

Untersuchung zur biologischen Aktivität funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Jan Klesing

aus Heiligenhaus

Institut für Anorganische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

2012

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von Juni 2009 bis Juni 2012 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie an der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. M. Epple
Prof. Dr. B. Siebers

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Rumann

Tag der Disputation: 25.10.12

Meinen Eltern

Inhalt

1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Einteilung kolloidaler Systeme	3
2.2 DLVO-Theorie	4
2.3 Stabilität und Koagulation.....	8
3 Material und Methoden.....	12
3.1 Experimenteller Teil.....	12
3.1.1 Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln.....	12
3.1.2 Lyophilisation von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln in Gegenwart unterschiedlicher Kryoprotektoren	15
3.1.3 Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit siRNA (anti-EGFP) beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln	16
3.1.4 Darstellung positiv geladener Calciumphosphat-Nanostäbchen zur Transfektion und zur Gen-Stummschaltung	18
3.1.5 Lyophilisation der positiv geladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen in Gegenwart von Trehalose	18
3.1.6 Beladung der positiv geladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen mit EGFP-kodierender DNA.....	19
3.1.7 Beladung der positiv geladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen mit siRNA (anti-EGFP).....	19
3.1.8 Darstellung der Polyethylenimin-stabilisierten, mit DNA beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen	20
3.1.9 Darstellung der Polyethylenimin-stabilisierten, mit siRNA (anti-EGFP) beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat- Nanostäbchen	20

Inhaltsverzeichnis

3.1.10 Zellbiologische Untersuchung zur Transfektion von HeLa- und MG63-Zellen mit EGFP-kodierender DNA	21
3.1.11 Zellbiologische Untersuchung zur Gen-Stummschaltung von HeLa-EGFP-Zellen mit siRNA (anti-EGFP).....	22
3.1.12 Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Test	23
3.1.13 Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit <i>m</i> THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln.....	24
3.1.14 Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten, mit <i>m</i> THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln.....	26
3.1.15 Darstellung von Polyethylenimin-stabilisierten und mit <i>m</i> THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln.....	27
3.1.16 Darstellung von Polyethylenimin-stabilisierten und mit <i>m</i> THPC beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen	29
3.1.17 Bestimmung der Zelltoxizität der <i>m</i> THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel	30
3.1.18 Bestimmung der Bakterientoxizität der <i>m</i> THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel	32
3.1.19 Fällung Chondroitin-4-sulfat-stabilsierter Calciumphosphat-Nanopartikel durch einen kontinuierlichen Prozess	33
3.2 Physikalisch-chemische Methoden	34
3.2.1 Rasterelektronenmikroskopie	34
3.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie	35
3.2.3 Röntgenpulverdiffraktometrie	35
3.2.4 Atomabsorptionsspektroskopie.....	37
3.2.5 Elementaranalyse	37
3.2.6 UV-Vis-Spektroskopie.....	38
3.2.7 Dynamische Lichtstreuung	39
3.2.8 Zetapotential	40
3.2.9 Thermogravimetrie	41
3.2.10 Gefriertrocknung.....	41

4 Ergebnisse und Diskussion	43
4.1 Darstellung und zellbiologische Untersuchung Carboxymethylcellulose-stabilisierter und Nukleinsäure-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel zur Gen-Stummschaltung	43
4.1.1 Transfektion	43
4.1.2 Calciumphosphat-Nanopartikel als Träger-System für die Transfektion	46
4.1.3 Mechanismus der RNA-Interferenz.....	48
4.1.4 Einführung in die Thematik.....	51
4.1.4.1 Darstellung und Charakterisierung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln	53
4.1.4.2 Lyophilisation von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln in Gegenwart unterschiedlicher Kryoprotektoren.	66
4.1.4.3 Zellbiologische Untersuchung zur Gen-Stummschaltung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit siRNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose	71
4.2 Darstellung von positiv geladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen zur Transfektion und zur Gen-Stummschaltung	78
4.2.1 Einführung in die Thematik.....	78
4.2.1.1 Darstellung und Charakterisierung positiv geladener Calciumphosphat-Nanostäbchen	80
4.2.1.2 Transfektionsergebnisse an HeLa- und MG63-Zellen mit EGFP-kodierender DNA.....	92
4.2.1.3 Gen-Stummschaltung an HeLa-EGFP-Zellen mit siRNA (anti-EGFP)	101
4.2.1.4 Umladung der Nukleinsäure-beladenen Nanostäbchen mit Polyethylenimin	107
4.2.2 Zusammenfassung	112

