMSC und HaCaT-Zellen) als *in vitro*-Modell für humane Zellen verwendet. Die hMSC sind multipotente, stromale Stammzellen, die in verschiedene Zelltypen differenzieren können. Die hMSC lassen sich aus verschiedenen Geweben (Stützgewebe und Bindegeweben wie Bändern, Knochen, Knorpel, Sehnen, Muskeln aber auch dem Fettgewebe und dem Blut) isolieren. hMSC sind zudem in den Prozess der Geweberegeneration involviert, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass diese Zellen mit zytotoxischen Silbernanopartikeln nach Exposition interagieren hoch ist.^{[78],[153]} Dabei repräsentieren hMSC primäre Zellen, die über mehrere Zellzyklen kultiviert werden können.^[78]

HaCaT-Zellen hingegen sind in der Oberhaut (Epidermis) der hauptsächlich ($> 90\%$) vorkommende Zelltyp. HaCaT-Zellen sind immortalisierte, epidermale Zellen, die eine hohe Proliferierungskapazität und Differenzierungskapazität aufweisen. Da HaCaT-Zellen als Modellsystem für epidermale Zellen fungieren und aufgrund der weiten Verbreitung von hMSC im menschlichen Organismus, dienen diese Zellsysteme als zelluläre Modellsysteme, um die Aufnahme von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie zu untersuchen. Die Inkubation von HaCaT-Zellen mit Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie wurde von Herrn Dipl.-Ing. S. Ahlberg (Dermatologie, Charité Berlin) durchgeführt. Frau Dr. C. Sengstock (Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum) führte die Inkubation von Silbernanopartikeln mit hMSC durch.

Zur Untersuchung der quantitativen und semi-quantitativen und der qualitativen Aufnahme von Silbernanopartikeln (10 und 25 mg/L) verschiedener Morphologie in verschiedene Zellsysteme werden die Rastertransmissionsröntgenmikroskopie (engl.: *Scanning Transmission X-ray Microscopy*, STXM), TEM und AAS verwendet. Mittels TEM können Proben mit einer hohen räumlichen Auflösung von etwa 1 nm abgebildet werden. Die Vor- und Nachteile von TEM werden in Kapitel 4.1.3 beschrieben. Mittels

STXM wird monochromatische, weiche Synchrotronstrahlung auf die biologische Probe fokussiert, während diese abgerastert wird. Die Intensität der transmittierten Röntgenstrahlung wird dabei detektiert, sodass eine zwei-dimensionale Projektion der biologischen Probe entsteht. Neben der räumlichen Auflösung bietet STXM zudem die Möglichkeit der Untersuchung des elementspezifischen Kontrasts (Spektromikroskopie).^[131] Dies ist auf die verschiedenen Photoabsorptionsquerschnitte der Rumpfniveau-Absorption zurückzuführen. Die spektrale Auflösung ist mit 2 bis 3 meV^[173] deutlich höher (Faktor 40,000) als bei energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX), die häufig mit TEM kombiniert wird. Zudem können dicke biologische Proben (bis zu 10 µm) mittels STXM untersucht werden. Trotz der Vorteile von STXM wurde die Methode nur zur Untersuchung einer limitierten Anzahl von biologischen Proben einschließlich der Erforschung lokaler morphologischer Änderungen in Zellen eingesetzt, da STXM nur an wenigen Synchrotronstrahlungszentren verfügbar ist.^[143]

4.2.3.1. Untersuchung der qualitativen Aufnahme von trigonal-prismatischen und sphärischen Silbernanopartikeln mittels STXM^[203]

Im Folgenden soll mit verschiedenen Analyseverfahren (STXM, TEM und AAS) untersucht werden, welche Nanopartikelform (sphärisch/trigonal prismatisch) in welches Zellsystem (HaCaT-Zelle/hMSC) bevorzugt aufgenommen wird.

Die Untersuchungen mittels STXM fanden an der Synchrotronstrahlungsquelle „Swiss Light Source“ (PSI, Schweiz) am Strahlrohr PoLux statt. Zuvor wurden die Zellen (hMSC und HaCaT-Zellen) auf einer Kollagen-bedeckten Si₃N₄-Membran wachsen gelassen und für 24 h mit zwei sauerstofffreien wässrigen Dispersionen, bestehend aus erstens sphärischen Silbernanopartikeln und zweitens trigonalen Silbernanoprismen (c = 25 µg/mL, s. Kapitel 4.2.1), inkubiert. STXM-Messungen wurden im Wasserfenster bei 510 eV unterhalb der O_K-Kante durchgeführt. In diesem Energiebereich ist der chemische Kontrast des organischen Materials optimal, da die Absorption von Proteinen erheblich größer der Absorption des Wassers ist (s. Abbildung 2.17).^[129] Die Messungen werden bei einem Druck p = 0.5 bar in einer He-Atmosphäre durchgeführt. Dementsprechend können mittels STXM im Verhältnis zu TEM native Zellproben untersucht werden.

Anhand der STXM-Aufnahmen zeigt sich, dass keine trigonalen Silbernanoprismen und nur wenige Silbernanosphären in HaCaT-Zellen gefunden werden können. Die

Zellen weisen jeweils dunkle Strukturen auf, die jedoch nicht Silbernanopartikeln zugeordnet werden können. Es wird vermutet, dass die großen dunklen Strukturen kristallisierte Salze sind, die im Zellkulturmedium gelöst waren, in dem sich die Zellen befanden (s. Abbildung 4.40).

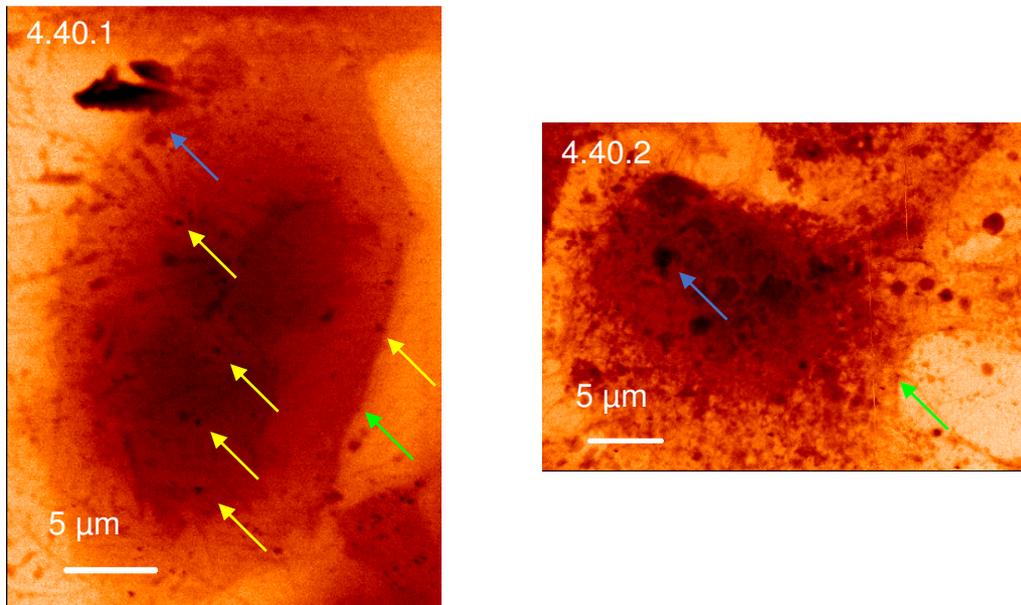


Abbildung 4.40: STXM-Aufnahmen zweier HaCaT-Zellen, die mit Silbernanosphären (s. Abbildung 4.40.1) sowie mit trigonalen Silbernanoprismen (s. Abbildung 4.40.2) inkubiert wurden. Innerhalb der Zelle befinden sich kleinere Aggregate sphärischer Silbernanopartikel (gekennzeichnet durch gelbe Pfeile, s. Abbildung 4.40.1). Innerhalb der HaCaT-Zelle, die mit trigonalen Silbernanoprismen inkubiert wurde, können keine Nanopartikel identifiziert werden (s. Abbildung 4.40.2). Mit grünen Pfeilen wird die Zellmembran und mit blauen Pfeilen die kristallisierten Salze gekennzeichnet.

Die untersuchten Zellen weisen keine morphologischen Veränderungen nach Inkubation mit Nanopartikeln auf, sodass akute Zytotoxizität ausgeschlossen werden kann. Die sphärischen Nanopartikel, die in HaCaT-Zellen aufgenommen wurden erscheinen leicht aggregiert. Die Abbildung einzelner Nanopartikel ist nicht möglich, da die räumliche Auflösung des STXM während der Messungen etwa 40 bis 50 nm beträgt.^[132] Da Nanopartikel innerhalb von Zellen generell in Vesikeln lokalisiert sind, die einen aciden pH-Wert haben,^[104] ist es wahrscheinlich, dass es zu einer starken Anlösung der untersuchten Nanopartikel innerhalb der Zellen gekommen ist (vgl. Kapitel 4.2.2). Der Grad der Anlösung von Silbernanopartikeln ist gegenproportional zum pH-Wert und proportional zur Chloridionenkonzentration des Mediums in dem sich die Silbernanopartikel befinden.^[44] Stark angelöste Silberpartikel können vermutlich nicht mittels STXM visualisiert werden (s. Kapitel 4.2.3.2).

Anschließend werden hMSC, die mit trigonalen Silbernanoprismen inkubiert wurden, untersucht (s. Abbildung 4.41). Wenige Aggregate der trigonalen Silbernanoprismen befinden sich in den untersuchten hMSC mit einem Durchmesser von etwa 500 nm. Es ist ein Aggregat mit einem Durchmesser von ca. 5 μm auf der STXM-Aufnahme zu erkennen, das in der Nähe der Zelle lokalisiert ist. Die Zelle weist keine morphologische Veränderung auf, welches auf keine akute Zytotoxizität hinweist.

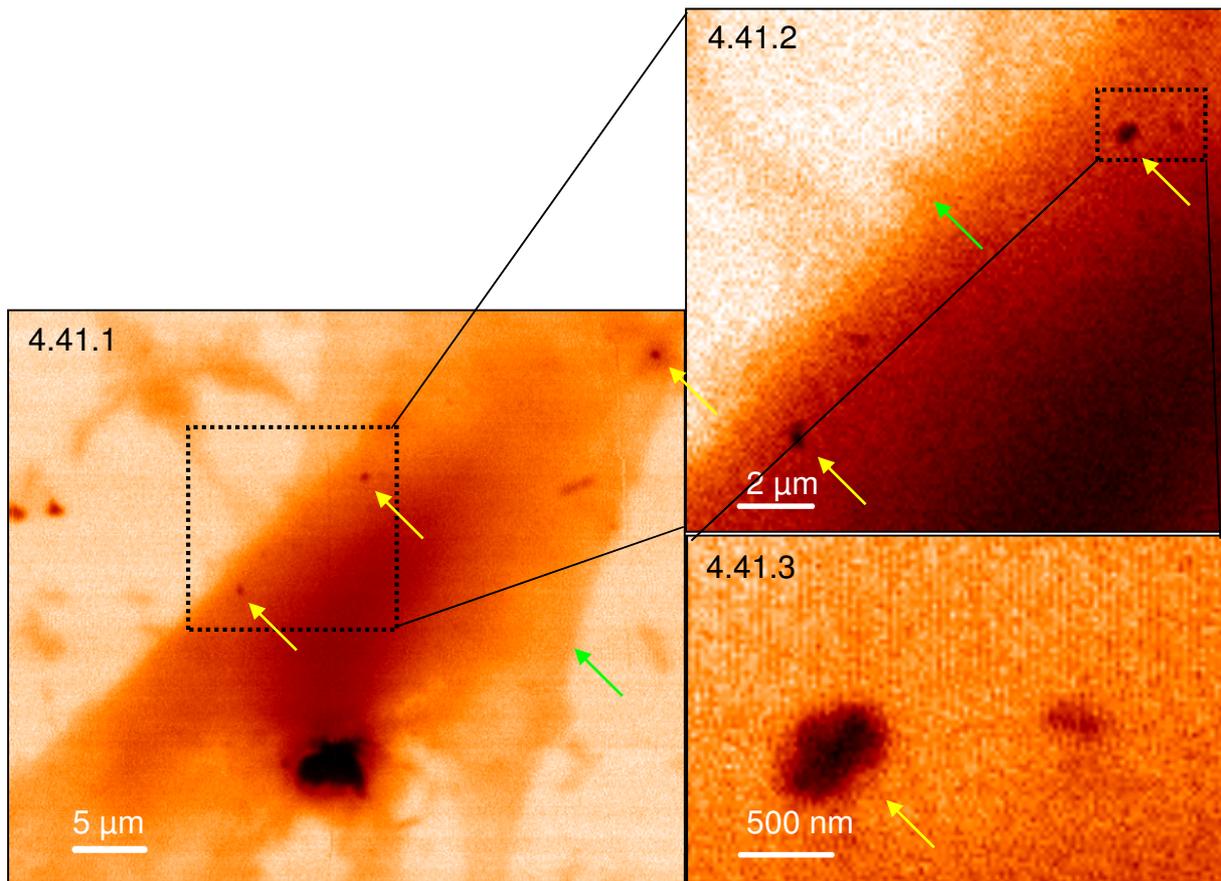


Abbildung 4.41: STXM-Aufnahme einer hMSC, die mit trigonalen Silbernanoprismen inkubiert wurde. Nahe oder gegebenenfalls innerhalb der Zelle befindet sich ein großes Aggregat (ca. 5 μm , s. Abbildung 4.41.1). Innerhalb der Zelle befinden sich kleinere Aggregate trigonaler Silbernanoprismen (gekennzeichnet durch gelbe Pfeile, s. Abbildung 4.41.1/2/3). Mit grünen Pfeilen wird die Zellmembran gekennzeichnet. Die gepunkteten schwarzen Kästchen zeigen hierbei den Bereich, der in der nachfolgenden Abbildung (vgl. Abbildung 4.41.1/2/3) mit höherer Vergrößerung dargestellt wird.

Anschließend werden Silbernanosphären, die mit hMSC inkubiert wurden mittels STXM analysiert. Dabei zeigt sich, dass hohe Konzentrationen an sphärischen Silbernanopartikeln perinukleär innerhalb der abgebildeten hMSC lokalisiert sind (s. Abbildung 4.42). In keiner der untersuchten Zellen (hMSC und HaCaT-Zellen) konnten Nanopartikel (Sphären und Prismen) innerhalb des Zellkerns gefunden werden.

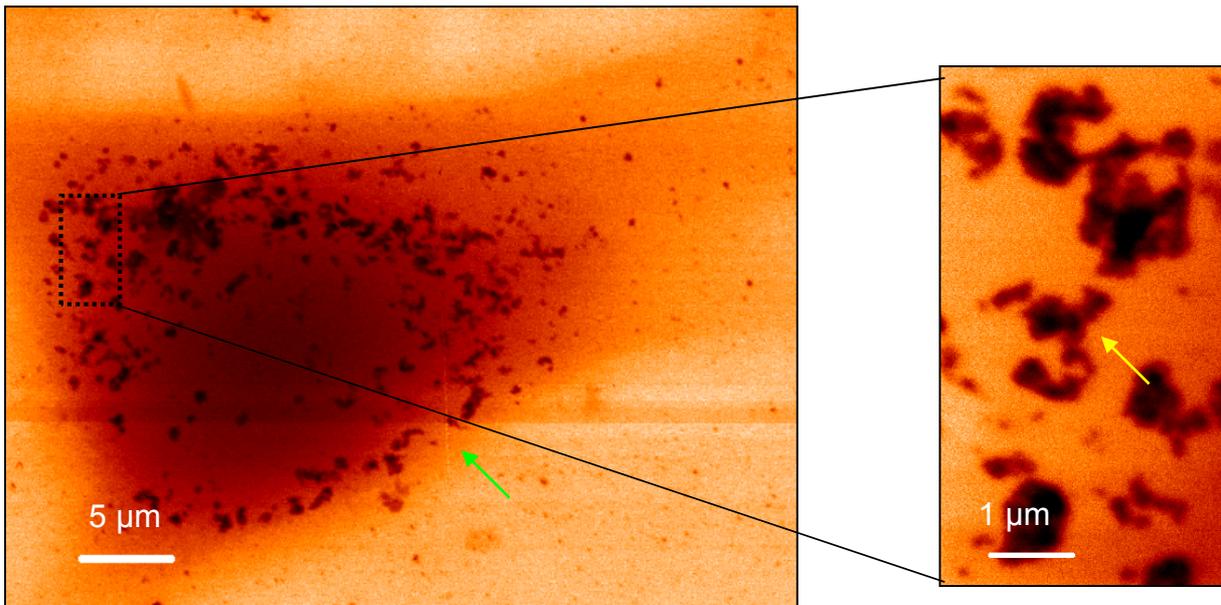


Abbildung 4.42: STXM-Aufnahme einer hMSC, die mit sphärischen Silbernanopartikeln mit einer Konzentration von 25 mg/L für 24 h inkubiert wurde. Die schwarzen Strukturen, die in der transmittierten Zelle lokalisiert sind, werden Nanopartikeln (s. gelber Pfeil) zugeordnet. Der grüne Pfeil markiert die Zellmembran.

Fraglich ist, ob trigonale Silbernanoprismen aufgrund des geringen pH-Wertes innerhalb von Lysosomen so stark angelöst werden, dass diese innerhalb von hMSC und HaCaT-Zellen nicht mittels STXM visualisiert werden können. Zudem muss beachtet werden, dass trigonale Silbernanoprismen vor der Inkubation mit den Zellen eine Dicke von (8 ± 1) nm haben. Wenn die Röntgenstrahlung senkrecht zu einer der drei Seitenflächen auf die trigonalen Silbernanoprismen trifft, sind die Nanopartikel mit STXM nicht identifizierbar.

Hierrüber können qualitative und semi-quantitative Studien mittels TEM (s. Kapitel 4.2.3.2) sowie qualitative Studien mittels AAS (s. Kapitel 4.2.3.3) Aufschluss geben.

4.2.3.2. Untersuchung der qualitativen und semi-quantitativen Aufnahme von trigonal-prismatischen und sphärischen Silbernanopartikeln mittels TEM

Für die folgenden Versuche zur semi-quantitativen und qualitativen Bestimmung der Aufnahme von trigonalen Silbernanoprismen, Silbernanosphären und einer 1:1-Mischung aus beiden Partikelsorten (Konfetti-Nanopartikel) werden die einzelnen Nanopartikelsysteme mit HaCaT-Zellen und hMSC für 24 h inkubiert, fixiert, eingebettet und ultradünn (Dicke ca. 70 nm) geschnitten. Anschließend werden die Zellen mittels TEM

und AAS untersucht. Hierbei soll untersucht werden, welche Nanopartikelform (trigonales Prisma oder sphärisch) in höherer Konzentration von verschiedenen Zellen aufgenommen wird. Zudem wird untersucht, in welcher Quantität das Mischsystem (Konfetti-Nanopartikel) aufgenommen wird, da denkbar ist, dass die Aufnahme des einen Systems (z.B. trigonales Silbernanoprisma), die Aufnahme des anderen Systems (z.B. sphärisches Silbernanopartikel) begünstigt. Zunächst werden die HaCaT-Zellen, die mit trigonalen Silbernanoprismen mit einer Konzentration von 25 mg/L inkubiert wurden, mittels TEM untersucht:

Dabei ist erkennen, dass es zahlreiche Zellen gibt, die große Mengen an ehemaligen Silbernanoprismen aufgenommen haben (s. Abbildung 4.43).