Inhaltsverzeichnis

4.3 Polymer-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel als Trägersysteme für die Photodynamische Therapie	114
4.3.1 Photodynamische Therapie.....	114
4.3.2 Nanopartikel als Trägersysteme in der Photodynamischen Therapie ..	117
4.3.3 Einführung in die Thematik.....	119
4.3.3.1 Herstellung und Untersuchung der phototoxischen Wirkung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit <i>m</i> THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln	121
4.3.3.1.1 Herstellung und Charakterisierung	121
4.3.3.1.2 Diskussion der Zelltests	132
4.3.3.1.3 Diskussion der Bakterientests	139
4.3.3.2 Herstellung und Untersuchung der phototoxischen Wirkung von Carboxymethylcellulose-funktionalisierten, mit <i>m</i> THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln	146
4.3.3.2.1 Herstellung und Charakterisierung	146
4.3.3.2.2 Diskussion der Zelltests	153
4.3.3.2.3 Diskussion der Bakterientests	156
4.3.3.3 Herstellung und Untersuchung der phototoxischen Wirkung von Polyethylenimin-stabilisierten und mit <i>m</i> THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln.....	163
4.3.3.3.1 Herstellung und Charakterisierung	163
4.3.3.3.2 Diskussion der Zelltests	172
4.3.3.3.3 Diskussion der Bakterientests	179
4.3.3.4 Herstellung und Untersuchung der phototoxischen Wirkung von Polyethylenimin-stabilisierten und mit <i>m</i> THPC beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen	184
4.3.3.4.1 Herstellung und Charakterisierung	184
4.3.3.4.2 Diskussion der Zelltests	196
4.3.3.4.3 Diskussion der Bakterientests	201
4.3.4 Zusammenfassung	207

Inhaltsverzeichnis

4.4. Kontinuierliche Fällung Chondroitin-4-sulfat-stabilisierter Calciumphosphat-Nanopartikel.....	211
4.4.1 Einführung in die Thematik.....	211
4.4.2 Herstellung und Charakterisierung.....	213
4.4.3 Zusammenfassung	220
5 Zusammenfassung	221
6 Literatur	224
7 Anhang.....	236

1 Einleitung

Heutzutage ist die Nanotechnologie (*nanos*, griech. = Zwerg) aus vielen Bereichen der aktuellen Forschung nicht mehr wegzudenken. Vor allem in Bereichen der Biomedizin, Oberflächenchemie und der Nanoelektronik sind in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte erzielt worden. Im alltäglichen Gebrauch besitzen viele nanoskalige Beschichtungen wasserabweisenden Charakter oder sind durch ihre nanostrukturierte Oberfläche besonders inert gegenüber äußeren Einflüssen. Diverse Kosmetika und Sonnencremes besitzen nanopartikuläre Zusätze, die zum Schutz vor ultravioletter Strahlung dienen, und/oder der Faltenbildung vorbeugen sollen. Diese kleine Aufzählung an kommerziell erhältlichen nanohaltigen Produkten soll das breit gefächerte Potential dieser Technologie unterstreichen. Definitionsgemäß ist ein Nanometer der milliardste Teil eines Meters. Die Attraktivität der kleinen Teilchen liegt vor allem in ihren physikochemischen Eigenschaften. Da durch Verringerung der Größe eines Materials eine Zunahme des Verhältnisses der Oberfläche zur Volumenphase zu verzeichnen ist, ändern sich automatisch die Grenzflächeneffekte. Die Zunahme der Grenzflächenenergie und die daraus resultierenden Veränderungen mit der Umgebung können Einfluss auf chemische und/oder physikalische Eigenschaften und Prozesse nehmen. Die Modifikation von Materialeigenschaften ist der Grundbaustein neuartiger Verwendungsmöglichkeiten.

Im biomedizinischen Bereich erreicht der Einsatz nanoskaliger Wirkstoffträgersysteme einen besonderen Stellenwert. Die Herausforderung zur Entwicklung optimaler Trägersysteme und ihr erfolgreicher Einsatz in der Medizin liegt in der Aufnahme geeigneter Mengen diverser Wirkstoffe sowie im gezielten Transport zum Wirkungsort als auch in einer exzellenten Biokompatibilität.

Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird der Einsatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln als Trägermaterial für Nukleinsäuren, Photowirkstoffe und Polymere vorgestellt. Weiter wird eine Möglichkeit zur Langzeitlagerung der erhaltenen Dispersionen mittels Lyophilisation in Gegenwart von Kryoprotektoren diskutiert. Neben einer vollständigen Charakterisierung der synthetisierten Systeme schließen sich zellbiologische Untersuchungen an, die in ihrer Wirkung mit dem aktuellen Stand der Literatur verglichen werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Einteilung kolloidaler Systeme

Kolloiddisperse Systeme bestehen aus einer kontinuierlichen Phase, dem sogenannten Dispersionsmittel und der dispergierten Phase.^[1] Hierbei sind die dispergierten Partikel in der kontinuierlichen Phase verteilt und besitzen Dimensionen in der Größenordnung von 1-500 nm.^[2] Man unterscheidet grob zwischen drei Klassen von kolloidalen Systemen. Hierzu gehören die Dispersionskolloide (zweiphasige Systeme), Lösungen von makromolekularen Substanzen (einphasige Systeme) und Assoziationskolloide (einphasige und zweiphasige Systeme).^[3] Bei den zweiphasigen Kolloidsystemen existiert eine Vielfalt an Möglichkeiten, in denen die dispergierte und die kontinuierliche Phase in nahezu allen Aggregatzuständen vorliegen können. Eine Übersicht der wichtigsten Grundtypen liefert Tabelle 1.

Tabelle 1: Beispiele für kolloidale Systeme.

Kontinuierliche Phase	Disperse Phase	Bezeichnung
gasförmig	flüssig	Aerosol (flüssiger Teilchen), Dunst, Nebel
gasförmig	fest	Aerosol (fester Teilchen), Rauch
flüssig	gasförmig	Schaum
flüssig	flüssig	Emulsion
flüssig	fest	Dispersion (Sol, Suspension)
fest	gasförmig	fester Schaum
fest	flüssig	feste Emulsion
fest	fest	festes Sol, fest-fest Dispersion

2.2 DLVO-Theorie

Die wesentlichen Grundzüge der DLVO-Theorie wurden von Derjagin, Landau, Verwey und Overbeek entwickelt.^[4] Diese beschreibt ein Modell zur Stabilität von Dispersionskolloiden. In Abbildung 1 ist der schematische Ladungsaufbau eines kolloidalen Teilchens in Dispersion aufgeführt.