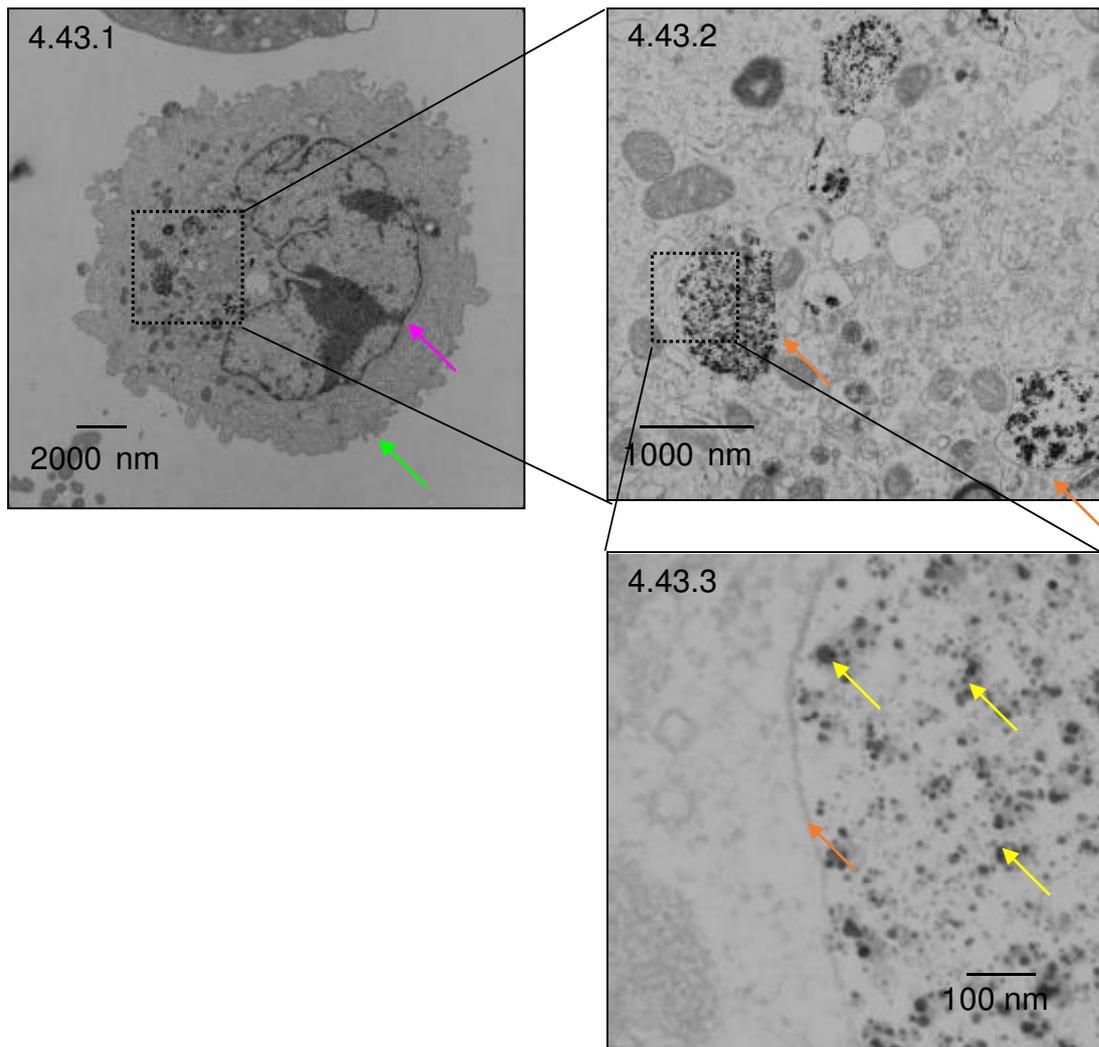


Abbildung 4.43: TEM-Aufnahmen einer HaCaT-Zelle, die eine hohe Anzahl an ehemaligen Silbernanoprismen enthält. Es sind keine Nanopartikel im Zellkern lokalisiert (s. Abbildung 4.43.1). Projektionen der Nanopartikel (schwarze Strukturen, durch gelbe Pfeile gekennzeichnet) können innerhalb der abgebildeten Zelle visualisiert werden (s. Abbildung 4.43.2). Die Nanopartikel sind in Endosomen/Lysosomen (orangefarbener Pfeil) lokalisiert (s. Abbildung 4.43.3). Die gepunkteten schwarzen Kästchen zeigen hierbei den Bereich, der in der nachfolgenden Abbildung (vgl. Abbildung 4.43.1 und Abbildung 4.43.2) mit höherer Vergrößerung dargestellt wird. Die Zellmembran wird mit einem grünen Pfeil, die Zellkernmembran mit einem magentafarbenen Pfeil gekennzeichnet.

Jedoch gibt es auch andere HaCaT-Zellen, die nur wenig oder keine ehemaligen Prismen aufgenommen haben. Zudem haben die ehemaligen Prismen $> 95\%$ des Volumens eingebüßt (vgl. Abbildung 4.27.1). Der Durchmesser der nun sphärischen Nanopartikel beträgt (7 ± 4) nm. Die Nanoprismen befinden sich innerhalb der Zellen ausschließlich in Vesikeln. Dabei kann bei den Vesikeln nicht zwischen frühen Endosomen ($\text{pH} \sim 6$), späten Endosomen ($\text{pH} \sim 5$ bis 6) und Lysosomen ($\text{pH} \sim 4.5$ bis 5) unterschieden werden.^[104] Daher werden im Folgenden die Vesikel als Endosomen/Lysosomen bezeichnet. Da die Freisetzung von Silberionen eine Funktion der Acidität ist,^[44] wird vermutet, dass innerhalb der Vesikel große Mengen an Silberionen freigesetzt

werden und es somit zur Abrundung der trigonalen Silbernanoprismen kommt. Liu et al. zeigten, dass sphärische, Citrat-stabilisierte Silbernanopartikel mit einem DLS-Durchmesser von (1.9 ± 0.5) nm bei pH=4 ca. 30%, bei pH=5 etwa 20%, bei pH=5.6 ungefähr 15% und bei pH=7.4 ca. 5% des Silbers innerhalb von 24 h ionisiert wird.^[44] In Kapitel 4.2.2 konnte gezeigt werden, dass trigonale Silbernanoprismen nach Lagerung für 24 h in isotonischer Kochsalzlösung und isotonischem Acetatpuffer einen Durchmesser von (16 ± 4) nm besitzen. Hierbei zeigt sich demnach, dass die trigonalen Silbernanoprismen innerhalb der Zellen stärker angelöst werden als in den Modellmedien (isotonische Kochsalzlösung und isotonischer Acetatpuffer). Der Grund hierfür kann sein, dass andere Substanzen innerhalb der Zellen (beispielsweise schwefelhaltige Aminosäuren und Dimere solcher Aminosäuren (L-Methionin und L-Cystein) oder Proteine zu einer stärkeren Auflösung führen, als die Modellmedien.

Anschließend werden die HaCaT-Zellen, die mit sphärischen Silbernanopartikeln mit einer Konzentration von 25 mg/L inkubiert wurden, mittels TEM untersucht: Die sphärischen Nanopartikel befinden sich ebenfalls in teilweise hoher Anzahl in HaCaT-Zellen und sind ausschließlich in Endosomen/Lysosomen mit einem Durchmesser von (13 ± 7) nm lokalisiert (s. Abbildung 4.44). Die sphärischen Nanopartikel bilden dabei dichtere Aggregate als die trigonalen Silbernanoprismen. In Kapitel 4.2.2 konnte gezeigt werden, dass sphärische Silbernanopartikel nach einer Lagerung von 24 h in Acetatpuffer (pH 4) einen TEM-Durchmesser von (16 ± 5) nm aufweisen. Folglich korreliert der Grad der Auflösung der sphärischen Silbernanopartikel mit der Auflösung der Partikel im Acetatpuffer (pH 4).

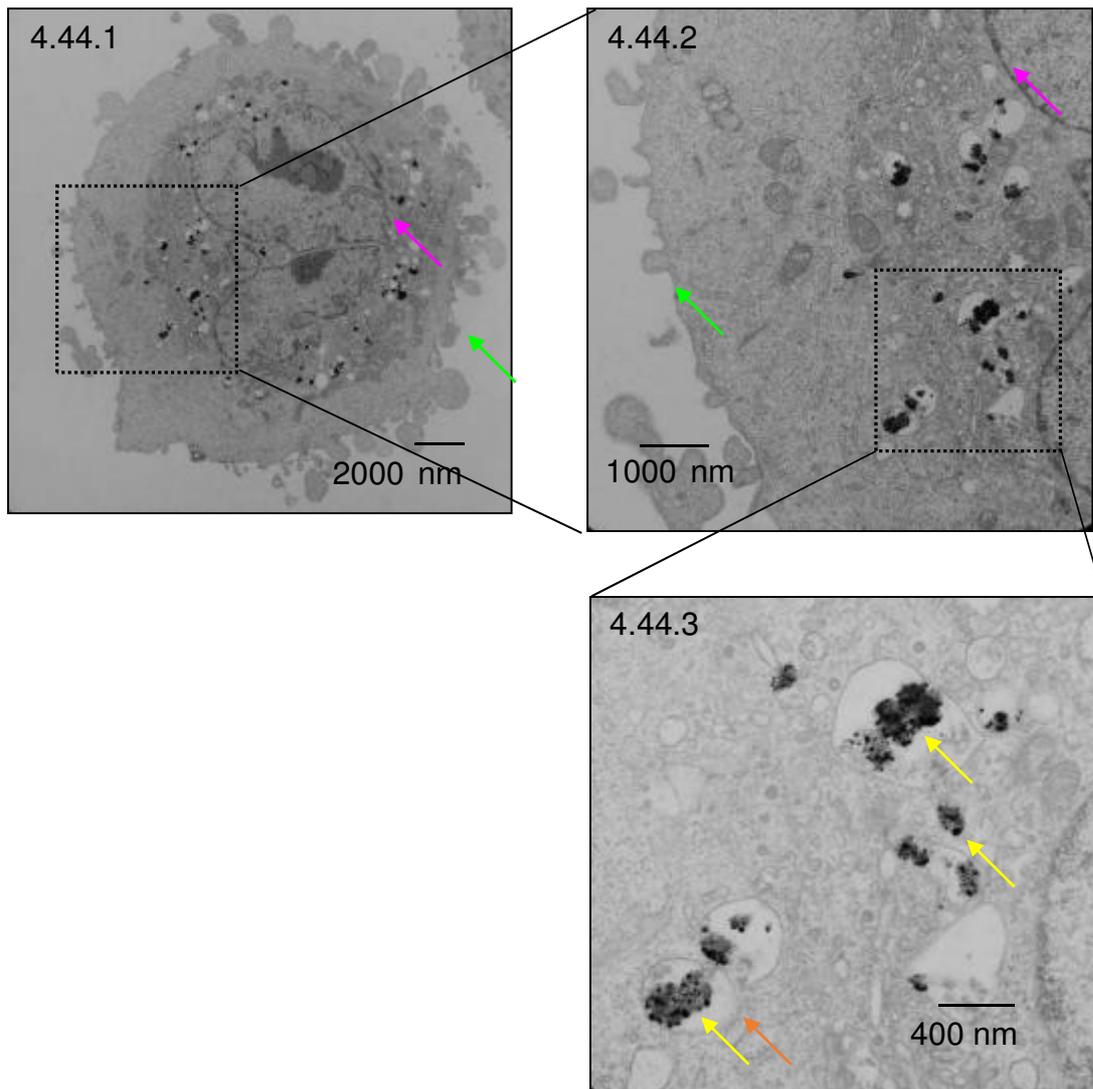


Abbildung 4.44: TEM-Aufnahmen einer HaCaT-Zelle, die angelöste Silbernanosphären enthält. Es sind keine Nanopartikel im Zellkern lokalisiert (s. Abbildung 4.44.1). Projektionen der Nanopartikel (schwarze Strukturen, durch gelbe Pfeile gekennzeichnet) können innerhalb der abgebildeten Zelle visualisiert werden (s. Abbildung 4.44.2). Die Nanopartikel sind in Endosomen/Lysosomen (orangefarbener Pfeil) lokalisiert (s. Abbildung 4.44.3). Die gepunkteten schwarzen Kästchen zeigen hierbei den Bereich, der in der nachfolgenden Abbildung (vgl. Abbildung 4.44.1/2/3) mit höherer Vergrößerung dargestellt wird. Die Zellmembran wird mit einem grünen Pfeil, die Zellkernmembran mit einem magentafarbenen Pfeil gekennzeichnet.

Beim Vergleich der HaCaT-Zellen, die mit Nanopartikeln inkubiert wurden, zu Kontrollzellen, zeigt sich, dass nach Inkubation der Nanopartikel mit Zellen, diese auf der Oberfläche Blasen aufweisen, während dies bei Kontrollzellen nicht der Fall ist (s. Abbildung 4.45). Die Bildung von Blasen an der Zellmembran ist ein Hinweis für akute Toxizität, sodass Zellen beginnen apoptotisch (programmierter Zelltod) zu werden.^[204] In den STXM-Aufnahmen konnte die Bildung von Blasen nicht beobachtet werden (s. Kapitel 4.2.3.1). Für die STXM werden Proben verwendet, die eine Dicke von 10 μm haben, während die Proben für die TEM eine Dicke von ca. 70 nm haben. Kleine Ver-

änderungen in der Zellmembran sind mittels STXM kaum abzubilden, da durch Gewebe, das über und unter den Bläschen liegt, der Kontrast kleiner Bläschen verringert wird.

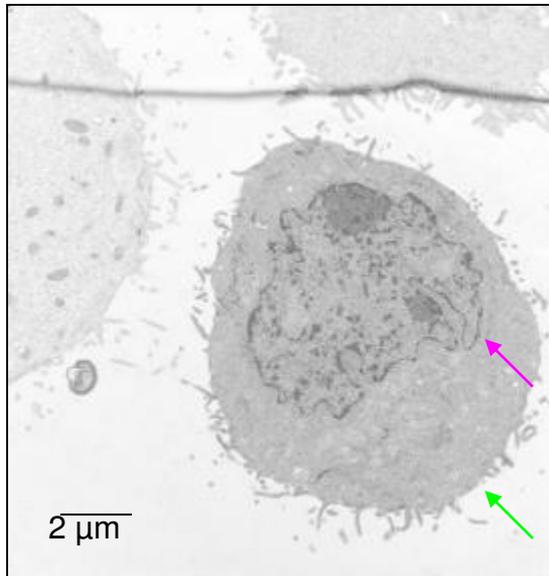


Abbildung 4.45: TEM-Aufnahmen einer HaCaT-Kontrollzelle, die nicht mit Nanopartikeln inkubiert wurde. Die Präparation von Kontrollzellen erfolgt analog zur Präparation zuvor genannter Zellen. Jedoch werden Kontrollzellen nicht mit Silbernanopartikeln inkubiert. Die Zellmembran wird mit einem grünen Pfeil, die Zellkernmembran ist mit einem magentafarbenen Pfeil gekennzeichnet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Inkubation von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie mit hMSC gezeigt:

Da hMSC eine größere räumliche Ausdehnung als HaCaT-Zellen haben und schneller konfluent (lückenlose Bedeckung eines Kulturgefäßes, die zu einer verminderten Zellteilungsrate aufgrund der Zellkontakthemmung führt) werden, reichte es aus, nur ca. 100,000 Zellen auszusähen. Daher wurde die Konzentration der inkubierten Nanopartikel auf 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingestellt. Folglich wurde die inkubierte Menge an Silber pro Zelle konstant zu dem Experiment mit HaCaT-Zellen gehalten. Die zuvor verwendeten HaCaT-Zellen (250,000 Zellen) wurden jeweils mit einer Silbernanopartikelkonzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inkubiert.

In einem weiteren Experiment werden etwa 100,000 hMSC mit Silberdispersionen einer Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inkubiert. Hierbei wurde folglich die inkubierte Konzentration an Silber in der Zell-Suspension nach Inkubation mit den Zellen zu dem Experiment mit HaCaT-Zellen konstant gehalten. Die inkubierte Silbermasse pro Zelle war jedoch um den Faktor 2.5 erhöht.

Nach Inkubation der hMSC mit trigonalen Silbernanoprismen werden diese ebenfalls mittels TEM untersucht (s. Abbildung 4.46).

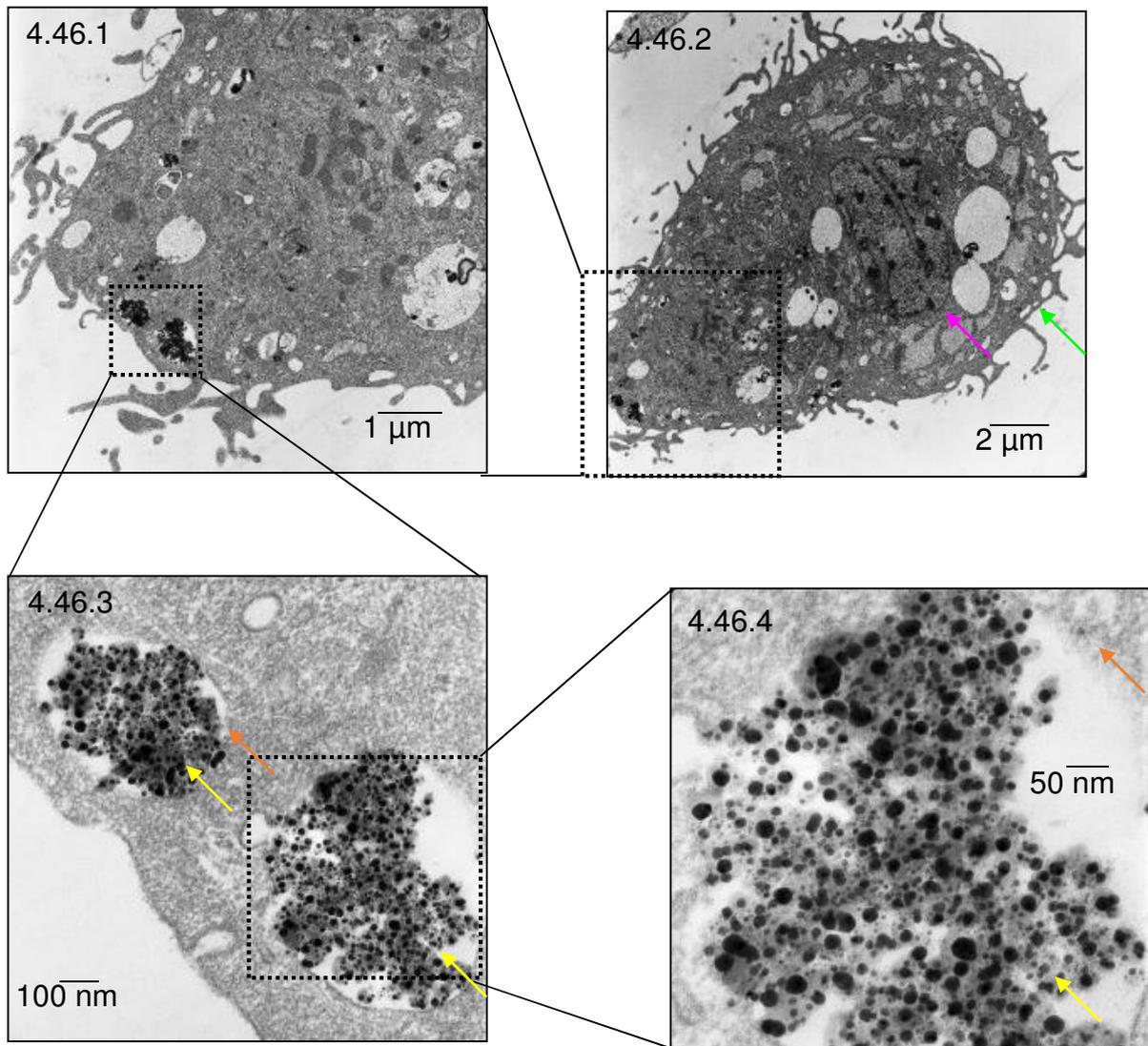


Abbildung 4.46: TEM-Aufnahmen von hMSC, die mit trigonalen Silbernanoprismen (10 mg/L) inkubiert wurden. Es sind keine Nanopartikel im Zellkern lokalisiert (s. Abbildung 4.46.2). Projektionen der Nanopartikel (schwarze Strukturen, durch gelbe Pfeile gekennzeichnet) können innerhalb der abgebildeten Zelle visualisiert werden (s. Abbildung 4.46.3/4). Die Nanopartikel sind in Endosomen/Lysosomen (orangefarbener Pfeile) lokalisiert (s. Abbildung 4.46.3/4). Die Zellmembran wird mit einem grünen Pfeil, die Zellkernmembran mit einem magentafarbenen Pfeil gekennzeichnet (s. Abbildung 4.46.2).

Dabei ist zu erkennen, dass deutlich mehr hMSC als HaCaT-Zellen ehemalige Nanoprismen beinhalten (vgl. Abbildung 4.49). Analog zu den HaCaT-Zellen sind die inkubierten Nanoprismen deutlich abgerundet und ebenfalls ausschließlich in Endosomen/Lysosomen lokalisiert.

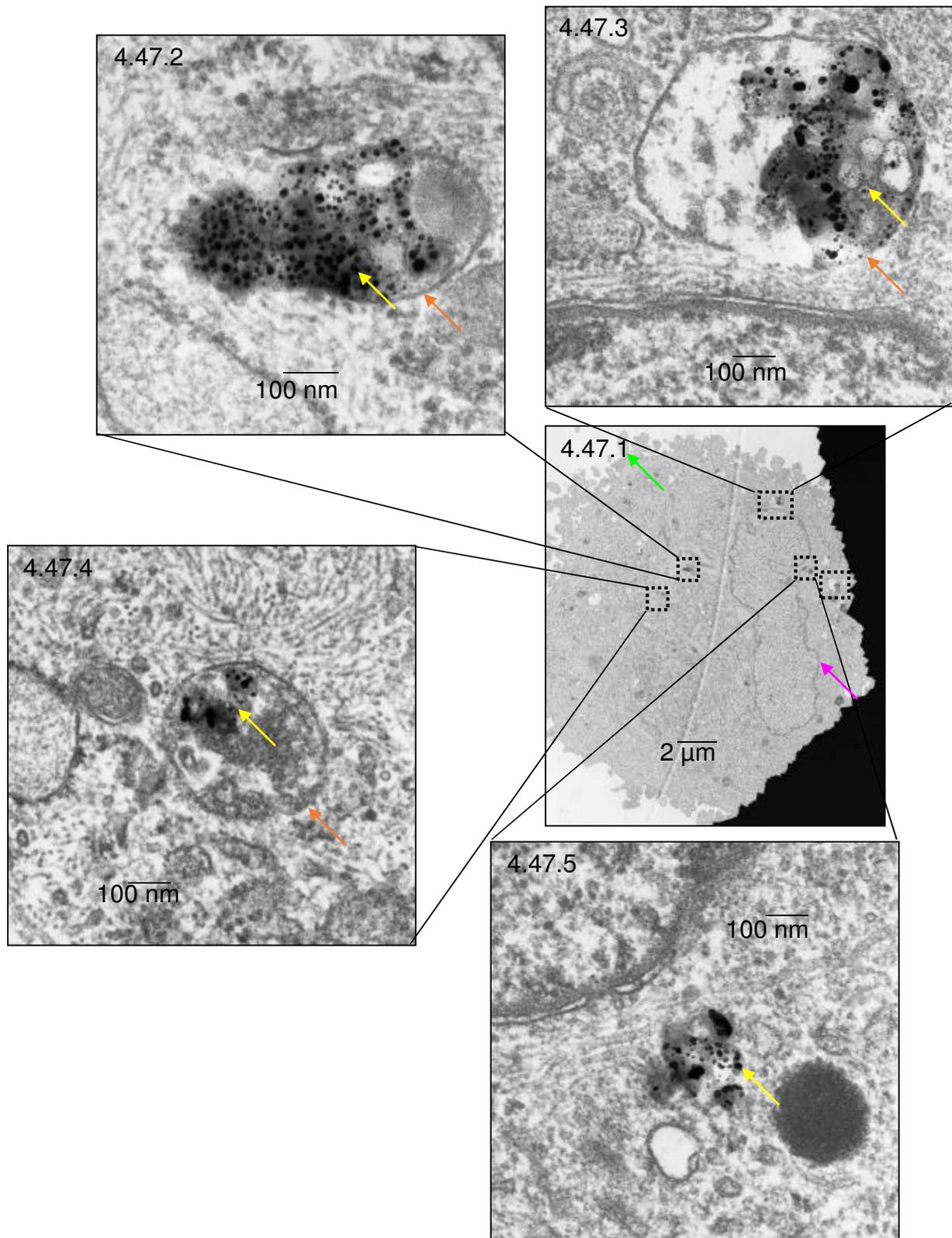


Abbildung 4.47: TEM-Aufnahmen von hMSC, die mit Silbernanosphären (10 mg/L) inkubiert wurden. Es sind keine Nanopartikel im Zellkern lokalisiert (s. Abbildung 4.47.1). Projektionen der Nanopartikel (schwarze Strukturen, durch gelbe Pfeile gekennzeichnet) können innerhalb der abgebildeten Zelle visualisiert werden (s. Abbildung 4.47.2/3/4/5). Die Nanopartikel sind in Endosomen/Lysosomen (orangefarbener Pfeile) lokalisiert (s. Abbildung 4.47.2/3/4). Die Zellmembran wird mit einem grünen Pfeil, die Zellkernmembran mit einem magentafarbenen Pfeil gekennzeichnet (s. Abbildung 4.47.1).

Die hMSC, die mit Silbernanosphären (10 mg/L) inkubiert wurden, haben deutlich weniger Nanopartikel aufgenommen als hMSC, die mit trigonal-prismatischen Silbernanopartikeln inkubiert wurden (vgl. Abbildung 4.46, Abbildung 4.47 und Abbildung 4.49). Darüber hinaus haben wiederum ca. 50% der Zellen Bläschen auf der Zelloberfläche. In keiner der analysierten Zellen (hMSC und HaCaT-Zellen) werden Nanopartikel im Zellkern gefunden.

Beim Vergleich mit Kontrollzellen (s. Abbildung 4.48 (exemplarische Darstellung einer Kontrollzelle)) ist zu erkennen, dass hMSC, die nicht mit Silbernanopartikeln inkubiert wurden keine Bläschen auf der Zelloberfläche aufweisen.

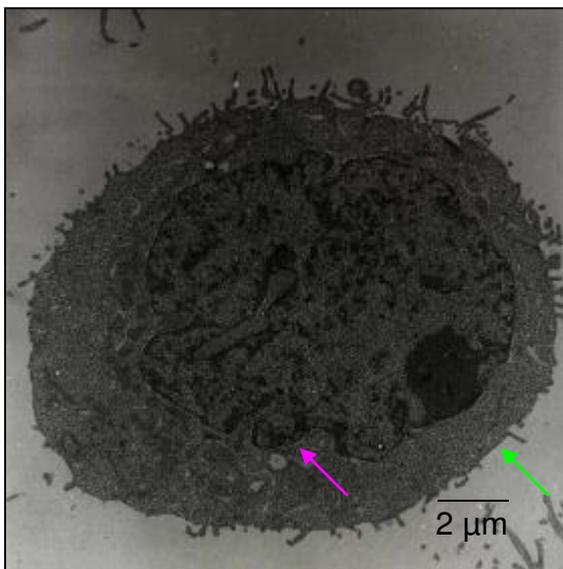


Abbildung 4.48: TEM-Aufnahmen einer hMSC Kontrollzelle, die nicht mit Nanopartikeln inkubiert wurde. Die Zellmembran wird mit einem grünen Pfeil, die Zellkernmembran mit einem magentafarbenen Pfeil gekennzeichnet.

Die Nanopartikelaufnahme trigonaler Silbernanoprismen und Silbernanosphären wurde anschließend semi-quantitativ bestimmt. Dazu werden jeweils 50 Zellen (HaCaT-Zellen bzw. hMSC) gezählt und bestimmt, ob Nanopartikel in den Zellen vorhanden sind. Dabei wurde nicht differenziert, ob eine Zelle viele oder wenige Nanopartikel aufgenommen hat. Hätte eine Zelle beispielsweise nur ein Nanopartikel aufgenommen, wäre dies als positives Ereignis gewertet worden.

Generell ist jedoch zu bemerken, dass Zellen selten wenige Nanopartikel aufnehmen. Entweder nehmen Zellen große Mengen (mindestens 50 Nanopartikel) oder keine Nanopartikel auf. Zudem werden mittels TEM nur einzelne Schnitte der Zellen abgebildet. Geht man von einem realistischen Durchmesser einer Zelle von etwa 10 μm aus, von der 70 nm dicke Schnitte angefertigt werden, so können pro Zelle etwa 143

Schnitte angefertigt werden. Dementsprechend enthalten viele der untersuchten Zellen hohe Konzentrationen an Silbernanopartikeln.

In Abbildung 4.49 sind die semi-quantitativen Daten der TEM-Auswertung dargestellt. Es wird deutlich, dass trigonale Silbernanoprismen in deutlich höheren Konzentrationen in hMSC als in HaCaT-Zellen aufgenommen werden. Im Verhältnis dazu werden Silbersphären von HaCaT-Zellen stärker als von hMSC aufgenommen. Dies gilt für identische Silber-zu-Zellkonzentrationen (vgl. hMSC (10 µg/mL) und HaCaT-Zellen (25 µg/mL)).

Zudem wird Silber aus dem Mischsystem (Konfetti-Nanopartikel (1:1-Mischung aus sphärischen und trigonal-prismatischen Nanopartikeln)) in HaCaT-Zellen in höherem Maße aufgenommen als Sphären und Prismen.

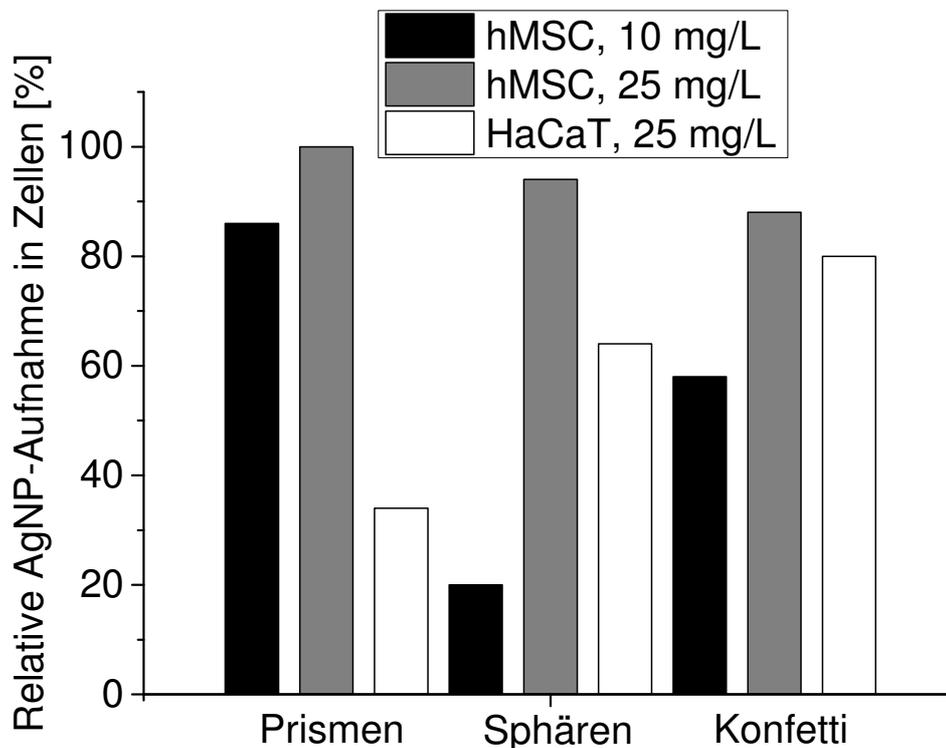


Abbildung 4.49: Semi-quantitative TEM-Auswertung der Nanopartikelaufnahme von trigonalen Prismen, Sphären und Konfetti-Nanopartikeln in hMSC mit einer Konzentration von 10 mg/L und 25 mg/L und HaCaT-Zellen mit einer Konzentration von 25 mg/L. Zu diesen Daten können keine Fehlergrenzen angegeben werden, da lediglich 50 Zellen pro Probe ausgezählt wurden.

Erstaunlich ist, dass HaCaT-Zellen sowie hMSC, die mit Prismen im Verhältnis zu Zellen die mit Sphären inkubiert wurden, Endosomen/Lysosomen mit einer größeren

räumlichen Ausdehnung aufweisen. Bezüglich der Prismen sind quantitativ unabhängig von der Zellsorte identisch viele Endosomen/Lysosomen in den Zellen enthalten. Bezüglich der Zellen, die mit Sphären inkubiert wurden, gibt es hingegen große Unterschiede in der Anzahl von Endosomen/Lysosomen, die Nanopartikel aufgenommen haben. So gibt es HaCaT-Zellen, die viele Endosomen/Lysosomen (ca. $N = 30$, s. Abbildung 4.44), die Nanopartikel enthalten, beinhalten. Darüber hinaus konnten HaCaT-Zellen mit deutlich weniger Endosomen/Lysosomen ($N = 2$, nicht abgebildet) gefunden werden. Die hMSC, die mit Sphären inkubiert wurden, beinhalten dahingegen (3 ± 2) Endosomen/Lysosomen pro Zelle. Die Daten sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst und werden weiter unten diskutiert.

Tabelle 4.9: Anzahl von Endosomen/Lysosomen pro Zelle und Durchmesser von Endosomen/Lysosomen in hMSC und HaCaT-Zellen. Es zeigt sich, dass der Durchmesser von Endosomen/Lysosomen, die Prismen aufgenommen haben deutlich vergrößert zu Endosomen/Lysosomen, die Sphären aufgenommen haben, ist. * : $N=3$ Zellen (2, 5 und 35 Endosomen pro Zelle die Nanopartikel enthalten)

Anzahl an Endosomen/Lysosomen pro Zelle				Durchmesser von Endosomen/Lysosomen [nm] in			
HaCaT		hMSC		HaCaT		hMSC	
Prismen	Sphären	Prismen	Sphären	Prismen	Sphären	Prismen	Sphären
6 ± 4	$14 \pm 18^*$	7 ± 4	3 ± 2	700 ± 500	330 ± 130	770 ± 170	490 ± 170

Der TEM-Durchmesser der Nanopartikel (Prismen wie Sphären) ist deutlich geschrumpft. Der Durchmesser der angelösten Prismen in HaCaT-Zellen und hMSC ist identisch. Der Durchmesser der angelösten Sphären in HaCaT-Zellen und hMSC ist ebenfalls identisch (s. Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10: Durchmesser der ehemaligen trigonalen Silbernanoprismen sowie der sphärischen Silbernanopartikel in HaCaT-Zellen und hMSC. Die Durchmesser der beiden Nanopartikelformen sind jeweils unabhängig von der Zellsorte, mit der sie inkubiert wurden, identisch geschrumpft.

Durchmesser Nanopartikel [nm] in			
HaCaT		hMSC	
Prismen	Sphären	Prismen	Sphären
7 ± 4	13 ± 7	9 ± 6	11 ± 7

In der folgenden Untersuchung wurden die Zellen (HaCaT-Zellen und hMSC), die mit den beiden Nanopartikelsystemen (trigonale Prismen und Sphären) inkubiert wurden, mit einer weiteren Methode (AAS) analysiert.

4.2.3.3. *Untersuchung der quantitativen Aufnahme von Silbernanopartikeln mittels AAS*

Zur Untersuchung der quantitativen Aufnahme von trigonal-prismatischen, sphärischen und Konfetti-Nanopartikeln wurden die mit Nanopartikeln inkubierten Zellen nach 24 h von nicht aufgenommenen Nanopartikeln befreit. Dazu wurden die Zellen zweimal für 7 min bei 493 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und der Rückstand jeweils in PBS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in Königswasser für 2 h im Ultraschallbad (860 W) aufgelöst, sodass mittels DLS keine signifikante Streuung festgestellt werden konnte. Somit wurde geschlussfolgert, dass sämtliche zellulären, subzellulären Strukturen und Silbernanopartikel aufgelöst wurden. Anschließend wurde das AAS mit Silberstandards im Bereich von 0 bis 3000 µg/L kalibriert (Korrelationskoeffizient 0.9995) und die Messlösungen, die die aufgelösten Zellen enthalten vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.50 dargestellt.

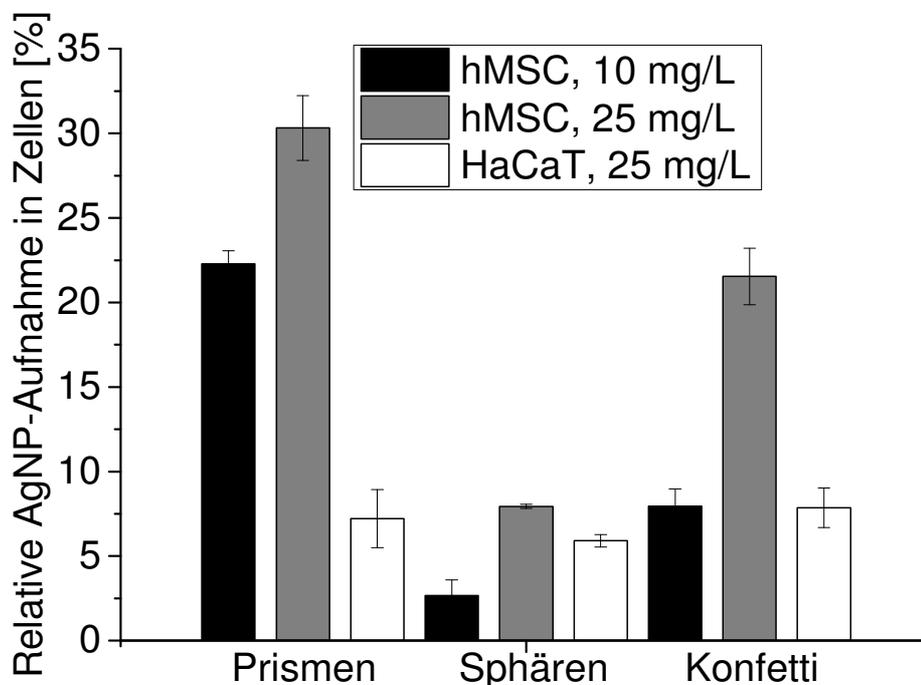


Abbildung 4.50: Quantitative AAS-Auswertung der Nanopartikelaufnahme von trigonalen Prismen und Sphären und Konfetti-Nanopartikeln in hMSC mit einer Konzentration von 10 mg/L und 25 mg/L und HaCaT-Zellen mit einer Konzentration von 25 mg/L.

Es kann mittels AAS beobachtet werden, dass hMSC, die mit einer Silberkonzentration von 25 mg/L inkubiert werden formunabhängig höhere Konzentrationen an Silber aufnehmen als hMSC, die mit einer Silberkonzentration von 10 mg/L inkubiert werden. hMSC (10 mg/L) und HaCaT-Zellen (25 mg/L), die mit der identischen Silberkonzentration pro Zelle inkubiert werden, zeigen eine verschiedene formabhängige Aufnahme der Nanopartikel: hMSC (10 mg/L) nehmen 3.0 ± 0.8 Mal mehr Silber von prismatischen Nanopartikeln auf als HaCaT-Zellen. Dahingegen nehmen HaCaT-Zellen gegenüber hMSC (10 mg/L) 2.2 ± 0.8 Mal mehr Silber aus sphärischen Nanopartikeln auf. Die hMSC (10 mg/L und 25 mg/L) nehmen mit einem Faktor von 8.4 ± 3.0 respektive 3.8 ± 0.1 mehr Silber aus trigonalen Silbernanoprismen auf als aus sphärischen Teilchen. Die Aufnahme von Silbernanopartikeln verschiedener Morphologie in HaCaT-Zellen ist nicht signifikant verschieden. Dabei wird deutlich, dass die Daten aus der AAS-Auswertung mit den Daten aus der TEM-Auswertung korrelieren (vgl. Abbildung 4.49 und Abbildung 4.50).

Die Nanopartikelaufnahme in Zellen muss als Funktion von verschiedenen Parametern, wie zum Beispiel Material der Nanopartikelkerne, Oberflächenfunktionalisierung, Zeta-Potential, Form der Nanopartikel, Gravitation (Sedimentation) der Nanopartikel^[205] und Oberflächenkontaktfläche^[206] der Nanopartikel betrachtet werden.