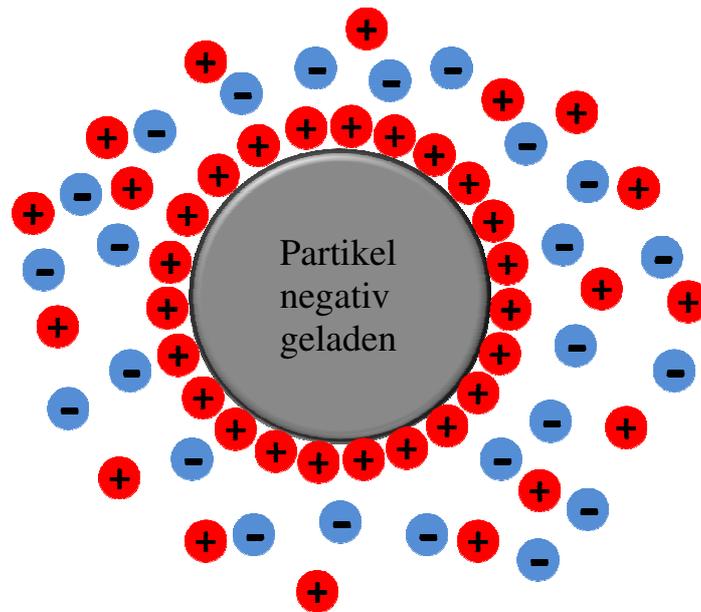


Abbildung 1: Schematische Abbildung des Ladungsaufbaus eines kolloidalen Teilchens in Dispersion.

Um das geladene kolloidale Teilchen herum befindet sich eine elektrochemische Doppelschicht, die eine Kombination aus der Helmholtz- und der Gouy-Chapman-Schicht in sich vereint. Diese teils starre, teils diffuse Doppelschicht wird Stern-Modell genannt und bietet entscheidende Hinweise zur Stabilität von Dispersionskolloiden. In diesem Modell existiert ähnlich wie in der Debye-Hückel-Theorie eine Ionenwolke um das Partikel. Hier besitzen die Ionen eine zur Partikeloberfläche entgegengesetzte Ladung. Die Konzentration der entgegengesetzt geladenen Ionen ist an der Partikeloberfläche wesentlich größer als im Volumen der Lösung. Mit zunehmender Entfernung von der Partikeloberfläche nähert sich die Konzentration der Gegenionen der

Konzentration im Volumen der Lösung an. Diese Ladungswolke, die jedem einzelnen Partikel zukommt, sorgt je nach Art der Lösung und Ausprägung für eine repulsive Wechselwirkung der einzelnen Partikel. Die Stabilität eines kolloidalen Systems ist demnach auf die Natur des Partikels und das umgebende Medium zurückzuführen. Die Stabilität disperser Systeme kann verständlicher in so genannten Potential-Abstandsfunktionen verdeutlicht werden.^[5] Hier wird die Änderung der freien Energie eines Systems ΔG gegen den Abstand der Partikel H aufgetragen (Abbildung 2). Berücksichtigt werden hier vor allem die anziehenden Kräfte (van-der-Waals-Wechselwirkung) (i), und die elektrostatischen Abstoßungskräfte (ii). Die resultierende Gesamtenergie (iii), die eine vollständige Beschreibung der Wechselwirkung des Systems liefert, erhält man durch Addition der Einzelpotentiale. Befindet sich die Gesamtenergie (iii) im positiven Bereich, so kann von einer stabilen Dispersion ausgegangen werden, wohingegen bei einem negativen Verlauf der Gesamtenergiekurve mit einem instabilen System gerechnet werden muss.

In der Realität existiert eine Vielzahl an unterschiedlichen Potential-Abstandsfunktionen, die einen Verlauf zwischen diesen beiden Extrema einnehmen können. Ein kleiner Ausschnitt, der die Empfindlichkeit unterschiedlicher kolloidaler Systeme wiedergibt, ist in Abbildung 2 dargestellt. Diagramm 2 a zeigt ein stabiles kolloidales System mit verhältnismäßig großen Abstoßungskräften. Hier ist der diffuse Teil der elektrochemischen Doppelschicht stark ausgeprägt. Dies hat zur Folge, dass die elektrostatische Abstoßung zwischen den Partikeln wesentlich größer als die van-der-Waals-Wechselwirkung ist. Durch diese Kräfte entsteht ein primäres Maximum P. Je höher der Wert ΔG für P ist, desto größer ist die Barriere, die überwunden werden muss, um die Kolloide zur Agglomeration zu führen. In Diagramm 2 b ist der repulsive Anteil der Doppelschicht im Vergleich zu 2 a stark reduziert. Durch den geringen Wert von P kann das kolloidale System durch geringe

Theoretische Grundlagen

Energieaufnahme das primäre Maximum durchlaufen und das primäre Minimum M_1 besetzen. In Diagramm 2 c ist die Abwesenheit einer stabilisierenden Doppelschicht aufgeführt. Die Potentialkurve verläuft im negativen Bereich, sodass kein repulsiver Anteil wirksam ist. Diese Beobachtung hat zur Konsequenz, dass das vorliegende System instabil ist und koaguliert. In Diagramm 2 d wird ein teilkoaguliertes kolloidales System vorgestellt. Neben einem verhältnismäßig großen Wert für P ist zusätzlich ein sekundäres Minimum M_2 präsent. Im Bereich dieser Energiemulde um M_2 zeigt sich eine gesteigerte Viskosität der kolloidalen Dispersion.