Dabei ist das Material der Nanopartikelkerne (Silber) identisch, die Oberflächenfunktionalisierung (Prismen: Citrat und PVP, Sphären: PVP) vergleichbar und das Zeta-Potential (Prismen: $-(29 \pm 1)$ mV, Sphären: ca. -30 mV) identisch. Die Kraft des Schwerfeldes der Erde auf die Nanosphären beträgt etwa $1.9 \cdot 10^{-17}$ N und auf die Prismen ca. $6.3 \cdot 10^{-19}$ N. Dabei wurde angenommen, dass die Prismen sich wie Sphären im Gravitationsfeld verhalten. Jedoch ist in der Interaktionszone zwischen Zelle und Nanopartikel, die Gravitationskraft vernachlässigbar klein im Verhältnis der Kräfte, die aufgrund von spezifischer und nicht-spezifischer Bindung (10^{-12} N bis 10^{-9} N) wirken.^{[205],[207]}

Des Weiteren ist die Form der Nanopartikel verschieden. Die Oberflächenkontaktfläche der Nanoprismen ist abhängig von der Art der Konfiguration der Prismen während der Aufnahme der Nanopartikel in Zellen. Die Kontaktfläche der sphärischen Nanopartikel ist unabhängig von der Konfiguration. Bezüglich der trigonalen Silbernanoprismen sind drei Grenzfälle der Konfiguration der Nanoprismen-Aufnahme in HaCaT-Zellen und hMSC möglich. Dabei ist es möglich, dass eine der Dreiecksflächen, eine der Rechtecksflächen oder eine der Ecken der trigonalen Silbernanoprismen senkrecht zur Zelle angreift (s. Abbildung 4.51).

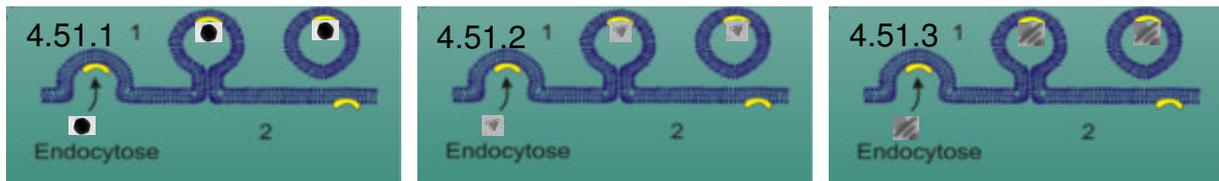


Abbildung 4.51: Mögliche Konfiguration der Aufnahme von Sphären (s. Abbildung 4.51.1) und trigonalen Prismen (Abbildung 4.51.2 und Abbildung 4.51.3). 1: Intrazellulärer Raum, 2: Extrazellulärer Raum.^[74]

Eine mögliche Erklärung der erhöhten Aufnahme von anisotropen Nanopartikeln im Verhältnis zu isotropen Nanopartikeln ist die vergrößerte Kontaktfläche (Faktor 4.6 ± 1.5) der anisotropen Partikel. Diese könnte zu multivalenten Wechselwirkungen mit der Zellmembran führen. Somit würden Adhäsionskräfte verstärkt und die Nanopartikelaufnahme begünstigt. Bezüglich sphärischer Nanopartikel sind diese Effekte aufgrund der verringerten Kontaktfläche unabhängig von der Nanopartikelgröße minimal.

Agarwall et al. betrachten die sogenannte Verzerrungsenergie (engl.: *curvature energy* oder *strain energy*), die eine Membran aufbringen muss, um mit Nanopartikeln wechselzuwirken. Diese liegt bei sphärischen Nanopartikeln niedriger als bei anisotropen Nanopartikeln. Jedoch ist anhand der TEM-Aufnahmen erkennbar, dass unabhängig von der Zellsorte große Anzahlen von Prismen in wenigen Vesikeln vorhanden sind (s. Abbildung 4.43 und Abbildung 4.46). Wenige Sphären sind hingegen in vielen Vesikeln vorhanden (s. Abbildung 4.44 und Abbildung 4.47). Dies bedeutet wiederum, dass die Aufnahme von Sphären nur durch eine stärkere Krümmung der Membran und damit nur mit einem größeren energetischen Aufwand ermöglicht wird.

Um zu verstehen, wieso hMSC eine höhere Konzentration an Prismen, HaCaT-Zellen eine nicht-signifikant höhere Konzentration an Sphären aufgenommen haben, muss untersucht werden, welches die bedeutenden Unterschiede der Membranen in den untersuchten Zellen sind.

Es ist bekannt, dass die Biegesteifigkeit von Zellen, die Interaktion mit Materien im Exoplasma bestimmt.^[208] Es wird daher vermutet, dass die Biegesteifigkeit der Zellen eine entscheidende Rolle bei der Diskriminierung der Nanopartikelaufnahme spielt. HaCaT-Zellen haben eine Biegesteifigkeit (Young Modul) von ca. 0.1 MPa ^[87], während hMSC eine Biegesteifigkeit (Young Modul) von ca. 10^{-4} MPa besitzen.^[88] Die trigonalprismatische Morphologie scheint die Aufnahme in Zellen mit geringerer Biegesteifigkeit wie hMSC gegenüber Sphären zu begünstigen. Aufgrund der erhöhten Elastizität

kann es zu einer Erhöhung der Adhäsionsenergie der Prismen kommen, da die Verformung der Membran weniger Energie bedarf. Daher liefert die anisotrope Form der trigonalen Silbernanoprismen für die erhöhte Silberaufnahme, die mittels TEM und AAS gezeigt wurde, einen Beitrag. Zudem kann es aufgrund der Citrat-Funktionalisierung von Nanopartikeln zu einer erhöhten Aufnahme im Zuge einer Absenkung der Viabilität der Zellen kommen (s. Kapitel 4.1.3.6).^[81] Jedoch konnte anhand der TEM- und STXM-Aufnahmen nicht gezeigt werden, dass Zellen, die mit trigonalen Silbernanoprismen inkubiert wurden, stärker geschädigt sind als Zellen, die mit sphärischen Silbernanopartikel inkubiert wurden. Anhand des identischen Zeta-Potentials der trigonalen Silbernanoprismen und der Sphären (beide ca. -30 mV) im Vergleich zu den Citrat-funktionalisierten Goldnanopartikeln (ca. -50 mV, s. Kapitel 4.1.2) kann ebenfalls gezeigt werden, dass an der Grenzfläche der trigonalen Silbernanoprismen PVP und nicht Citrat lokalisiert ist. Hierbei ummantelt PVP die Nanopartikel und ist somit für die Stabilität der Nanopartikel verantwortlich.^[50] Citrat scheint folglich zu einem Zeta-Potential von -50 mV zu führen, während PVP zu einem Zeta-Potential von -30 mV führt. Daher wird vermutet, dass der Beitrag, den Citrat an der erhöhten Aufnahme der trigonalen Prismen hat, vernachlässigbar gering ist. Betrachtet man die hMSC, die mit verschiedenen Konzentrationen an Silbernanoprismen inkubiert wurden, fällt auf, dass der erhöhte Faktor der eingesetzten Silberkonzentration sich nicht in der Silberkonzentration pro Zelle wiederfinden lässt, da die hMSC (25 mg/L) in der AAS nur mit einem Faktor von 1.4 ± 0.1 mehr Silber aufnahm als hMSC (10 mg/L). Die hMSC, die mit verschiedenen Konzentrationen (10 mg/L und 25 mg/L) an sphärischen Silbernanopartikeln inkubiert wurden, nehmen bezüglich der hohen Konzentration mit einem Faktor von 3 ± 1 mehr Silber auf als bezüglich der geringen Konzentration. Folglich nehmen die in dieser Studie verwendeten hMSC nicht proportional zur eingesetzten Silberkonzentration der Prismen Silber auf. Auch dieser Effekt kann energetisch erklärt werden: Da die Zelle viel Energie benötigt, um große Mengen an Silbernanoprismen aufzunehmen, wird die Menge an aufgenommenem Silber nicht proportional durch Erhöhung der eingesetzten Konzentration erhöht, sondern ist geringer. Bei Sphären ist dies anders: Da Sphären in geringerem Maße aufgenommen werden, wird bei Konzentrationserhöhung der inkubierten Sphären etwa proportional viel Silber in den Zellen gefunden. Betrachtet man die Aufnahme von Konfettinopartikeln in die verschiedenen Zellsysteme, wurde vor der Untersuchung erwartet, dass das Mischsystem folgend aufgenommen wird:

$$(Konfetti@Zelle)_{erw} = \left(\frac{(Prismen@Zelle)_{real}}{2} + \frac{(Sphären@Zelle)_{real}}{2} \right) \quad (4.10)$$

Wobei $(Konfetti@Zelle)_{erw}$ als erwartete Aufnahme von Konfetti-Nanopartikeln in Zellen, $\frac{(Prismen@Zelle)_{real}}{2}$ als 50% der realen Aufnahme von Prismen in Zellen und $\frac{(Sphären@Zelle)_{real}}{2}$ als 50% der realen Aufnahme von Sphären in Zellen definiert sind. Es ergeben sich für die Aufnahme von Konfettinanopartikeln in die verschiedenen Zellsysteme andere Werte als erwartet:

Es wurde erwartet, dass die Silber-Aufnahme in hMSC, die mit Konfetti-Nanopartikeln (10 mg/L) inkubiert wurden, der addierten, halbierten Silberkonzentrationen der Prismen und Sphären in Zellen ((12.5±1.8)%) entspricht. Jedoch wurden nur (8.0±1.1)% des eingesetzten Silbers aufgenommen. Dies entspricht einer prozentualen Aufnahme im Verhältnis zum erwarteten Wert von (64±13)%.

Bei den Zellen, die mit höheren Konzentrationen inkubiert wurden, beträgt die prozentuale Aufnahme im Verhältnis zum erwarteten Wert (120±20)% (HaCaT, 25 mg/L) bzw. (110±10)% (hMSC, 25 mg/L). Für die hohen Silberkonzentrationen (25 mg/L) ist der erwartete Wert unabhängig vom Zellsystem im Verhältnis zum realen Wert identisch. Für die niedrige Silberkonzentration (hMSC, 10 mg/L) ist der erwartete Wert verträglich mit dem realen Wert. Es ist möglich, dass eine kritische Konzentration an Prismen vorhanden sein muss, damit Zellen diese in höherer Quantität aufnehmen. Dies veranschaulicht nochmals, dass die Aufnahme von Nanopartikeln nicht proportional zur eingesetzten Silberkonzentration erfolgt.^[209]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels STXM wenige trigonale Silbernanoprismen in HaCaT-Zellen sowie in hMSC nachgewiesen werden konnten. Die Lokalisation von einigen sphärischen Silbernanopartikel in HaCaT-Zellen und von zahlreichen Silbernanokugeln in hMSC konnte hingegen mittels STXM visualisiert werden. Im TEM zeigt sich, dass die Sphären deutlich dichtere und aggregierte Strukturen bilden als die Prismen. Zudem kann im TEM gezeigt werden, dass die trigonalen Silbernanoprismen nach Aufnahme in die Zellen kleiner sind als die sphärischen Analoga. Folglich ist es möglich, dass die starke Anlösung der trigonalen Silbernanoprismen im Verhältnis zu den sphärischen Analoga dazu führt, dass diese mittels STXM nicht in

Zellen nachgewiesen werden können, obwohl sich die angelösten Nanoprismen in den HaCaT-Zellen und hMSC befinden.

Mittels TEM und AAS konnte nachgewiesen werden, dass die trigonal-prismatischen Silbernanopartikel in deutlich höherer Quantität in hMSC aufgenommen werden, während die Sphären bevorzugt von den HaCaT-Zellen aufgenommen werden.

4.3. Aufnahme von aminofunktionalisierten Silicananopartikeln in humane ex vivo-Haut

Die Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln über die Haut ist von großem Interesse, da die Haut neben dem Darm und der Lunge eine der Haupteingangsrouten für fremde Substanzen ist. Hierzu wurde untersucht wie Nanopartikel beschaffen sein müssen, um mit dem gewählten Analyseverfahren, der TEM, detektiert werden zu können. Nanopartikel sind heutzutage in vielen kommerziellen Produkten (Nahrungsmitteln, Textilien, Kosmetika) enthalten.^[13] Zahlreiche Studien zur Aufnahme von Nanopartikeln von intakter Haut zeigen eine limitierte Aufnahme in diejenige Hautareale, die unter der Hauptbarriere der Haut, dem *Stratum corneum*, liegen.^{[90],[91],[92]}

Labouta et al. zeigten jedoch die Aufnahme von Goldnanopartikeln mit verschiedenen funktionellen Gruppen mit einem Durchmesser von 6 und 15 nm in native Humanhaut in eine Tiefe von ca. 60 µm. Jedoch verwendeten die Autoren, ähnlich wie andere Autoren,^[210] Humanhaut die zuvor eingefroren wurde, deren Barriere jedoch durch den Einfrierprozess an Effizienz verloren hat. Bronaugh et al. belegten, dass aufgetaute Haut eine ineffizientere Barriere aufweist als native Haut.^[211] Aus diesem Grund wird native *ex vivo* Haut, als intakte Haut mit effizienter Barriere gegenüber Nanopartikeln betrachtet.

Die Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln in Haut, deren Barriere gestört ist, erscheint dennoch als notwendig, da viele Menschen Nanopartikel-haltige Kosmetika, Cremes und Textilien verwenden, auch wenn ihre Haut leichte Verletzungen aufweist.^[4] In zahlreichen Studien wird die Nanopartikelaufnahme in Haut analysiert:

Rancan et al. zeigten, dass Silicananopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 110 nm in humane Haut, deren *Stratum corneum* gestört ist, über Haarfollikel bis in eine Tiefe von ca. 150 µm aufgenommen werden.^[13] Ryman-Rasmussen et al. veranschaulichten eine Aufnahme von PEG-funktionalisierten Quantenpunkten mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 45 nm in native Schweinehaut in eine Tiefe von etwa 100 µm.^[93] Dabei verwenden die Autoren eine Durchflusszelle, um möglichst reale physiologische Bedingungen zu schaffen. In zahlreichen Publikationen wird als Modell für die Haut des Menschen, die Verwendung von Haut von Haussäugetieren beschrieben. Dabei sollte beachtet werden, dass ausschließlich das Deutsche Edelschwein und Göttinger Miniaturschwein als Struktur- und Funktionsmodell für humane Haut dienen kann.^[212] Besonders die Epidermis dieser Tiere

zeigen im Aufbau, Biochemismus und grundlegenden stoffwechselphysiologischen Vorgängen deutliche Parallelen zu humaner Haut.^[212]

Generell sind die Haut des Menschen und des Schweins jedoch nicht identisch. Zum Beispiel treten beim Schwein Langerhans-Zellen innerhalb der Epidermis in deutlich geringerer Population auf und sind abgerundet. Zudem sind die pH-Werte der Haut unterschiedlich (Mensch: pH=5, Schwein pH~6-7).^[212] Somit lassen Ergebnisse bezüglich der Aufnahme von Nanopartikeln in Schweinehaut nur bedingt Rückschlüsse zur Aufnahme in humane Haut zu. Die Verwendung von humaner Haut ist gegenüber Schweinehaut daher zu bevorzugen.

In zahlreichen Studien wird die Nanopartikelaufnahme in tiefere Hautschichten dokumentiert, wenn das *Stratum corneum* zuvor gestört wurde.^[97] Dabei gibt es einige Möglichkeiten das *Stratum corneum* zu stören, beispielsweise durch Abziehen von transparentem Polyethylen-Klebeband (z.B. Tesa-Film®),^[13] Pricken mit Lanzette-Mikronadeln^[98] und UV-Bestrahlung^[99].

Zur Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln in humane Haut werden in der Literatur verschiedene Analyseverfahren verwendet. Die TEM spielt hierbei eine eher untergeordnete Rolle. Besonders positiv ist jedoch die hohe Auflösung bis in den Sub-Ångström-Bereich,^[172] die andere Analyseverfahren, wie konfokale Mikroskopie nicht besitzen. In zahlreichen Studien wird die konfokale Mikroskopie zur Untersuchung von Haut verwendet.^{[13],[93],[99],[213],[76]} Graf et al. verwenden die Fluoreszenzmikroskopie und STXM zur Untersuchung von Hautproben, die mit Nanopartikeln inkubiert wurden.^[91] In der folgenden Untersuchung wurde als Analyseverfahren die TEM verwendet. Hierbei sind Aufnahmen mit Auflösungen bis zu unter 1 nm möglich, sodass die Nanopartikel identifiziert und lokalisiert werden können.

4.3.1. Synthese und Charakterisierung von AHAPS-funktionalisierten SiO₂ Nanopartikeln

Zur Darstellung von fluoreszierenden Silicananopartikeln ist eine vorherige Synthese des Farbstoffkopplungsprodukts (FITC-APS, s. Abbildung 4.1) notwendig. Die Synthese und die Charakterisierung des Farbstoffkopplungsprodukts erfolgt analog zu Kapitel 4.1.1.

Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte Silicananopartikel werden nach dem modifizierten Stöberwachstum dargestellt.^[145] Die resultierenden fluoreszierenden Silicananokerne werden mit einer farbstofffreien Silicaschale mittels Kern-Schale-Wachstum analog zum Stöberwachstum ummantelt (s. Kapitel 3.2.2).^[68, 159]

Anschließend werden die synthetisierten fluoreszierenden Silicananopartikel mit farbstofffreier Silicaschale mit N-(6-Aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan (AHAPS) funktionalisiert, sodass die Nanopartikel ein positives Zeta-Potential besitzen (s. Tabelle 4.11). Nach erfolgter Aufreinigung der Nanopartikel werden diese mittels TEM, DLS und ELS charakterisiert (s. Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11: Charakterisierungsdaten zu Silicananopartikeln mit AHAPS-Funktionalisierung.

TEM-Durchmesser [nm]	DLS-Durchmesser [nm] in		Zeta-Potential [mV] in Wasser für Injektionszwecke
	Ethanol	Wasser für Injektionszwecke	
(55±6)	(115±1)	(135±1)	+(37±2)

Der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel ist etwa doppelt so groß, wie der Durchmesser, der durch die TEM erhalten wird. Tomaszewska et al. untersuchten eine Dispersion, deren Nanopartikel aus 1% großer Nanopartikel ($d = 55$ nm) und 99% kleiner Nanopartikel ($d = 10$ nm) besteht. Hierbei zeigte sich, dass die untersuchte Dispersion in der DLS eine ca. drei Mal höhere Intensität für die großen Nanopartikel hat als für die kleinen Nanopartikel, obwohl die großen Nanopartikel in deutlich geringerer Quantität vorliegen. Dies ist darauf zurückzuführen, da in die Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers der Radius der Nanopartikel mit der sechsten Potenz eingeht.^[168] Daher wird vermutet, dass die AHAPS-funktionalisierten Silicananopartikel zu einem sehr geringen Teil (etwa 1%) aggregiert vorliegen.

Anhand der vorliegenden Studie kann gezeigt werden, dass mittels TEM-Aufnahmen geschlussfolgert werden kann, ob die Haut viabel ist, wo die Nanopartikel exakt in der Haut lokalisiert sind, ob es zu Veränderungen der Nanopartikel und der Haut nach Inkubation gekommen ist und wie die Mikroumgebung der Nanopartikel in der Haut ist. Mittels TEM kann zudem gezeigt werden, wie stark die Haut geschädigt wird. Diese Information ist notwendig, da mit einer Hautschädigung, die quantitative Aufnahme von Nanopartikeln erhöht werden kann.

Nach erfolgter Probenpräparation können die TEM-Proben über Jahre gelagert und mittels TEM jederzeit weiter analysiert werden. Nachteile der konventionellen TEM sind, dass Proben zunächst fixiert, eingebettet, mit aufsteigender Ethanolkonzentration entwässert und anschließend in Kunststoff eingebettet werden müssen. Bei dieser etablierten Prozedur können während des Waschprozesses die Nanopartikel aus dem extrazellulären Bereich gewaschen werden. Da das Herauswaschen von Nanopartikeln, die innerhalb der Haut lokalisiert sind nicht erwünscht ist, wurden die Nanopartikel aminofunktionalisiert. Es konnte die sofortige Quervernetzung der aminofunktionalisierten Silicananopartikel mit den zur Fixierung verwendeten Aldehyden mittels DLS nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.52).

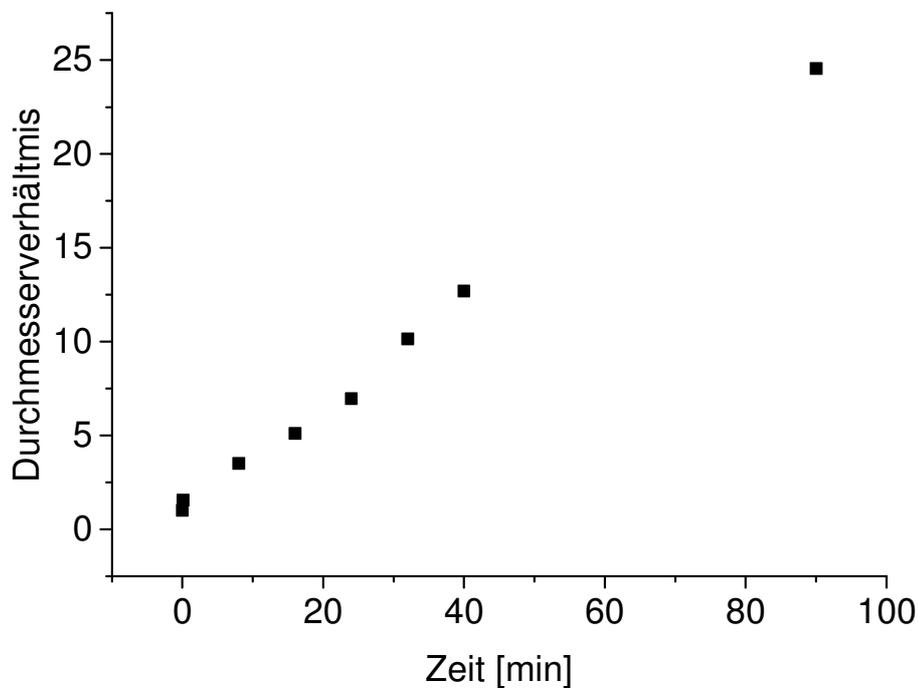


Abbildung 4.52: Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers in Abhängigkeit der Zeit bei der chemischen Fixierung von AHAPS-funktionalisierten Silicananopartikeln mit Glutaraldehyd und Paraformaldehyd. Hierbei ist das Durchmesserverhältnis das Verhältnis des zeitabhängigen Durchmessers normiert auf den Anfangsdurchmesser bei $t = 0$ min. Die Messungen erfolgten mittels DLS.

Um das Auswaschen der Nanopartikel aus der Haut zu verhindern, werden daher im Folgenden aminofunktionalisierte Silicananopartikel (s. Kapitel 3.2.2.5) verwendet, bei denen analog zu Abbildung 4.52 geschlussfolgert wird, dass sie während der Fixierung der Haut mit den verwendeten Aldehyden (Paraformaldehyd und Glutaraldehyd) vernetzen und innerhalb der Haut fixiert werden.

Zudem sollte in dieser Studie herausgefunden werden, bis in welche Schichten der Haut Nanopartikel penetrieren können. Dazu wird erstens humane *ex vivo*-Haut, deren *Stratum corneum* gestört ist und zweitens nicht gestörte humane *ex vivo*-Haut verwendet.

4.3.2. Untersuchung der Aufnahme von AHAPS-funktionalisierten SiO₂ Nanopartikeln in humane *ex vivo*-Haut

In Abbildung 4.53.1 ist humane *ex vivo*-Haut, die für nachfolgende Experimente verwendet wurde, abgebildet.

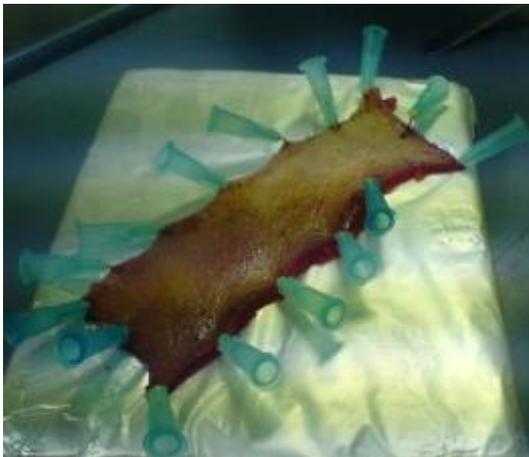


Abbildung 4.53: Fotografische Aufnahme von nativer *ex vivo* Haut

Die Nanopartikel werden nach erfolgter Charakterisierung mit geprickter und nicht geprickter humaner *ex vivo*-Haut inkubiert. Geprickte Haut soll dabei als Hautmodell fungieren, deren oberste Barriere (*Stratum corneum*) mechanisch gestört ist. Dazu wird jeweils 1 cm² humane Haut äquidistant mit 100 Nadelstichen einer Lanzette-Mikronadel versehen. Dabei wird ausschließlich das *Stratum corneum* der Haut verletzt. Es wird ausgeschlossen, dass die Basalmembran der Haut verletzt wird. Anschließend wird die Dispersion, die die Nanopartikel enthält, auf die Haut gegeben, die Haut fixiert (s. Anhang B), eingebettet (s. Anhang C), ultradünne Schnitte (Schnittdicke 60 - 80 nm) angefertigt und mittels TEM abgebildet.

Es ist in Abbildung 4.54 zu erkennen, dass zahlreiche Nanopartikel im Bereich der Prickstelle in der Nähe des *Stratum corneums* lokalisiert sind. Zudem sind einige Nanopartikel in einiger Entfernung unterhalb der Prickstelle innerhalb und außerhalb von Vesikeln lokalisiert.

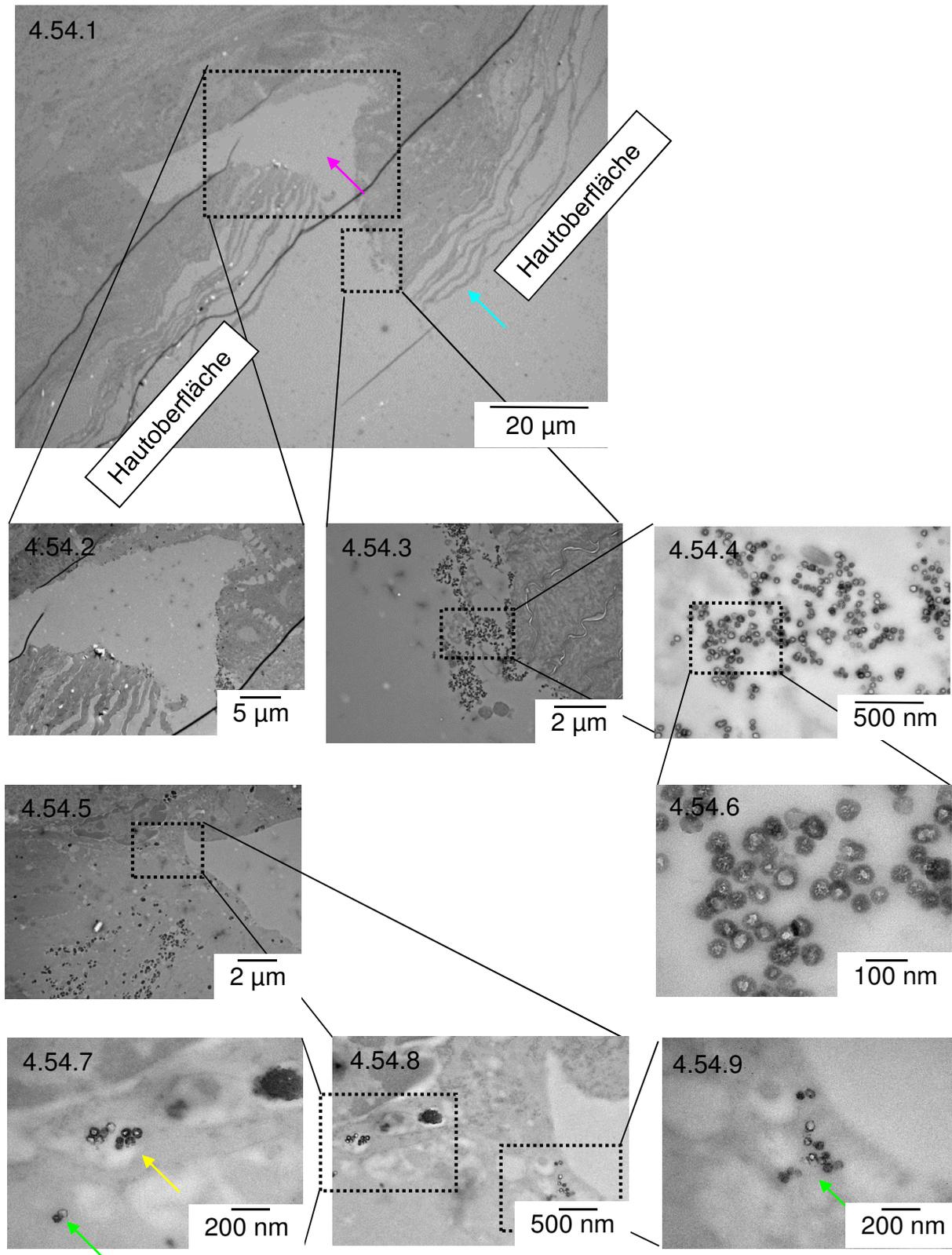


Abbildung 4.54: TEM-Aufnahmen von geprickter humaner *ex vivo*-Haut, die mit AHAPS-funktionalisierten Silicananopartikeln inkubiert wurde. In der Übersichtsaufnahme (s. Abbildung 4.54.1) ist die Prickstelle (magentafarbener Pfeil) zu erkennen, die die Barriere des *Stratum corneums* (türkisfarbener Pfeil) öffnet. Dabei sind in der Nähe des *Stratum corneums* zahlreiche Nanopartikel zu erkennen (s. Abbildung 4.54.3/4/6). Unterhalb der Prickstelle sind ebenfalls einige Nanopartikel zu erkennen (s. Abbildung 4.54.8). Die Nanopartikel sind innerhalb von Vesikeln (s. Abbildung 4.54.7, mit einem gelbem Pfeil gekennzeichnet) und außerhalb von Vesikeln (s. Abbildung 4.54.7/9, jeweils mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet) lokalisiert.

Die abgebildeten Nanopartikel erscheinen innen hohl, da Silica ein sprödes Material ist (Mohssche Härte = 7)^[214] und es beim Schneideprozess, auf Grund der mangelnden inneren Stabilität, aus dem Schnitt brechen kann. Erstaunlich ist, dass die Nanopartikel innen hohl erscheinen und außen eine elektronenabsorbierende Struktur aufweisen. Fraglich ist, wieso die Größen der Projektionsflächen der Nanopartikel eng verteilt sind. Daher wird die wahrscheinlichste Projektionsfläche eines statistischen Nanopartikels mit einem realen TEM-Durchmesser von (55 ± 6) nm (s. Tabelle 4.11) mit einer durchschnittlichen Schnittdicke der Haut von 70 nm bestimmt. Diese wahrscheinlichste Projektionsfläche beträgt $(85 \pm 26)\%$ des Flächeninhalts der Projektionsfläche eines ursprünglichen Nanopartikels. Somit beträgt der wahrscheinlichste gefundene Projektionsdurchmesser (50 ± 9) nm. Dies erklärt die relativ geringe Polydispersität der Projektionsflächen der Nanopartikel innerhalb der Haut. Anschließend werden Hautschnitte, die tiefer innerhalb der Haut liegen mittels TEM abgebildet (s. Abbildung 4.55).

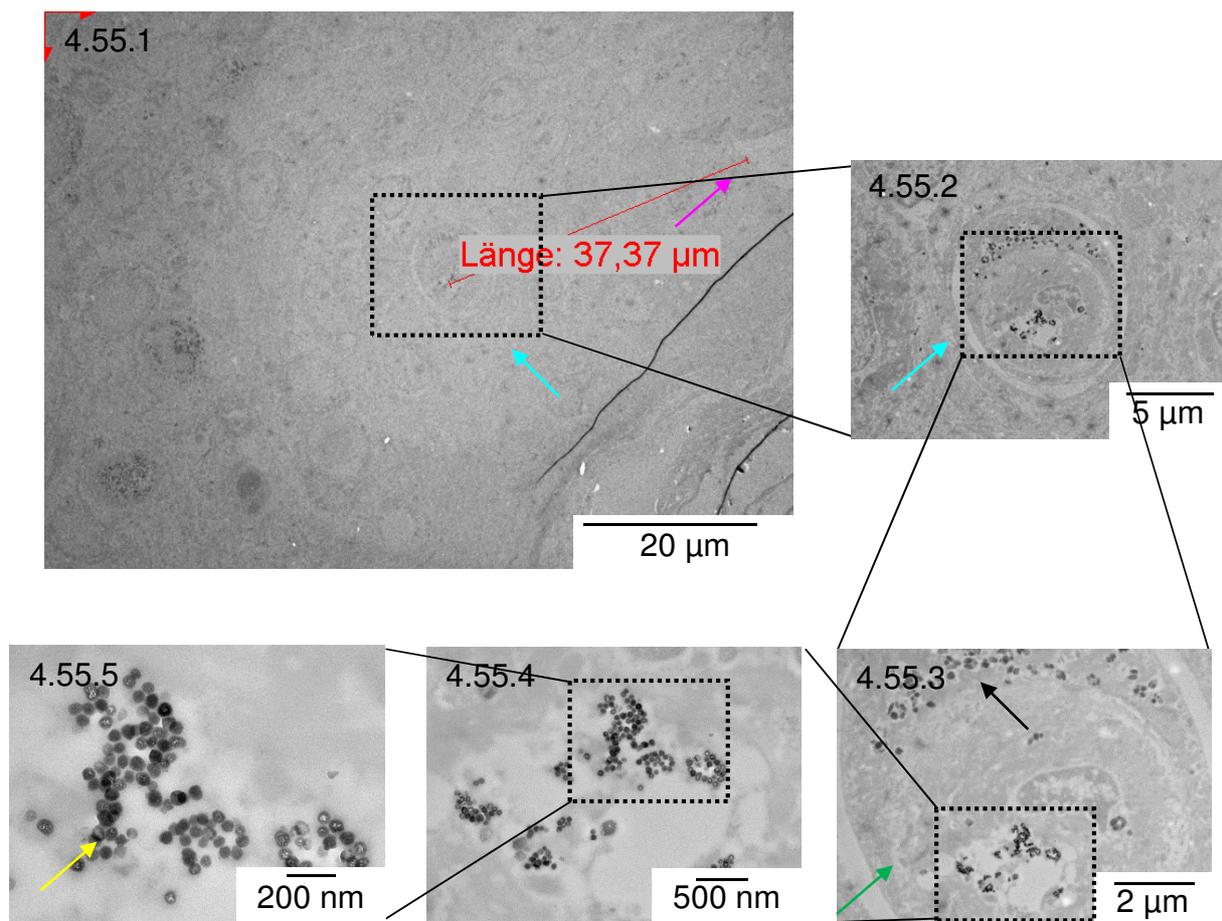


Abbildung 4.55: TEM-Aufnahmen einer Zelle der Epidermis (s. Abbildung 4.55.1/2, türkisarabener Pfeil), die sich ca. 37 µm entfernt von der Prickstelle befindet und ca. 110 µm von der ursprünglichen Hautoberfläche entfernt befindet. Neben Silicananopartikeln (s. Abbildung 4.55.5, gelber Pfeil) sind innerhalb der Zelle zudem Melanosomen (s. Abbildung 4.55.3, schwarzer Pfeil) und gegebenenfalls Birbeck-Granula (s. Abbildung 4.55.3, grüner Pfeil) enthalten.

Innerhalb der Haut ist eine Zelle, die sich vermutlich im *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht der Epidermis) befindet und etwa 37 µm von der Prickstelle entfernt ist, auffällig, da sie zahlreiche Nanopartikel enthält (s. Abbildung 4.55). Hierbei handelt es sich um eine Langerhans-Zelle oder eine dendritische epidermale T-Zelle. Generell lösen Langerhans-Zellen die Vernetzungen mit anderen Zellen und Gewebe, wenn sie aus der Haut migrieren. Hierbei entsteht ein charakteristischer Hohlraum zwischen der migrierenden Zelle und dem umliegenden Gewebe. Zudem sind sogenannte Birbeck-Granula innerhalb der Zelle zu erahnen. Diese Strukturen sind charakteristisch für Langerhans-Zellen, ihre Funktion ist nicht abschließend erforscht. Eine Theorie ist, dass diese Strukturen an der Rezeptor-vermittelten Endozytose beteiligt sind.^[215] Jedoch ist es auch möglich, dass die abgebildete Zelle eine dendritische epidermale T-Zelle ist. Epidermale T-Zellen sind Zellen des Immunsystems. Innerhalb dieser Zelle sind Melanosomen (s. Abbildung 4.55.3) und Nanopartikel (s. Abbildung 4.55.5) erkennbar. Die Größenverteilung der Melanosomen entsprechen dabei nicht derjenigen der Nanopartikel, sodass sich beide Strukturen voneinander unterscheiden lassen. Zudem sind die Nanopartikel innerhalb eines Endosoms/Lysosoms lokalisiert, während die Melanosomen im Zytosol lokalisiert sind. Anhand der Migration der dendritischen epidermalen Zelle und der über Vesikel aufgenommenen Nanopartikel, ist erkennbar, dass die humane *ex vivo*-Haut bei Inkubation mit Nanopartikeln vermutlich viabel ist, da nur lebende Zellen Nanopartikel aufnehmen können. Deutlich tiefer in der Haut, knapp oberhalb der Basalmembran, die die Grenze zwischen Epidermis und Dermis bildet (s. Abbildung 4.56), sind ebenfalls Nanopartikel im *Stratum basale* lokalisiert.

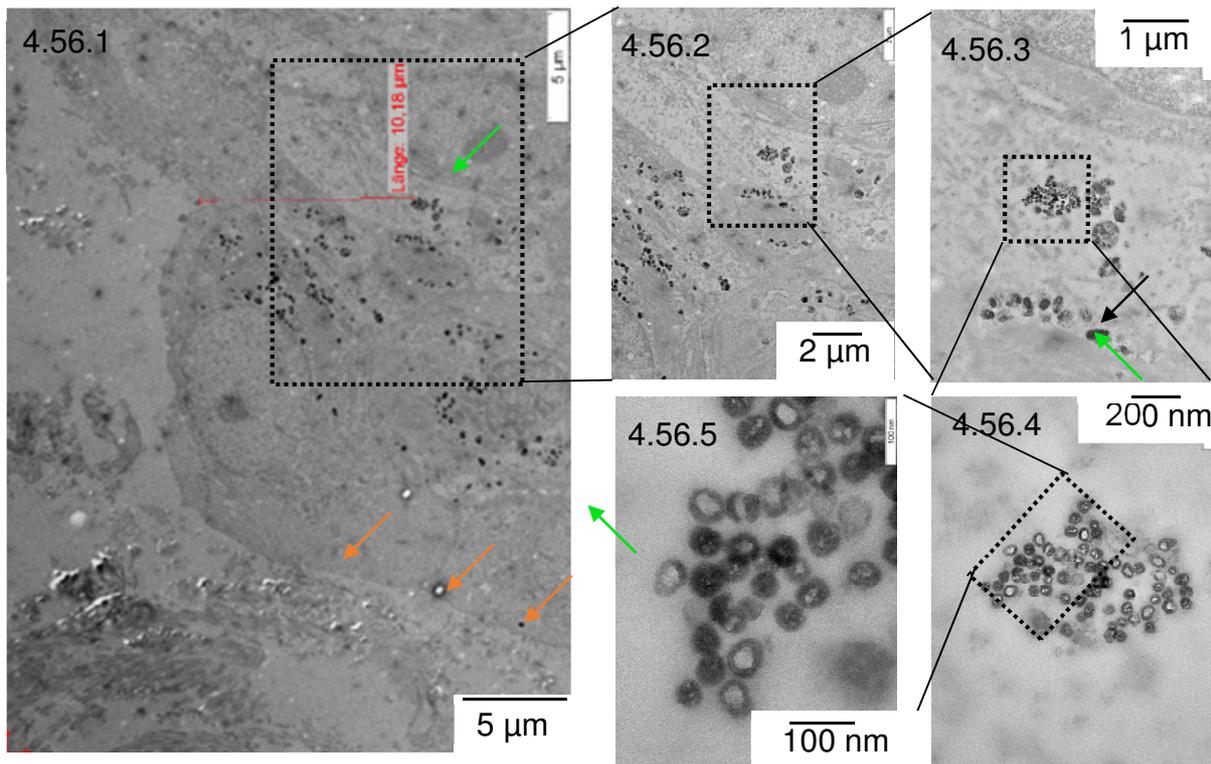


Abbildung 4.56: TEM-Aufnahmen von Nanopartikeln, die sich wenige μm vor der Basalmembran (Abbildung 4.56.1, orangener Pfeil) befinden. Somit befinden sich die Nanopartikel an der Grenze von Epidermis zu Dermis innerhalb des *Stratum basale*. Innerhalb einer Zelle (Abbildung 4.56.1/2, grüner Pfeil) der Epidermis sind Nanopartikel lokalisiert. Die Nanopartikel werden in den Aufnahmen der Abbildung 4.56.2/3/4/5 mit zunehmender Vergrößerung dargestellt.