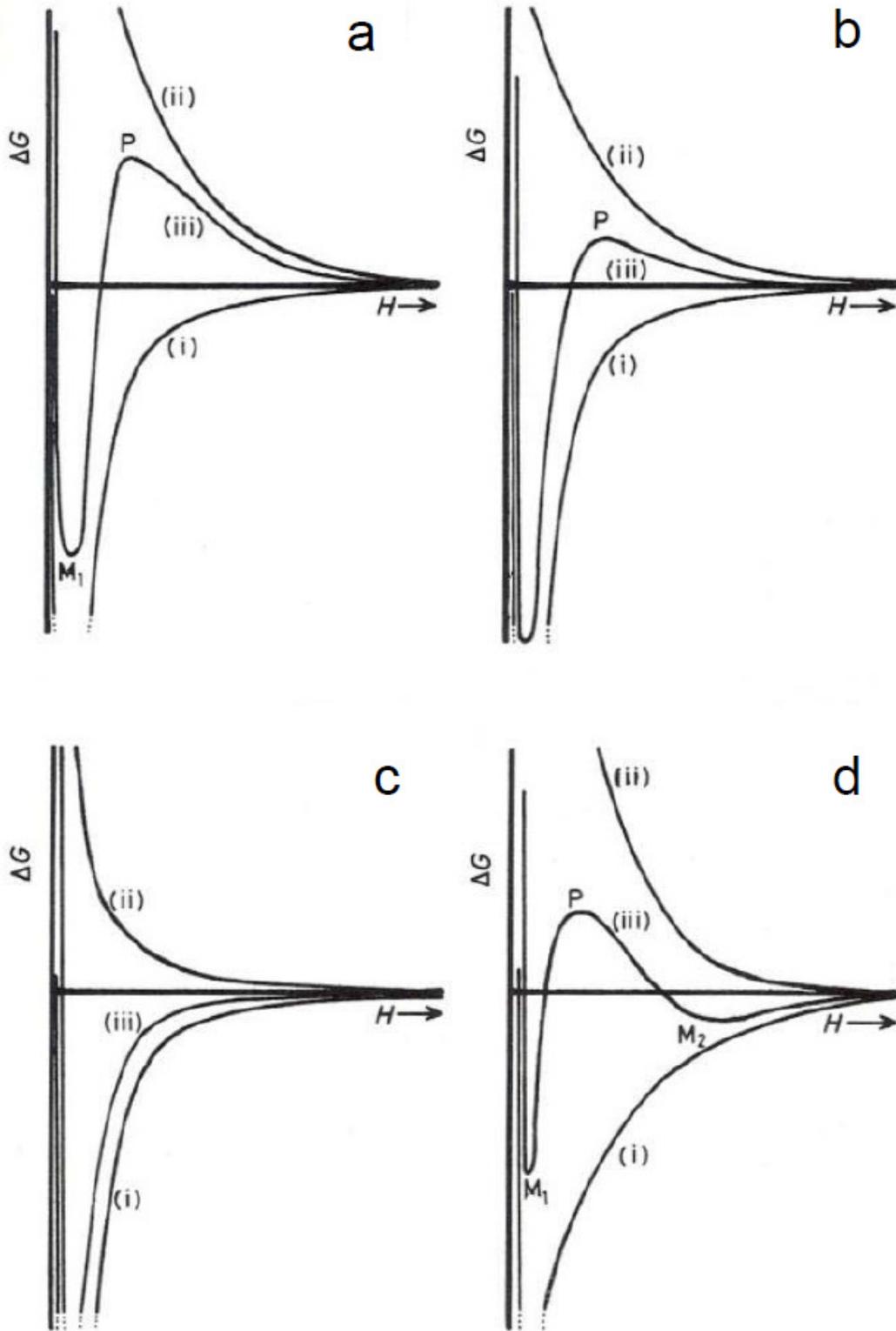


Abbildung 2: Energie-Abstandskurven zur Erläuterung der DLVO-Theorie.^[5]

2.3 Stabilität und Koagulation

Es stellt sich die Frage, inwiefern es möglich ist, stabile Dispersionen zur Koagulation zu bewegen bzw. wie man potentiell instabile Dispersionen stabilisieren kann. Aus thermodynamischer Sicht ist jedes kolloidale System bestrebt, einen Zustand geringster Energie einzunehmen. Der energetisch günstigste Zustand ist hier die Koagulation. Die Alterungsgeschwindigkeit hängt von einem komplexen Zusammenspiel von Grenzflächenenergie und Volumenenergie ab.^[2] Die Schlussfolgerung der thermodynamischen Betrachtung ist, dass lediglich ideal monodisperse Systeme eine unendlich lange Beständigkeit aufweisen. Formal ist dies in Gleichung 1 gezeigt.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{qDc_0}{\delta} \left[e^{\frac{\gamma}{f(r_1)RT}} - e^{\frac{\gamma}{f(r_2)RT}} \right] \quad (1)$$