Auch diese Nanopartikel werden innerhalb einer Zelle gefunden. Neben den Nanopartikeln sind ebenfalls Melanosomen lokalisiert (s. Abbildung 4.56.3). Einige μm unterhalb der Basalmembran im Bereich der Dermis können Nanopartikel im Kollagenbereich lokalisiert werden. Dabei können Kollagenfibrillen gut von Nanopartikeln unterschieden werden, da die Nanopartikel eine höhere Dichte aufweisen. Wird ein Längsschnitt einer Kollagenfibrille mittels TEM aufgenommen, so ist erkennbar, dass die Kollagenfibrillen eine charakteristische Querstreifung (Bänderstruktur) aufweisen. Diese besteht aus Einheiten, die sich alle 67 nm wiederholt.^[216] Zudem besitzen Kollagenfibrillen, die in der Haut lokalisiert sind, eine Querschnittsfläche, die ähnlich der Projektionsfläche der Nanopartikel ist (s. Abbildung 4.57).

Auffällig ist, dass zahlreiche Nanopartikel räumlich nahe der Kollagenfibrillen lokalisiert sind. Die Primärstruktur des Kollagens besteht aus Glycin-Prolin-Hydroxyprolin-Untereinheiten.^[217] Es sind folglich zahlreiche terminale Ketogruppen im Kollagen enthalten. Es scheint daher wahrscheinlich, dass die Aminofunktionalisierung der AHAPS-funktionalisierten Silicananopartikel mit den Ketogruppen des Kollagens zu Schiffchen Basen (Iminen) bzw. zum entsprechenden Enamin reagiert und so eine

kovalente Bindung zwischen Nanopartikeln und Kollagenfasern entsteht. Durch die Wechselwirkung von Kollagen mit den Nanopartikeln ist es möglich, dass die Eigenschaften des Strukturproteins eingeschränkt sind, sodass es zur Beeinträchtigung des Organismus kommt. Mögliche Konsequenzen können hierdurch eine Einschränkung der Elastizität und damit der Verlust des Hautschutzes sein. Eine mögliche Folge können darüber hinaus Osteoporose und Diabetes sein.^[218]

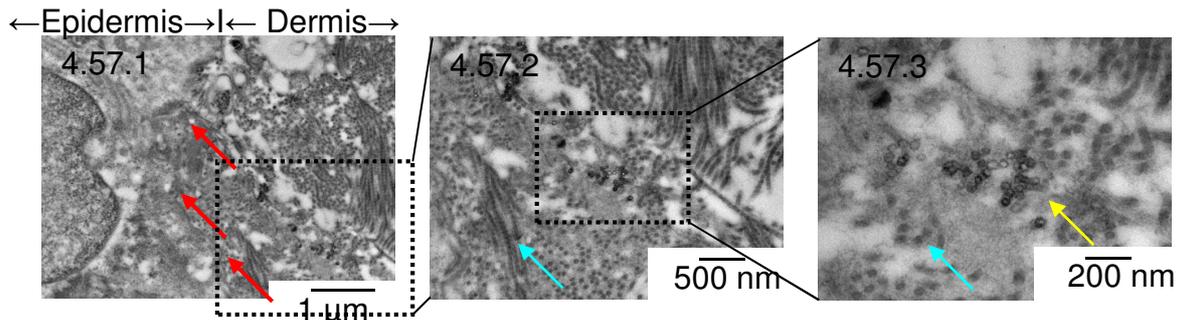


Abbildung 4.57: TEM-Aufnahmen von Nanopartikeln (Abbildung 4.57.3, gelber Pfeil), die sich unterhalb der Basalmembran (s. Abbildung 4.57.1, rote Pfeile) in der Dermis im Kollagenbereich befinden. Kollagenfasern sind längliche Strukturen (s. Abbildung 4.57.2, türkisarbener Pfeil). Da Kollagenfibrillen teilweise in z-Richtung zum Elektronenstrahl aufgenommen wurden (s. Abbildung 4.57.3, türkisarbener Pfeil), sind die Querschnitte der Kollagenfibrillen mit ähnlicher Größe zu den Nanopartikeln zu erkennen. Jedoch können beide Strukturen unterschieden werden, da die Nanopartikel erstens eine größere Dichte aufweisen und zweitens hohl sind.

Vergleicht man die Anzahl an gefundenen AHAPS-funktionalisierten Silicananopartikeln unterhalb des *Stratum corneum*s (einige wenige) in dem geprickten Hautschnitt mit der Anzahl an inkubierten Nanopartikeln (ca. 10^{11} pro 1 cm^2 Haut mit einer Dicke von 0.5 cm und mit 10^2 Prickstellen) fällt auf, dass nur ein sehr geringer Teil der Nanopartikel ($N = 26$) im Kollagenbereich gefunden werden konnte. Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass nur ein kleiner Teil der Haut mittels TEM untersucht wurde. Wenn man einen einzelnen Hautblock mit einem Volumen von $1 \text{ cm} * 1 \text{ cm} * 0.5 \text{ cm}$ mittels TEM vermessen würde bei dem ein Hautschnitt für die TEM das Volumen von $0.2 \text{ cm} * 0.1 \text{ cm} * 70 \text{ nm}$ hat, wären ca. $8 * 10^5$ TEM-Schnitte zu untersuchen. Daher ist die Anzahl der Nanopartikel, die im Kollagenbereich gefunden wurde nicht vernachlässigbar.

Geht man von der realistischen Annahme aus, dass in jeder tausendsten TEM-Aufnahme, in einem Bereich von $5 \text{ µm} * 5 \text{ µm} * 1 \text{ µm}$, 26 Nanopartikel vorhanden sind (s. Abbildung 4.57.1), so sind folglich in dem gesamten Bereich mit einem Volumen von 1000 µm (Dermis) * 5000 µm (Tiefe der Haut) * 10000 µm (Breite der Haut) etwa $5 * 10^7$

Nanopartikel in diesem Bereich enthalten. Somit sind etwa 0.05% der inkubierten Nanopartikel bis in die Dermis penetriert.

Die TEM-Aufnahmen zeigen, dass sich etwa 5% der inkubierten Nanopartikel im apikalen Bereich der Prickstelle nahe des *Stratum corneums* befindet und nur ein geringer Anteil (etwa 0.05%) der Nanopartikel in tiefere Hautregionen penetriert (s. vorherige TEM-Aufnahmen).

Qualitativ kann zu dieser Studie gesagt werden, dass AHAPS-funktionalisierte Silicananopartikel, die das *Stratum corneum* überwinden in geringer Anzahl ($N \approx 5 \cdot 10^7$ Nanopartikel) bis in die Dermis penetrieren können. Mit Hilfe der Aminofunktionalisierung werden die Nanopartikel innerhalb der Haut fixiert und somit nicht oder nur teilweise durch den anschließenden Waschprozess herausgewaschen. Untersuchungen zu geprickter Haut, die mit Silicananopartikeln ohne AHAPS-Funktionalisierung inkubiert wurde, blieben erfolglos, da keine Prickstelle gefunden werden konnte.

In nativer Haut konnten mit TEM keine AHAPS-funktionalisierten Silicananopartikel unterhalb des *Stratum corneums* detektiert werden.

Campbell et al. haben gezeigt, dass Carboxy-funktionalisierte, fluoreszierende Polystyrol-Nanopartikel mit einer Größe von 20, 100 und 200 nm in gestörte und nicht gestörte Haut in eine Tiefe von maximal 2-3 μm des *Stratum corneums* penetrieren.^[213]

Die Haut wurde durch vorherige Klebestreifenabrisse und Waschen mit Hexan gestört. Hierbei ist die Aufnahme der verschiedenen Nanopartikel in die Haut nicht signifikant unterschiedlich. Die Proben wurden mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie untersucht. Hierbei werden für Hautproben, die nicht mit Nanopartikeln inkubiert wurden, ähnliche Fluoreszenzintensitäten erhalten, wie für Hautproben, die mit Nanopartikeln inkubiert wurden. Die Aufnahme der Nanopartikel ist folglich nicht signifikant.^[213] Es konnte keine weitere Veröffentlichung gefunden werden, in der quantitative Daten zur Nanopartikelaufnahme in Haut gezeigt werden. Die Ergebnisse von Campbell et al. zeigen jedoch, ähnlich wie unsere Ergebnisse, dass eine quantitative Bestimmung der Aufnahme von Nanopartikeln schwer realisierbar ist, da nur sehr wenige Nanopartikel aufgenommen werden.

Graf et al. zeigten mittels STXM, dass Goldnanopartikel mit einer Silicaschale mit einem Durchmesser von 161 nm in das *Stratum corneum* Cyanacrylat-behandelter Haut aufgenommen werden.^[91]

Rancan et al. zeigen, dass Silicananopartikel mit einem Zeta-Potential von $-(22 \pm 3)$ mV und einem Durchmesser von ca. 42 nm durch den Kanal eines Haarfollikels in eine

Tiefe von etwa 150 μm in Barriere-gestörte Haut penetrieren.^[13] Hierbei wurde die Barriere durch Cyanacrylat-Behandlung (engl.: *cianoacrylate skin surface stripping*) gestört. Diese Autoren verwenden als Analyseverfahren CLSM, sodass keine vorherige Fixierung der Haut nötig war. Sie zeigen, dass Silicananopartikel mit einem Durchmesser von 75 nm nicht in gestörte humane Haut penetrieren.

Es wird vermutet, dass der Aufnahmeweg für Nanopartikel ähnlich den Aufnahmewegen für Arzneimittelmoleküle ist. Jedoch ist aufgrund der Größe der Nanopartikel die interzellulare Diffusionsgeschwindigkeit über Poren aus Lipiden reduziert.^{[97],[219],[220]}

In keiner mir bekannten Studie konnten Nanopartikel unterhalb der Basalmembran in humaner, zuvor nicht eingefrorener Haut in dieser Auflösung visualisiert werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden offene Fragen aus den Bereichen der Bildung von Nanopartikeln, der Aufnahme von Nanopartikeln verschiedenen Materials und verschiedener Oberflächenfunktionalisierung in den Zellkern, der Aufnahme von Nanopartikeln verschiedener Morphologie in verschiedene Zellsysteme und der Aufnahme von Nanopartikeln in native und nicht-native Haut beantwortet. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst:

In Kapitel 4.1 konnten Goldnanopartikel ($d = (60 \pm 5)$ nm) mit einer dünnen ((4 ± 3) nm) Silicaschale synthetisiert werden. Hierzu ist eine Ammoniakkonzentration von 0.59 M sowie etwa die 3.6-fache Masse an Tetraethoxysilan notwendig, als unter Annahme des vollständigen Umsatzes berechnet wurde. Die Ammoniakkonzentration scheint der entscheidende Parameter beim Silicaschalenwachstum zu sein.

Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel, Silica-ummantelte Goldnanopartikel und Silicananopartikel haben nach fünf Tagen im biologischen Zellkulturmedium einen ähnlichen hydrodynamischen Durchmesser von 117 bis 129 nm, sodass die verschiedenen Dispersionen gut vergleichbar sind. Mittels Cryo-Röntgenmikroskopie/-tomographie und Transmissionselektronenmikroskopie konnte bewiesen werden, dass Citrat-funktionalisierte Goldnanopartikel im Gegensatz zu Silica-ummantelten Goldnanopartikeln und Silicananopartikeln in den Zellkern von humanen Keratinozyten, d. h. Hautzellen aufgenommen wurden. Die Citrat-funktionalisierten Goldnanopartikel führten zu morphologischen Veränderungen, z. B. Porosität der Zellmembran und Auflösung der Zellkernmembran, der Zellen. Somit schädigten Citrat-funktionalisierte Goldnanopartikel die Zellen stärker als Silicananopartikel und Silica-ummantelte Goldnanopartikel.

In Kapitel 4.2 wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie, Elektronenmikroskopie und Atomabsorptionsspektrometrie die Auflösung von Citrat- und Polyvinylpyrrolidon-funktionalisierten trigonalen Silbernanoprismen mit einer Kantenlänge von (42 ± 15) nm und einer Prismendicke von (8 ± 1) nm mit der Auflösung von Polyvinylpyrrolidon-funktionalisierten sphärischen Analoga mit einem Durchmesser von (70 ± 25) nm in verschiedenen Medien, darunter Reinstwasser (pH 7), Acetatpuffer (pH 4), isotonischer Kochsalzlösung (pH 7), isotonischem Acetatpuffer (pH 4) und biologischen Medien, verglichen.

Dabei zeigte sich, dass Medien, die vergleichbar zum Zytoplasma, wie z. B. isotoni-sche Kochsalzlösung und isotonischem Acetatpuffer, sind, die trigonalen Silbernano-prismen am stärksten anlösten. Die sphärischen Analoga wurden in isotonischer Koch-salzlösung, isotonischem Acetatpuffer und Acetatpuffer noch stärker angelöst als die trigonalen Silbernanoprismen.

Anschließend wurde die Aufnahme von Silbernanopartikeln verschiedener Morpholo-gie in humane Stammzellen und humane Keratinozyten untersucht. Mittels Atomab-sorptionsspektrometrie und Transmissionselektronenmikroskopie konnte gezeigt wer-den, dass trigonale Silbernanoprismen in deutlich höherer Quantität in Stammzellen aufgenommen wurden, während sphärische Silbernanopartikel in höherer Quantität von Keratinozyten aufgenommen wurden. Dieser Effekt wurde der geringeren Biege-steifigkeit von humanen Stammzellen gegenüber Keratinozyten zugesprochen. Auf-grund der höheren Elastizität konnte es zu einer Vergrößerung der Adhäsionsenergie der trigonalen Prismen kommen, da die Verformung der Membran weniger Energie bedurfte. Somit lieferte die anisotrope Form der trigonalen Silbernanoprismen für die erhöhte Silberaufnahme, die mittels Transmissionselektronenmikroskopie und Atom-absorptionsspektrometrie gezeigt wurde, einen Beitrag. In der Transmissionselektro-nenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass sphärische Silbernanopartikel innerhalb von Zellen deutlich dichtere Aggregate bildeten als trigonale Silbernanoprismen. Mit-tels Rastertransmissionsröntgenmikroskopie konnten daher nur einige trigonale Silber-nanoprismen, aber zahlreiche Silbernanosphären in humanen Keratinozyten und hu-manen Stammzellen nachgewiesen werden. Diese unterschiedlich starke Aufnahme, lässt sich durch die erhöhte Auflösung der trigonalen Silbernanoprismen im Verhältnis zu sphärischen Analoga innerhalb der Zellen erklären. Schließlich waren trigonale Sil-bernanoprismen mit einer ursprünglichen Kantenlänge von (42 ± 15) nm und einer Pris-mendicke von (8 ± 1) nm nach 24 h innerhalb der untersuchten Zellen stark angelöst und hatten einen Durchmesser von (7 ± 4) nm. Die sphärischen Nanopartikel mit einem ursprünglichen Durchmesser von (70 ± 25) nm wurden ebenfalls deutlich angelöst und hatten nach 24 h einen Durchmesser von (13 ± 7) nm, sie bildeten allerdings verstärkt dicht gepackte Agglomerate in den Zellen. Somit konnten mittels Rastertransmissions-röntgenmikroskopie (Auflösung < 40 nm) die trigonalen Silbernanoprismen nicht nach-gewiesen werden, während die deutlich dichter gepackten und größeren Silbersphä-ren nachgewiesen werden konnten.

In Kapitel 4.3 wurde die Aufnahme von aminofunktionalisierten Silicananopartikeln in intakte und Barriere-gestörte humane *ex vivo* Haut untersucht. Die Proben wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert. Ein Nachteil dieser Analysetechnik ist, dass die Proben zunächst mit Glutaraldehyd und Paraformaldehyd fixiert und mit Ethanol entwässert werden mussten. Bei diesem Waschprozess ist es möglich, dass Nanopartikel, die innerhalb der Haut lokalisiert sind aus dieser gewaschen werden. Daher wurden Silicananopartikel vor Inkubation mit Haut aminofunktionalisiert und die Quervernetzung mit den verwendeten Aldehyden mittels dynamischer Lichtstreuung nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass in intakte Haut keine Nanopartikel aufgenommen wurden. In Haut, deren Barriere gestört war, konnte nachgewiesen werden, dass aminofunktionalisierte Nanopartikel in der obersten Schicht der Haut (*Stratum corneum*) und in darunter liegenden Hautschichten (*Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale*) sowie innerhalb der Dermis Nahe von Kollagenfasern gefunden werden können. Mit Hilfe der Aminofunktionalisierung der Nanopartikel wurden die Nanopartikel nicht oder nur zum Teil ausgewaschen.

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lässt sich schließen, dass in Zukunft Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel als Arzneistoffträger (engl.: *drug carrier*) für den Zellkern verwendet werden könnten um beispielsweise Modifikationen des Erbguts vorzunehmen. Zudem ist eine gezielte Schädigung von Zellsystemen mit Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln möglich. Durch die formabhängige Aufnahme von Silbernanopartikeln in verschiedene Zellsysteme eröffnen sich vielfältige Möglichkeiten, um Zellen zu modifizieren. Hierbei können die verschieden geformte Partikel für spezielle Zellsysteme verwendet werden, um effiziente Cargosysteme zu generieren. Ein großer Vorteil von Silbernanopartikeln ist hierbei, dass sich diese in physiologischen Lösungen auflösen, sodass beispielsweise Arzneistoffe, die sich innerhalb der Partikel befinden, an die Zelle abgegeben werden können. Zudem können aminofunktionalisierte Silicananopartikel in der Medizin Anwendung finden, da gezeigt wurde, dass sich die Partikel in hoher Konzentration am Eingang von Prickstellen und in geringerer Konzentration innerhalb der Dermis befinden, sodass durch entsprechende Funktionalisierung eine verbesserte Regeneration von Haut möglich sein sollte. Jedoch ist ebenfalls denkbar, dass die Lokalisation der Nanopartikel Nahe der Kollagenfasern zu einer Beeinträchtigung des Organismus führt. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse dienen jedoch vorwiegend der Erkenntnisgewinnung wie sich die Nanopartikelbeschaffenheit auf die Wechselwirkung mit biologischen Systemen auswirkt.