$\frac{dm}{dt}$: Alterungsgeschwindigkeit

D : Diffusionskoeffizient

c_0 : Löslichkeit der makroskopischen Phase

γ : Grenzflächenspannung

T : Temperatur

r : Radius der kolloidalen Teilchen

δ : Viskosität

Da es allerdings praktisch unmöglich ist, ideal monodisperse Systeme zu erhalten, ist jedes System über kurz oder lang der Koagulation ausgesetzt. Dennoch existieren Methoden, die diesen Prozess hinauszögern können. Für die Stabilisierung von kolloidalen Systemen sind drei Möglichkeiten bekannt. Eine elegante Methode stellt die elektrostatische Stabilisierung dar. Hier muss die Oberfläche des zu stabilisierenden Partikels mit Ladungen ausgestattet sein. Wie

bereits erwähnt, kommt es in Dispersionen zur Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht, die aufgrund der repulsiven Wechselwirkung der diffusen Ionenschicht die einzelnen Partikel auf Distanz hält. Eine weitere Möglichkeit liefert die sterische Stabilisierung von Kolloiden. Hier werden makromolekulare Stoffe wie Polymere oder Tenside auf der Partikeloberfläche adsorbiert. Diese langkettigen Moleküle bilden eine sterisch anspruchsvolle Hülle um das Partikel und hindern ein sich annäherndes kolloidales Teilchen, sich bis zu einem bestimmten Abstand zu nähern. Um dies zu verdeutlichen, dient Abbildung 3.

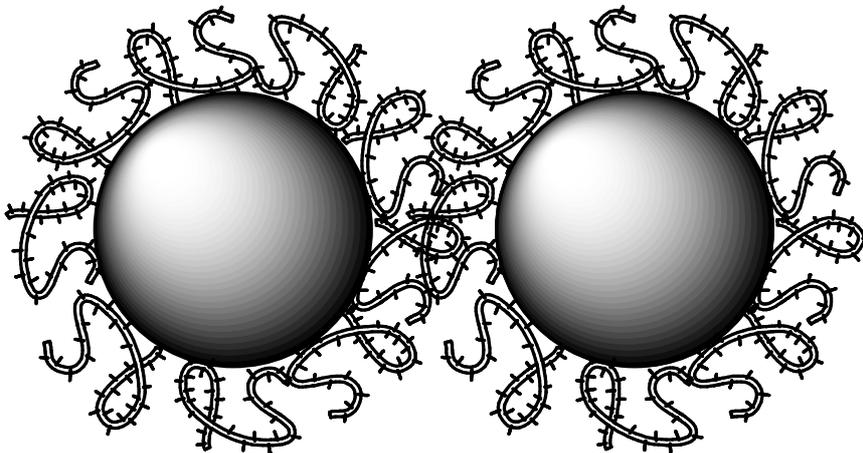


Abbildung 3: Schematische Abbildung der sterischen Stabilisierung.

Eine Kombination aus der elektrostatischen und der sterischen Stabilisierung liefert die elektrosterische Stabilisierung. Hier werden Polyelektrolyte als makromolekulare Adsorbentien verwendet. Diese Methode vereint die Vorteile der sterischen und der elektrostatischen Stabilisierung. Eine weitere Methode bildet die Verminderungsstabilisierung. Hier liegt eine so hohe Polymerkonzentration vor, dass die einzelnen Kolloide durch die makromolekularen Substanzen innerhalb der Dispersion voneinander getrennt bleiben. Bei Dispersionskolloiden handelt es sich im Allgemeinen um sehr empfindliche Systeme, bei denen die einzelnen Parameter genau aufeinander

abgestimmt sein müssen. So kann eine zu geringe bzw. zu hohe Polymerkonzentration zur Instabilität des Gesamtsystems führen und die Agglomeration auslösen. Ein vereinfachtes Schema ist in Abbildung 4 gezeigt, in der unterschiedliche Polymerkonzentrationen zur Stabilisierung oder zur Koagulation des Systems führen.

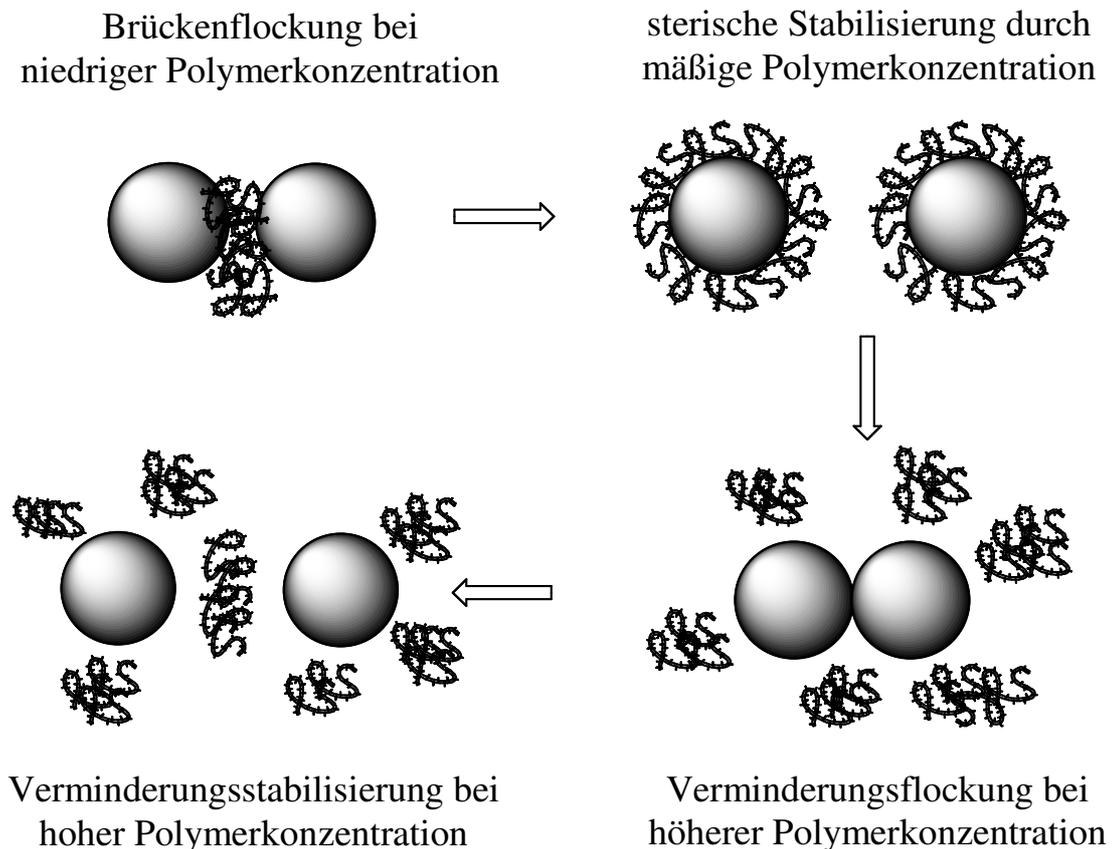


Abbildung 4: Unterschiedliche Polymerkonzentrationen zur Stabilisierung oder Koagulation von dispergierten Partikeln.

Um einen qualitativen Ausdruck für die Stabilisierung einzelner Dispersionskolloide zu erhalten, bedient man sich der Theorie des Zetapotentials. Wie bereits erwähnt, kommt es im Fall der elektrostatischen bzw. der elektrosterischen Stabilisierung zur Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht. Diese setzt sich aus einer starren Sternschicht und einer diffusen Schicht zusammen. Hierbei besitzen die jeweiligen

Ionen eine zur Partikeloberfläche entgegengesetzte Ladung. Bewegen sich die Partikel durch die kontinuierliche Phase, so wandern die starre Stern-Schicht und ein Teil der diffusen Schicht mit den Partikeln. Der Radius des gesamten Verbundes, der sich mit dem Partikel bewegt, wird als Scherradius bezeichnet. Im Bereich der starren Schicht nimmt der Potentialverlauf einen linearen Charakter an, während im diffusen Teil ein exponentieller Abfall zu verzeichnen ist. Die Potentialdifferenz zwischen dem Scherradius und der Volumenphase bildet schließlich das Zetapotential. Dies ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Ist der Betragswert des Zetapotentials größer als 30 mV, so liegt eine stabile Dispersion vor.^[6] Alle Werte zwischen +30 mV und -30 mV können keine Stabilität gewährleisten und die betreffenden Systeme neigen zur Agglomeration.