6. Literaturverzeichnis

- [1] J. Aleman, A. V. Chadwick, J. He, M. Hess, K. Horie, R. G. Jones, P. Kratochvil, I. Meisel, I. Mita, G. Moad, S. Penczek, R. F. T. Stepto, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 1801.
- [2] W. Ostwald, *Die Welt der vernachlässigten Dimensionen*, Steinkopff, Dresden, **1914**.
- [3] H. Weller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 41.
- [4] <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>.
- [5] A. P. Popov, A. V. Priezhev, J. Lademann, R. Myllyla, *J. Phys. D-Appl. Phys.* **2005**, *38*, 2564.
- [6] <http://www.alibaba.com/showroom/nano-silver-baby-bottle.html>.
- [7] http://www.gobizkorea.com/catalog/product_view.jsp?blogId=dream21&pageVol=12&listStyle=A&objId=860336.
- [8] http://www.bund.net/themen_und_projekte/nanotechnologie/einsatzbereiche/kosmetika/.
- [9] <http://www.trucare.com.my/v3/index.php/portfolio/14-toothpaste/11-nano-silver-toothpaste>.
- [10] <http://www.agactive.com/products.html>.
- [11] <http://www.bund.net/nc/presse/pressemitteilungen/detail/artikel/nanopartikel-in-lebensmitteln-unsichtbar-kaum-auf-risiken-geprueft-gesetzlich-ungeregelt-bundesr/>.
- [12] <http://www.bund.net/presse/pressemitteilungen/detail/archiv/2006/oktober/zurueck/archiv/artikel/bund-warnt-vor-waschmaschine-mit-nanopartikeln/>.
- [13] F. Rancan, Q. Gao, C. Graf, S. Troppens, S. Hadam, S. Hackbarth, C. Kambuan, U. Blume-Peytavi, E. Rühl, J. Lademann, A. Vogt, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6829.
- [14] H. Weller, U. Koch, M. Gutierrez, A. Henglein, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1984**, *88*, 649.
- [15] M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser.* **1847**, *147*, 145.
- [16] L. M. Liz-Marzan, *Mat. Today* **2004**, *7*, 26
- [17] H. B. Na, I. C. Song, T. Hyeon, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 2133.
- [18] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013.
- [19] D. Nordmeyer, P. Stumpf, D. Groger, A. Hofmann, S. Enders, S. B. Riese, J. Dervede, M. Taupitz, U. Rauch, R. Haag, E. Rühl, C. Graf, *Nanoscale* **2014**, *6*, 9646.
- [20] E. C. Dreaden, L. A. Austin, M. A. Mackey, M. A. El-Sayed, *Therapeutic delivery* **2012**, *3*, 457.
- [21] https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/461/publikationen/3783_0.pdf.
- [22] R. Zsigmondy, *Das Kolloidale Gold*, Akademische Verlagsgesellschaft M. B. H., Leipzig, **1925**.
- [23] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday. Soc.* **1951**, *11*, 55.

- [24] J. P. Wilcoxon, R. L. Williamson, R. Baughman, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 9933.
- [25] F. Mafune, J. Y. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7575.
- [26] Y. C. Yang, C. H. Wang, Y. K. Hwu, J. H. Je, *Mater. Chem. Phys.* **2006**, *100*, 72.
- [27] G. Frens, *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20.
- [28] K. Zabetakis, W. E. Ghann, S. Kumar, M.-C. Daniel, *Gold Bull.* **2012**, *45*, 203.
- [29] C. Shan, F. Li, F. Yuan, G. Yang, L. Niu, Q. Zhang, *Nanotechnology* **2008**, *19*.
- [30] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Com.* **1994**, *7*, 801.
- [31] W. W. Weare, S. M. Reed, M. G. Warner, J. E. Hutchison, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12890.
- [32] S. Kumar, K. S. Gandhi, R. Kumar, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 3128.
- [33] C. F. Bohren, D. R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley, New York, **1983**.
- [34] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer-Verlag, Berlin, **1995**.
- [35] A. Hofmann, Dissertation, Freie Universität Berlin **2010**.
- [36] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215.
- [37] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 76.
- [38] N. Silvestry-Rodriguez, E. E. Sicairos-Ruelas, C. P. Gerba, K. R. Bright, in *Silver as a disinfectant, Vol. 191*, **2007**, pp. 23.
- [39] J. J. Castellano, S. M. Shafii, F. Ko, G. Donate, T. E. Wright, R. J. Mannari, W. G. Payne, D. J. Smith, M. C. Robson, *Int. Wound J.* **2007**, *4*, 114.
- [40] A. B. G. Lansdown, *J. Wound Care* **2002**, *11*, 125.
- [41] P. Dibrov, J. Dzioba, K. K. Gosink, C. C. Hase, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2668.
- [42] H. P. Erickson, *Biol. Proced. Online* **2009**, *11*, 32.
- [43] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Koller, M. Epple, *Chem. Mat.* **2010**, *22*, 4548.
- [44] J. Liu, R. H. Hurt, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 2169.
- [45] S. Kittler, C. Greulich, J. S. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Zellner, M. Koeller, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 512.
- [46] J. H. Park, S. G. Oh, B. W. Jo, *Mater. Chem. Phys.* **2004**, *87*, 301.
- [47] H. K. Sung, S. Y. Oh, C. Park, Y. Kim, *Langmuir* **2013**, *29*, 8978.
- [48] B. Wiley, T. Herricks, Y. G. Sun, Y. N. Xia, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1733.
- [49] R. C. Jin, Y. W. Cao, C. A. Mirkin, K. L. Kelly, G. C. Schatz, J. G. Zheng, *Science* **2001** *294*, 1901.
- [50] G. S. Metraux, C. A. Mirkin, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 412.
- [51] D. Aherne, D. M. Ledwith, M. Gara, J. M. Kelly, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 2005.
- [52] C. Lofton, W. Sigmund, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1197.
- [53] Y. G. Sun, Y. N. Xia, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 695.
- [54] W. H. Yang, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 869.
- [55] <http://www.aerosil.com>.
- [56] L. Yildirim, N. T. K. Thanh, M. Loizidou, A. M. Seifalian, *Nano Today* **2011**, *6*, 585.

- [57] <http://nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/siliziumdioxid/uebersicht-siliziumdioxid>.
- [58] Y. Hu, X. T. Zheng, J. S. Chen, M. J. Zhou, C. M. Li, X. W. Lou, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 8052.
- [59] H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, U. Wiesner, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 113.
- [60] Slowing, II, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8845.
- [61] I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, D. J. Bharali, H. E. Pudavar, R. A. Mistretta, N. Kaur, P. N. Prasad, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 279.
- [62] S. Santra, P. Zhang, K. M. Wang, R. Taped, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4988.
- [63] S. H. Liu, M. Y. Han, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 961.
- [64] C. Graf, Q. Gao, I. Schütz, C. N. Noufele, W. Ruan, U. Posselt, E. Korotianskiy, D. Nordmeyer, F. Rancan, S. Hadam, A. Vogt, J. Lademann, V. Haucke, E. Rühl, *Langmuir* **2012**, *28*, 7598.
- [65] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Coll. Int. Sci.* **1968**, *26*, 62.
- [66] A. van Blaaderen, A. Vrij, *J. Coll. Int. Sci.* **1993**, *156*, 1.
- [67] V. K. Lamer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4847.
- [68] A. van Blaaderen, J. van Geest, A. Vrij, *J. Coll. Int. Sci.* **1992**, *154*, 481.
- [69] A. K. van Helden, J. W. Jansen, A. Vrij, *J. Coll. Int. Sci.* **1981**, *81*, 354.
- [70] F. J. Arriagada, K. Osseo-Asare, *J. Coll. Int. Sci.* **1999**, *211*, 210.
- [71] K. Osseo-Asare, F. J. Arriagada, *Colloids and Surfaces* **1990**, *50*, 321.
- [72] G. H. Bogush, C. F. Zukoski, *J. Coll. Int. Sci.* **1991**, *142*, 1.
- [73] U. Kürschner, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2007**.
- [74] de.wikipedia.org.
- [75] <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMHaut.html>.
- [76] L. W. Zhang, N. A. Monteiro-Riviere, *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 061214.
- [77] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitzkreutz, J. Hornung, A. Markham, N. E. Fusenig, *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 761.
- [78] C. Greulich, S. Kittler, M. Epple, G. Muhr, M. Koller, *Langenbecks Arch. Surg.* **2009**, *394*, 495.
- [79] C. Freese, C. Uboldi, M. I. Gibson, R. E. Unger, B. B. Weksler, I. A. Romero, P.-O. Couraud, C. J. Kirkpatrick, *Part. Fibre. Toxicol.* **2012**, *9*, 1.
- [80] C. Uboldi, D. Bonacchi, G. Lorenzi, M. I. Hermanns, C. Pohl, G. Baldi, R. E. Unger, C. J. Kirkpatrick, *Part. Fibre. Toxicol.* **2009**, *6*, 1.
- [81] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662.
- [82] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 11613.
- [83] A. Albanese, W. C. W. Chan, *ACS Nano* **2011**, *5*, 5478.
- [84] T. Yu, K. Greish, L. D. McGill, A. Ray, H. Ghandehari, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2289.
- [85] A. Albanese, P. S. Tang, W. C. W. Chan, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *14*, 1.
- [86] P. G. Agache, C. Monneur, J. L. Leveque, J. Derigal, *Arch. Dermatol. Res.* **1980**, *269*, 221.
- [87] C. Heu, A. Berquand, C. Elie-Caille, L. Nicod, *J. Struct. Biol.* **2012**, *178*, 1.
- [88] H. Yu, C. Y. Tay, W. S. Leong, S. C. W. Tan, K. Liao, L. P. Tan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *393*, 150.
- [89] J. Lademann, H. J. Weigmann, C. Rickmeyer, H. Barthelmes, H. Schaefer, G. Müller, W. Sterry, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **1999**, *12*, 247.

- [90] F. F. Larese, F. D'Agostin, M. Crosera, G. Adami, N. Renzi, M. Bovenzi, G. Maina, *Toxicology* **2009**, *255*, 33.
- [91] C. Graf, M. Meinke, Q. Gao, S. Hadam, J. Raabe, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, J. Lademann, E. Rühl, A. Vogt, *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14*, 021015.
- [92] O. Lee, S. H. Jeong, W. U. Shin, G. Lee, C. Oh, S. W. Son, *Skin Res. Technol.* **2013**, *19*, E390.
- [93] J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere, *Toxicol. Sci.* **2006**, *91*, 159.
- [94] A. Ostrowski, D. Nordmeyer, A. Boreham, C. Holzhausen, L. Mundhenk, C. Graf, M. C. Meinke, A. Vogt, S. Hadam, J. Lademann, E. Ruehl, U. Alexiev, A. D. Gruber, *Beilstein J. Nanotech.* **2015**, *6*, 263.
- [95] A. Ostrowski, D. Nordmeyer, L. Mundhenk, J. W. Fluhr, J. Lademann, C. Graf, E. Ruehl, A. D. Gruber, *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 524.
- [96] A. Ostrowski, D. Nordmeyer, A. Boreham, R. Brodewolf, L. Mundhenk, J. W. Fluhr, J. Lademann, C. Graf, E. Ruehl, U. Alexiev, A. D. Gruber, *Nanomed.-Nanotechnol.* **2014**, *10*, 1571.
- [97] H. I. Labouta, L. K. El-Khordagui, T. Kraus, M. Schneider, *Nanoscale* **2011**, *3*, 4989.
- [98] S. A. Coulman, A. Anstey, C. Gateley, A. Morrissey, P. McLoughlin, C. Allender, J. C. Birchall, *Int. J. Pharm.* **2009**, *366*, 190.
- [99] L. J. Mortensen, G. Oberdorster, A. P. Pentland, L. A. DeLouise, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2779.
- [100] J. G. Rouse, J. Yang, J. P. Ryman-Rasmussen, A. R. Barron, N. A. Monteiro-Riviere, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 155.
- [101] <http://www.nature.com/nrd/journal/v9/n8/images/nrd2591-f2.jpg>.
- [102] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biochem. J.* **2004**, *377*, 159.
- [103] T. dos Santos, J. Varela, I. Lynch, A. Salvati, K. A. Dawson, *Plos One* **2011**, *6*, e24438.
- [104] H. Appelqvist, P. Waster, K. Kagedal, K. Ollinger, *J. Mol. Cell Biol.* **2013**, *5*, 214.
- [105] R. G. Parton, K. Simons, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2007**, *8*, 185.
- [106] W.-L. Langston Suen, Y. Chau, *J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, *66*, 564.
- [107] H. L. Gao, Z. Yang, S. Zhang, S. J. Cao, S. Shen, Z. Q. Pang, X. G. Jiang, *Sci. Rep.-UK* **2013**, *3*, 8.
- [108] T. Xia, M. Kovochich, J. Brant, M. Hotze, J. Sempf, T. Oberley, C. Sioutas, J. I. Yeh, M. R. Wiesner, A. E. Nel, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1794.
- [109] A. E. Porter, K. Muller, J. Skepper, P. Midgley, M. Welland, *Acta Biomater.* **2006**, *2*, 409.
- [110] E. Abbe, in *Archiv f. mikrosk. Anatomie, Vol. 9*, Springer-Verlag, **1873**, pp. 413.
- [111] R. Erni, M. D. Rossell, C. Kisielowski, U. Dahmen, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 4.
- [112] R. Egoavil, N. Gauquelin, G. T. Martinez, S. Van Aert, G. Van Tendeloo, J. Verbeeck, *Ultramicroscopy* **2014**, *147*, 1.
- [113] C. Davisson, L. H. Germer, *Phys. Rev.* **1927**, *30*, 705.
- [114] M. Knoll, E. Ruska, *Zeitschrift für Physik* **1932**, *78*, 318.
- [115] S. J. Oldenburg, R. D. Averitt, S. L. Westcott, N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *288*, 243.
- [116] J. L. West, N. J. Halas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2003**, *5*, 285.
- [117] R. Baer, D. Neuhauser, S. Weiss, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 85.

- [118] [http://www.ifam.fraunhofer.de/de/Bremen/Klebtechnik Oberflaechen/Analytik und Pruefverfahren/Transmissions-Elektronenmikroskopie/Methoden/messprinzip_stem/_jcr_content/contentPar/extblockwithpics/image1.img.jpg/tem_comparison-tem-stem_350.1346848107389.jpg](http://www.ifam.fraunhofer.de/de/Bremen/Klebtechnik_Oberflaechen/Analytik_und_Pruefverfahren/Transmissions-Elektronenmikroskopie/Methoden/messprinzip_stem/_jcr_content/contentPar/extblockwithpics/image1.img.jpg/tem_comparison-tem-stem_350.1346848107389.jpg).
- [119] Manuel, Delsa Nano Submicron Particle Size and Zeta Potential, Fullerton, CA. **2008**.
- [120] M. Cebi, Dissertation, Technische Universität Dortmund **2011**.
- [121] <https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/Photolumineszenz>.
- [122] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, **1999**.
- [123] http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzmikroskopie#/media/File:Fluoreszenzmikroskopie_2008-09-28.svg.
- [124] H. Baumgärtel, *Chem. unserer Zeit* **1994**, 28, 6.
- [125] http://www.helmholtz-berlin.de/angebote/arbeiten-lernen/info/beschleunigerphysik-fuer-anfaenger/bessy-ii_de.html.
- [126] http://www.helmholtz-berlin.de/angebote/arbeiten-lernen/info/beschleunigerphysik-fuer-anfaenger/der-speicherring_de.html.
- [127] <http://www.udkm.physik.uni-potsdam.de/medien/teaching/SS2012/QuerschnitteUndDebye-Scherrer.pdf>.
- [128] W. C. Röntgen, *Science* **1896**, 3, 227.
- [129] G. Schmahl, D. Rudolph, B. Niemann, P. Guttman, J. Thieme, G. Schneider, *Naturwissenschaften* **1996**, 83, 61.
- [130] J. Raabe, G. Tzvetkov, U. Flechsig, M. Boege, A. Jaggi, B. Sarafimov, M. G. C. Vernooij, T. Huthwelker, H. Ade, D. Kilcoyne, T. Tyliczszak, R. H. Fink, C. Quitmann, *Rev. Sci. Instrum.* **2008**, 79, 113704.
- [131] S. Rehbein, S. Heim, P. Guttman, S. Werner, G. Schneider, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, 103, 110801.
- [132] <http://www.psi.ch/sls/pollux/endstation>.
- [133] W. Meyer-Ilse, D. Hamamoto, A. Nair, S. A. Lelievre, G. Denbeaux, L. Johnson, A. L. Pearson, D. Yager, M. A. Legros, C. A. Larabell, *J. Microsc.-Oxford* **2001**, 201, 395.
- [134] O. Mishima, H. E. Stanley, *Nature* **1998**, 396, 329.
- [135] W. Chao, J. Kim, S. Rekawa, P. Fischer, E. H. Anderson, *Opt. Express* **2009**, 17, 17669.
- [136] G. Schneider, P. Guttman, S. Heim, S. Rehbein, F. Mueller, K. Nagashima, J. B. Heymann, W. G. Mueller, J. G. McNally, *Nat. Methods* **2010**, 7, 985.
- [137] D. N. Mastrorade, *J. Microsc.-Oxford* **2008**, 230, 212.
- [138] J. Frank, *Electron Tomography*, Springer, New York, **2005**.
- [139] B. Welz, M. Sperling, *Atomabsorptionsspektrometrie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [140] M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, de Gruyter, Berlin, **2008**.
- [141] F. Senf, K. J. S. Sawhney, R. Follath, M. Scheer, F. Schafers, J. Bahrtdt, A. Gaupp, W. Gudat, *J. Synchrot. Radiat.* **1998**, 5, 747.
- [142] <http://www.helmholtz-berlin.de/media/media/aktuell/print/flyer/48/grossgeraete-flyer-web.pdf>.
- [143] J. Sedlmair, S. C. Gleber, S. O. Mert, M. Bertilson, O. von Hofsten, J. Thieme, T. Pfohl, *Microsc. Microanal.* **2011**, 17, 991.
- [144] C. Graf, D. L. J. Vossen, A. Imhof, A. van Blaaderen, *Langmuir* **2003**, 19, 6693.

- [145] A. van Blaaderen, A. Vrij, *Langmuir* **1992**, *8*, 2921.
- [146] A. Imhof, M. Megens, J. J. Engelberts, D. T. N. de Lang, R. Sprik, W. L. Vos, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 1408.
- [147] S. Kittler, C. Greulich, J. S. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Zellner, M. Koller, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 512.
- [148] https://de.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=SCOI285404306.
- [149] M. J. Karnovsky, *J. Cell Biol.* **1965**, *27*, A137.
- [150] Y. Qiu, Y. Liu, L. Wang, L. Xu, R. Bai, Y. Ji, X. Wu, Y. Zhao, Y. Li, C. Chen, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7606.
- [151] A. S. Barnard, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 245.
- [152] L. Treuel, X. Jiang, G. U. Nienhaus, *J. R. Soc. Interface* **2013**, *10*, 1.
- [153] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak, *Science* **1999**, *284*, 143.
- [154] J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, T. M. Focella, H. M. Smilowitz, *Brit. J. Radiol.* **2006**, *79*, 248.
- [155] http://henke.lbl.gov/optical_constants/filter2.html.
- [156] N. Sui, V. Monnier, M. V. Salvia, Y. Chevolot, E. Souteyrand, *Mater. Sci. Eng. B-Adv. Funct. Solid-State Mater.* **2014**, *182*, 92.
- [157] M. Schmudde, Bachelorarbeit, Freie Universität Berlin **2011**.
- [158] H. Ow, D. Larson, M. Srivastava, B. Baird, W. Webb, U. Wiesner, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 113.
- [159] G. H. Bogush, C. F. Zukoski, *J. Coll. Int. Sci.* **1991**, *142*, 19.
- [160] V. M. Masalov, N. S. Sukhinina, E. A. Kudrenko, G. A. Emelchenko, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 275718.
- [161] C. C. M. C. Carcouët, M. W. P. van de Put, B. Mezari, P. C. M. M. Magusin, J. Laven, P. H. H. Bomans, H. Friedrich, A. C. C. Esteves, N. A. J. M. Sommerdijk, R. A. T. M. van Benthem, G. de With, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 1433.
- [162] K.-S. Chou, C.-C. Chen, *Ceram. Int.* **2008**, *34*, 1623.
- [163] S. L. Chen, P. Dong, G. H. Yang, J. J. Yang, *J. Coll. Int. Sci.* **1996**, *180*, 237.
- [164] L. M. Liz-Marzan, M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1996**, *12*, 4329.
- [165] S. K. Park, K. Do Kim, H. T. Kim, *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, *197*, 7.
- [166] H. Giesche, *J. Eur. Ceram. Soc.* **1994**, *14*, 205.
- [167] <http://www.lonza.com>.
- [168] E. Tomaszewska, K. Soliwoda, K. Kadziola, B. Tkacz-Szczesna, G. Celichowski, M. Cichomski, W. Szmaja, J. Grobelny, *J. Nanomater.* **2013**, *2013*.
- [169] A. Hofmann, S. Thierbach, A. Semisch, A. Hartwig, M. Taupitz, E. Rühl, C. Graf, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 7842.
- [170] W. B. Russel, D. A. Saville, W. R. Schowalter, *Colloidal Dispersions*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, **1989**.
- [171] <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/brief-introduction-to-contrasting-for-em-sample-preparation/>.
- [172] N. Alem, R. Erni, C. Kisielowski, M. D. Rossell, W. Gannett, A. Zettl, *Phys. Rev. B* **2009**, *80*, 155425.
- [173] E. Rühl, R. Flesch, W. Tappe, A. A. Pavlychev, *J. Synchrotron Radiat.* **2001**, *8*, 154.