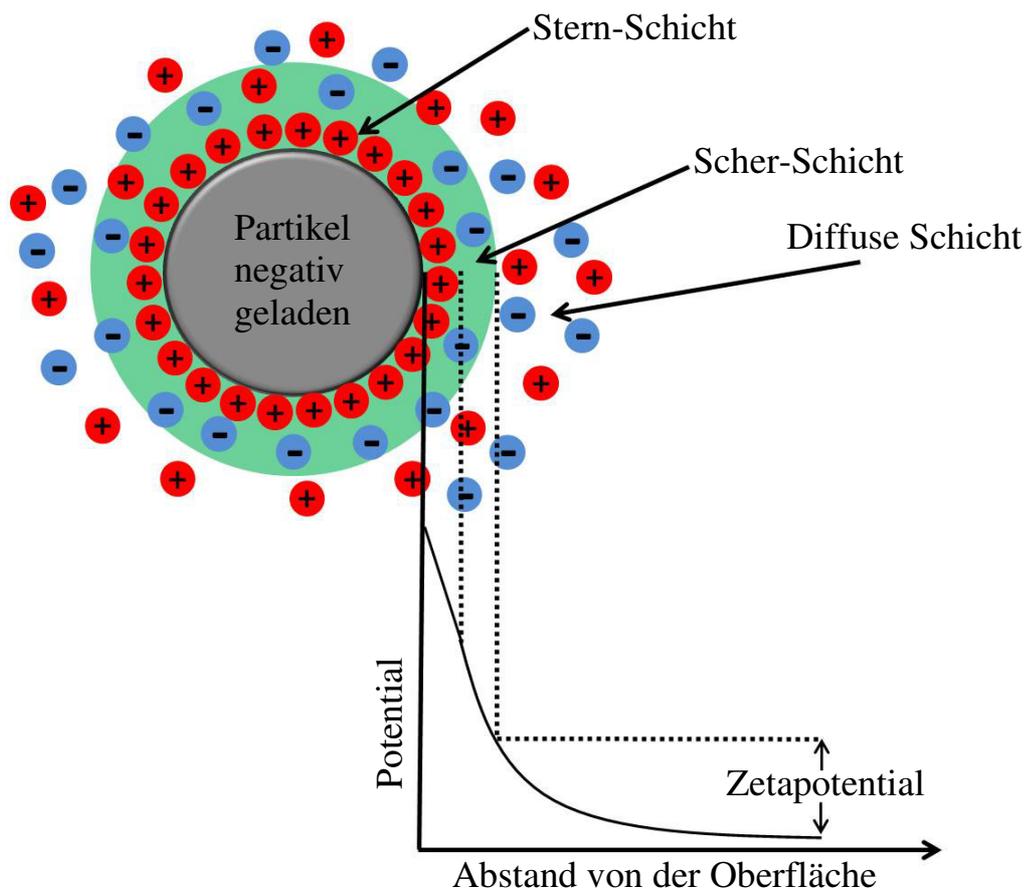


Abbildung 5: Schematische Darstellung zur Erläuterung der Theorie des Zetapotentials.

3 Material und Methoden

3.1 Experimenteller Teil

3.1.1 Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln

Die kontinuierliche Fällung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln gelingt durch den Gebrauch mehrerer Peristaltikpumpen. Hier können definierte Volumina der eingesetzten Lösungen über einen bestimmten Zeitraum dosiert werden. Alle Lösungen werden in Reinstwasser angesetzt. Die pH-Werte der Calcium-, der Phosphat- und der Carboxymethylcellulose-Lösungen werden mit Ammoniak eingestellt. Die Lösungen besitzen die folgenden Konzentrationen:

Calcium-L-Lactat Pentahydrat (6 mM, pH = 9, Fluka)

Di-Ammoniumhydrogenphosphat (3,6 mM, pH = 9, Merck)

Carboxymethylcellulose (2 g L⁻¹, pH = 10, 90 kDa, Sigma)

DNA, *free acid, crude oligonucleotides from herring sperm* (1 g L⁻¹, pH = 7, < 50 bp, Sigma)

Zur Entfernung potentieller Verunreinigungen wird die DNA-Lösung vor dem Gebrauch über einen Faltenfilter filtriert. Die zur Funktionalisierung eingestellten Volumenverhältnisse von Carboxymethylcellulose (CMC) und DNA und die resultierenden Massenanteile sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Material und Methoden

Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der eingesetzten CMC- und DNA-Volumenanteile mit unterschiedlichen Massenverhältnissen.

Volumenverhältnis CMC:DNA	CMC-Volumen (2 g L⁻¹) / mL	DNA-Volumen (1 g L⁻¹) / mL	Gew.-% CMC	Gew.-% DNA
10:0	10	0	100	0
10:0,25	10	0,25	98,8	1,2
10:0,5	10	0,5	97,6	2,4
10:1	10	1	95,2	4,8
10:2,5	10	2,5	88,9	11,1
10:5	10	5	80,0	20,0
10:7,5	10	7,5	72,7	27,3
10:10	10	10	66,7	33,3
0:10	0	10	0	100

Die Calcium- und die Phosphat-Lösung werden mit einem Volumenstrom von 30 mL min⁻¹ aus den Vorratsgefäßen gepumpt. Die Schlauchlänge, in der die Keimbildung einsetzt, beträgt 50 mm, der innere Durchmesser des Schlauches beträgt 2,54 mm. Die Calciumphosphat-Keimbildungszeit beträgt somit 0,25 s. Über einen weiteren Zufluss wird die Lösung, bestehend aus Carboxymethylcellulose und DNA, mit einem Volumenstrom von 10 mL min⁻¹ zudosiert. Der schematische Aufbau der Fällungsapparatur ist in Abbildung 6 dargestellt.