- [174] Y. Wang, C. Jacobsen, J. Maser, A. Osanna, *J. Microsc.-Oxford* **2000**, *197*, 80.
- [175] J. Maser, A. Osanna, Y. Wang, C. Jacobsen, J. Kirz, S. Spector, B. Winn, D. Tennant, *J. Microsc.-Oxford* **2000**, *197*, 68.
- [176] M. Miaczynska, S. Christoforidis, A. Giner, A. Shevchenko, S. Uttenweiler-Joseph, B. Habermann, M. Wilm, R. G. Parton, M. Zerial, *Cell* **2004**, *116*, 445.
- [177] A. Verma, F. Stellacci, *Small* **2010**, *6*, 12.
- [178] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* **2005**, *1*, 325.
- [179] Y. S. Chen, Y. C. Hung, I. Liao, G. S. Huang, *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 858.
- [180] Y. Qu, X. Lue, *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 1.
- [181] S. Vijayakumar, S. Ganesan, *J. Nanomater.* **2012**, *2012*, 1.
- [182] Y. Lu, X. Zhang, H. Zhang, J. Lan, G. Huang, E. Varin, H. Lincet, L. Poulain, P. Icard, *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 797.
- [183] A. M. Alkilany, C. J. Murphy, *J. Nanopart. Res.* **2010**, *12*, 2313.
- [184] H. J. Gao, W. D. Shi, L. B. Freund, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 9469.
- [185] L. Treuel, S. Brandholt, P. Maffre, S. Wiegele, L. Shang, G. U. Nienhaus, *ACS Nano* **2014**, *8*, 503.
- [186] W. K. Wong, Z. N. Tan, B. H. Lim, Z. Mohamed, A. Olivos-Garcia, R. Noordin, *Parasitol. Res.* **2011**, *108*, 425.
- [187] A. Majzik, L. Fueloep, E. Csapo, F. Bogar, T. Martinek, B. Penke, G. Biro, I. Dekany, *Colloid. Surface. B* **2010**, *81*, 235.
- [188] X. Lu, J. Qian, H. Zhou, Q. Gan, W. Tang, J. Lu, Y. Yuan, C. Liu, *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 1889.
- [189] Y. Jin, S. Kannan, M. Wu, J. X. Zhao, *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1126.
- [190] H. Liang, C. Jin, Y. Tang, F. D. Wang, C. W. Ma, Y. J. Yang, *J. Appl. Toxicol.* **2014**, *34*, 367.
- [191] J. Tian, K. K. Y. Wong, C.-M. Ho, C.-N. Lok, W.-Y. Yu, C.-M. Che, J.-F. Chiu, P. K. H. Tam, *Chemmedchem* **2007**, *2*, 129.
- [192] D. Roe, B. Karandikar, N. Bonn-Savage, B. Gibbins, J.-B. Roullet, *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 869.
- [193] X. Chen, H. J. Schluesener, *Toxicol. Lett.* **2008**, *176*, 1.
- [194] L. M. Liz-Marzan, I. LadoTourino, *Langmuir* **1996**, *12*, 3585.
- [195] J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che, S. C. Low, *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 381.
- [196] S. Sharma, N. Pal, P. K. Chowdhury, S. Sen, A. K. Ganguli, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19677.
- [197] S. Ahlberg, M. C. Meinke, L. Werner, M. Epple, J. Diendorf, U. Blume-Peytavi, J. Lademann, A. Vogt, F. Rancan, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *88*, 651.
- [198] D. A. Ladner, M. Steele, A. Weir, K. Hristovski, P. Westerhoff, *J. Hazard. Mater.* **2012**, *211*, 288.
- [199] [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/003740.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/003740.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0).
- [200] J. Heukeshoven, R. Dernick, *Electrophoresis* **1985**, *6*, 103.
- [201] <http://www.silver-colloids.com/>.
- [202] P. Cossart, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2307.
- [203] S. Ahlberg, A. Antonopoulos, J. Diendorf, R. Dringen, M. Epple, R. Flöck, W. Goedecke, C. Graf, N. Haberl, J. Helmlinger, F. Herzog, F. Heuer, S. Hirn, C. Johannes, S. Kittler, M. Köller, K. Korn, W. G. Kreyling, F. Krombach, J.

- Lademann, K. Loza, E. M. Luther, M. Malissek, M. C. Meinke, D. Nordmeyer, A. Pailliant, J. Raabe, F. Rancan, B. Rothen-Rutishauser, E. Rühl, C. Schleh, A. Seibel, C. Sengstock, L. Treuel, A. Vogt, K. Weber, R. Zellner, *Beilstein J. Nanotech.* **2014**, *5*, 1944.
- [204] C. Segundo, F. Medina, C. Rodriguez, R. Martinez-Palencia, F. Leyva-Cobian, J. A. Brieva, *Blood* **1999**, *94*, 1012.
- [205] E. C. Cho, Q. Zhang, Y. N. Xia, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 385.
- [206] R. Agarwal, V. Singh, P. Journey, L. Shi, S. V. Sreenivasan, K. Roy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 17247.
- [207] U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber, H. J. Guntherodt, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2437.
- [208] A. J. Engler, M. A. Griffin, S. Sen, C. G. Bonnetmann, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *J. Cell Biol.* **2004**, *166*, 877.
- [209] J. D. Trono, K. Mizuno, N. Yusa, T. Matsukawa, K. Yokoyama, M. Uesaka, *J. Radiat. Res.* **2011**, *52*, 103.
- [210] H. Wagner, K.-H. Kostka, W. Adelhardt, U. F. Schaefer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 121.
- [211] R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, M. Simon, *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 1094.
- [212] W. Meyer, *Hautarzt* **1996**, *47*, 178.
- [213] C. S. J. Campbell, L. R. Contreras-Rojas, M. B. Delgado-Charro, R. H. Guy, *J. Control. Release* **2012**, *162*, 201.
- [214] F. Bauer, H. J. Glasel, U. Decker, H. Ernst, A. Freyer, E. Hartmann, V. Sauerland, R. Mehnert, *Prog. Org. Coat.* **2003**, *47*, 147.
- [215] P. Stoitzner, K. Pfaller, H. Strossel, N. Romani, *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *118*, 117.
- [216] D. F. Holmes, H. K. Graham, J. A. Trotter, K. E. Kadler, *Micron* **2001**, *32*, 273.
- [217] P. Johansson, Masterarbeit, Linköping University **2013**.
- [218] M. Saito, K. Marumo, *Osteoporosis Int.* **2010**, *21*, 195.
- [219] P. W. Wertz, *Acta Derm.-Venereol.* **2000**, *208*, 7.
- [220] M. Schneider, F. Stracke, S. Hansen, U. F. Schaefer, *Dermato-Endocrinology* **2009**, *1*, 197.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

7. Anhang

Anhang A Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie der biologischen Proben aus Kapitel 4.1 und Kapitel 4.2

Die Fixierung erfolgt mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0.1M Na-Cacodylatpuffer. Anschließend wird 2 x 10 min mit Puffer gespült, mit 1% OsO₄, 0,8 % K₄(Fe(CN)₆) in 0,1 M Cacodylatpuffer für 90 min postfixiert und 2x10 min gespült

Die Zellsuspension wird in Agarose eingebettet, erkalten gelassen und in kleine Blöcke geschnitten.

Zur Einbettung der Zellen werden diese zunächst in aufsteigender Alkoholreihe beginnend bei 50 %, 70 %, 80 %, 95 % (jeweils 2 x 10-12 min) und 3 x 15 min abs. Alkohol entwässert. Anschließend wird für 2 x 15 min durch Immersion in Propylenoxid (SERVA) als Intermedium und durch Immersion mit eine Mischung aus Propylenoxid und Epon mit einem Verhältnis von 2:1 (1 h) 1:1 (1 h) und 1:2 (1 Stunde) überführt. Schließlich erfolgt die Immersion mit reinem Epon (SERVA) über Nacht. Die Proben werden in Einbettkapseln plaziert, mit frischem Epon aufgefüllt und bei 60 °C für 48 h polymerisiert gelassen.

Anschließend erfolgt die Herstellung von Gewebeschnitten: Zunächst werden die Einbettkapseln entfernt und die Eponblöcke getrimmt, semidünne Schnitte 0.5 bis 1 µm dick an einem RM 2065 der Firma Leica, Bensheim angefertigt und die Schnitte mit Richardson Färbelösung (Methylenblau / Azur) angefärbt. Nach Auswahl des interessierenden Bereiches wird der Rest des Gewebes am Eponblock entfernt. Anschließend werden Ultradünnschnitte (70nm dick), am Ultracut S, Leica angefertigt und auf Kupfergrids aufgebracht. Die Schnitte werden mit Uranylacetat und Bleiacetat nach Reynolds kontrastiert und an einem EM 906 (Zeiss, Oberkochen) mikroskopiert.

Anhang B Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie der biologischen Proben aus Kapitel 4.3

----- Material -----

- (1) Paraformaldehyd (Pulver)
- (2) Glutaraldehyd (GA; 25% in Wasser; EMS, No. 16020, Ampullenform)
- (3) HEPES **oder** Phosphat Puffer (siehe Protokoll Phosphatpuffer nach Sörensen)
- (4) NaOH (10 N)
- (5) Aqua bidest.

----- Vorbereitung -----

- (6) Vorbereitung der Puffer-Stammlösung. **HEPES**: 1 M in aqua bidest (pH=7.2). **Phosphatpuffer**: 0.4 M (pH=7.4) gemäß Anleitung.
- (7) Lösen von 8% Paraformaldehyd (PFA) in aqua bidest. durch Heizen auf 60-70° C für mindestens 30 min bei möglichst kontinuierlichem Rühren. Klärung der Lösung durch Zugabe von wenigen Tropfen 10 N NaOH. Aufüllen auf Endvolumen. Abkühlen auf Raumtemperatur.
- (8) Herstellung der Fixierungslösung durch Mischen von Paraformaldehyd-Lösung mit Glutaraldehyd (25%), Pufferstamm-Lösung und aqua dest. in einer Endkonzentration von 4% Paraformaldehyd, 2.5% Glutaraldehyd in 0,05 M Hepes oder 0.1 M Phosphatpuffer.

Berechnungsbeispiel (100 ml):

50 ml 8% PFA + 10 ml GA + 5 ml **HEPES** (1 M) + 35 ml aqua bidest.

oder

50 ml 8% PFA + 10 ml GA + 25 ml **Phosphatpuffer** (0.4 M) + 15 ml aqua bidest.

----- Durchführung -----

- (9) **Gewebe/Organe**: Gewebestücke möglichst rasch entnehmen und in das frisch präparierte Fixativ eintauchen. **Zellkulturen**: Zellkulturmedium abnehmen und Fixativ hinzugeben. Eine Bewegung des Fixatives unterstützt den Fixierungsvorgang. Fixierungstemperatur: Vitaltemperatur bzw. Temperatur bei der das Objekt zuletzt gelagert bzw. manipuliert wurde.
- (10) Nach 5 min Wechsel des Fixatives.
- (11) Fixierungsdauer bei Vitaltemperatur (s.o.): mindestens 1 h bei Zellmonolayern; 2 h bei Gewebe.
- (12) Lagerung im Kühlschrank.

Anhang C

Einbett-Kunststoff -> LR White, hard grade

Chemische Fixierung -> 1% PFA 2.5% GA in 0.05 M HEPES für 2 h bei RT

----- Material -----

- (13) Vibratomschnitte (etwa 150 µm dick) von fixierten Hautstückchen (Lagerung in 0,05 M Hepes)
- (14) Hepes-Puffer, 0,05 M
- (15) Ethanol 50, 70, 100%
- (16) Kryo-Röhrchen, 2 ml
- (17) Transferkörbe
- (18) LR-White (Hard grade)
- (19) LR-White Accelerator (Beschleuniger)
- (20) Airfuge-Röhrchen
- (21) Kappen von Gelatinekapseln (Größe 3)
- (22) Vortex
- (23) Polymerisationsofen, auf 60° C vorheizen.

----- Vorbereitung -----

- (24) Vorpolymerisation von Böden in den Einbettgefäßen (Airfuge-Röhrchen). Dazu 1 ml LR White Monomer mit 2.5 µl Beschleuniger mischen (Vortex!). Einfüllen von 30 µl/Röhrchen und Verschließen mit Deckel einer Gelatinekapsel. Polymerisation auf Eis für 60 min.
- (25) Polymerisation bei 60° C für 30 min; Absaugen; Lagern im Wärmeschrank, bei 60° C bis Gebrauch.

----- Durchführung -----

- (26) Transfer von 3 Schnitten in ein Transferkörbchen.
- (27) Entwässerung, Infiltration, Einbettung und Polymerisation erfolgt auf **Eis**. Die jeweiligen Lösungen werden auf Eis vorgekühlt.
- (28) Entwässerung:
 - 50% Ethanol (5 min) RT -> Eis
 - 70% Ethanol (10 min)
 - 100% Ethanol (10 min)
 - 100% Ethanol (10 min)
 - LR-White / Ethanol, 1T + 1T (10 min)
 - 100% LR-White (10 min)

- 100% LR-White (20 min)

(29) Die Mischung des LR White Monomers mit dem Beschleuniger erfolgt in 1 ml Portionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Es werden 2.5 µl Beschleuniger zum LR White pipettiert (Einspritzen in vorgelegtes Monomer) und sofort mit einem Vortexer vermischt. Jeweils ca. 0.2 ml dieser Mischung werden schließlich in die Probengefäße überführt. Jeweils ein Schnitt wird pro Airfuge-Röhrchen überführt und mit der Federstahlpinzette auf den vorpolymerisierten Boden gelegt. Schließlich werden die Röhrchen mit einem Deckel einer Gelatinekapsel (Größe 3) geschlossen.

Polymerisation auf Eis für 60 min. Danach für 10 min im Trockenschrank bei 60°C auspolymerisieren.

Anhang D Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen:

- D. Nordmeyer, P. Stumpf, D. Groger, A. Hofmann, S. Enders, S. B. Riese, J. Dervedde, M. Taupitz, U. Rauch, R. Haag, E. Rühl, C. Graf, *Nanoscale* **2014**, *6*, 9646.
- C. Graf, Q. Gao, I. Schütz, C. N. Noufele, W. Ruan, U. Posselt, E. Korotianskiy, D. Nordmeyer, F. Rancan, S. Hadam, A. Vogt, J. Lademann, V. Haucke, E. Rühl, *Langmuir* **2012**, *28*, 7598.
- A. Ostrowski, D. Nordmeyer, A. Boreham, R. Brodewolf, L. Mundhenk, J. W. Fluhr, J. Lademann, C. Graf, E. Rühl, U. Alexiev, A. D. Gruber, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2014**, *10*, 1571.
- A. Ostrowski, D. Nordmeyer, L. Mundhenk, J. W. Fluhr, J. Lademann, C. Graf, E. Rühl, A. D. Gruber, *Nanoscale Research Letters* **2014**, *9*, 7.
- S. Ahlberg, A. Antonopoulos, J. Diendorf, R. Dringen, M. Epple, R. Flöck, W. Goedecke, C. Graf, N. Haberl, J. Helmlinger, F. Herzog, F. Heuer, S. Hirn, C. Johannes, S. Kittler, M. Köller, K. Korn, W. G. Kreyling, F. Krombach, J. Lademann, K. Loza, E. M. Luther, M. Malissek, M. C. Meinke, D. Nordmeyer, A. Paillart, J. Raabe, F. Rancan, B. Rothen-Rutishauser, E. Rühl, C. Schleh, A. Seibel, C. Sengstock, L. Treuel, A. Vogt, K. Weber, R. Zellner, *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2014**, *5*, 1944.
- A. Ostrowski, D. Nordmeyer, A. Boreham, C. Holzhausen, L. Mundhenk, C. Graf, M. Meinke, A. Vogt, S. Hadam, J. Lademann, E. Rühl, U. Alexiev, A. D. Gruber, *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2015**, *6*, 263.

Tagungsbeiträge (Vorträge und Poster):

- D. Nordmeyer, P. Stumpf, D. Gröger, F. Paulus, R. Haag, A. Semisch, C. Richter, A. Hartwig, J. Dervedde, R. Malz, U. Rauch-Kroehnert, J. Schnorr, I. Gemeinhardt, M. Taupitz, C. Graf, E. Rühl, Synthesis and Characterization of Selective Sensor Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging, International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles, Essen, **2011**
- D. Nordmeyer, C. Graf, E. Rühl, Synthesis and Properties of Selective Nanoparticle Probes, First Reporting Colloquium of DFG / SPP1313-2 "Bio-Nano-Responses", Fulda, **2012**
- D. Nordmeyer, N. Fendel, S. Ahlberg, F. Rancan, A. Vogt, J. Lademann, C. Greulich, M. Köller, J. Diendorf, M. Epple, J. Raabe, C. Graf, E. Rühl, Ion Release Kinetics of Triangular Silver Nanoprisms in Aqueous Media and Their Uptake into Cells, Bunsentagung, Karlsruhe, **2013**
- D. Nordmeyer, C. Graf, S. Ahlberg, F. Rancan, M. Laue, J. Lademann, and E. Rühl, Deep Penetration of Amino-functionalized Silica Nanoparticles in Human Skin below Lamina Basalis, Final Colloquium of DFG / SPP1313-2 "Bio-Nano-Responses", Fulda, **2014**

Anhang E Danksagung

Prof. Dr. E. Rühl möchte ich für die ausdauernde Unterstützung bei sämtlichen Fragen und Problemen danken. Zudem möchte ich mich recht herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen während der gesamten Zeit bedanken!

Prof. Dr. C. Graf möchte ich für die unglaublich hohe Hilfsbereitschaft in sämtlichen Situationen während der Doktorarbeit und für die häufigen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken, die mich voran gebracht haben!

Den Bacheloranten und Praktikanten Madlen Schmudde, Sabine Eisold, Emanuel Glitscher, Marianne Muth, Nicole Fendel, Ulrike Koch und Wentao Ruan möchte ich für die Arbeit im Labor danken.

Dr. H. Renz (Charité Berlin), S. Selve (Technische Universität Berlin) und Dr. M. Wollgarten (Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie, Berlin) möchte ich für die Nutzung von Transmissionselektronenmikroskopen danken.

Dr. M. Laue (Robert Koch Institut Berlin) möchte ich ebenfalls für die Nutzung des Transmissionselektronenmikroskops, das Anfertigen von Hautschnitten und zahlreiche Diskussionen danken.

P. Schrade (AG Bachmann) danke ich für das Anfertigen von Zellschnitten und die Nutzung des Transmissionselektronenmikroskops.

A. Schindler (AG Rühl), M. Schmudde (AG Graf) und F. Gerke (AG Rühl) danke ich für die Nutzung des Rasterelektronenmikroskops.

Dr. J. Raabe danke ich für die Betreuung am Strahlrohr PoLux (PSI, Schweiz).

Dr. P. Guttmann danke ich für die Betreuung am Strahlrohr (U41-XM).

S. Ahlberg, Dr. F. Rancan (AG Lademann, AG Blume-Peytavi) und Dr. C. Sengstock (Prof. Dr. M. Köller) danke ich für die Inkubation der Nanopartikel mit Zellsystemen und Haut sowie für zahlreiche gewinnbringende Diskussionen.

S. Thierbach danke ich für die Unterstützung bei sämtlichen technischen Fragen.

Meinen Büro- und Laborkollegen V. Mondes, P. Schmiel, S. Kung danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die wissenschaftlichen Diskussionen.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Rühl danke ich für die entspannte Arbeitsatmosphäre.

Dem DFG-geförderten Schwerpunktprogramm 1313 danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Mein großer Dank gilt meiner Frau, meiner Mutter und meinem Vater ohne deren Unterstützung diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.