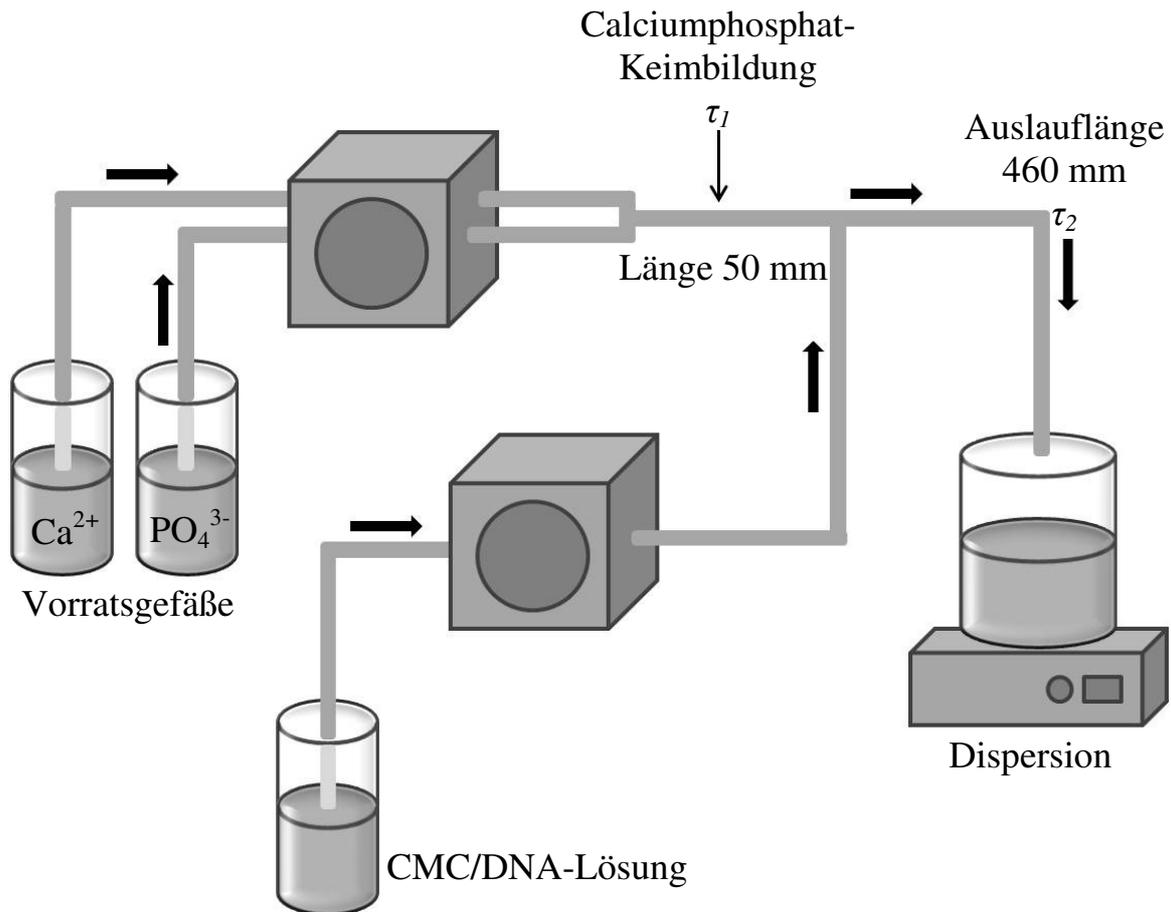


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Fällungsreaktors zur Darstellung Carboxymethylcellulose-stabilisierter und DNA-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die resultierende Dispersion wird in einem Kunststoffgefäß aufgefangen. Die Aufreinigung erfolgt mittels Ultrazentrifugation für 30 min bei 66000 g. Der Überstand wird entfernt, der Rückstand mit einer äquivalenten Menge an Reinstwasser aufgenommen und redispergiert.

3.1.2 Lyophilisation von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln in Gegenwart unterschiedlicher Kryoprotektoren

Die in 3.1.1 gefällten Calciumphosphat-Nanopartikel können in Gegenwart von Kryoprotektoren lyophilisiert werden. Es wurden die folgenden Substanzen in ihrer Wirkung als Kryoprotektor untersucht:

α -Lactose-Monohydrat (Sigma)

D-Mannitol (Sigma)

Saccharose (Sigma)

D-(+)-Trehalose-Dihydrat (Fluka)

Für die Lyophilisation werden 10 mg des eingesetzten Kryoprotektors in 1 mL der erhaltenen Dispersion gelöst. Die Kryoprotektor-haltige Calciumphosphat-Dispersion wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Entfernung des Wassers erfolgt für 24 h bei einer Stellflächentemperatur von $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem Druck von 0,31 mbar. Der resultierende Lyokuchen wird im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Regeneration der Dispersion erfolgt durch Zugabe von 1 mL Reinstwasser, gefolgt von kurzem Schütteln.

3.1.3 Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit siRNA (anti-EGFP) beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln

Die Herstellung der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit siRNA funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel gelingt mit dem Fällungsaufbau nach Sokolova *et al.* Die pH-Werte der Calcium-, der Phosphat- und der Carboxymethylcellulose-Lösungen werden mit Ammoniak eingestellt. Die Lösungen besitzen die folgenden Konzentrationen:

Calcium-L-Lactat Pentahydrat (6 mM, pH = 9, Fluka)

Di-Ammoniumhydrogenphosphat (3,6 mM, pH = 9, Merck)

Carboxymethylcellulose (2 g L^{-1} , pH = 10, 90 kDa, Sigma)

siRNA (anti-EGFP, *sense*-Strang: 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3' und *antisense*-Strang: 5'-AUGAACUUCAGGGUCAGCUUGC-3' (1 g L^{-1} , $M_w = 14021,4 \text{ g mol}^{-1}$, Invitrogen, Paisley, UK))

Die Calcium- und die Phosphat-Lösungen werden über eine Peristaltikpumpe mit einer Pumpgeschwindigkeit von 50 mL min^{-1} in ein Kunststoffgefäß gepumpt und stark gerührt. Für die Funktionalisierung mit Carboxymethylcellulose und siRNA werden bestimmte Volumina der unfunktionalisierten Calciumphosphat-Suspension mit einer Spritze entnommen und zu einer Polymervorlage mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von CMC:siRNA gegeben (Tabelle 3).

Material und Methoden

Tabelle 3: Zugegebene Volumina der einzelnen Komponenten zur Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit siRNA (anti-EGFP) funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Komponente	10:0,25	10:0,5	10:1	10:2,5	10:5	10:7,5	10:10
CaP / μL	943	943	472	283	189	189	189
CMC / μL	153,3	149,6	71,4	39,3	21,0	18,0	15,7
siRNA / μL	3,8	7,6	7,2	7,9	10,5	13,5	15,7

Die resultierenden siRNA-Mengen betragen für die Zelltests 0,13 μg , 0,25 μg , 0,48 μg , 0,88 μg , 1,76 μg , 2,27 μg und 2,64 μg pro *well*.

Für die Lyophilisation werden 2 mg Trehalose-Dihydrat in 200 μL der erhaltenen Dispersion gelöst. Die Kryoprotektor-haltige Calciumphosphat-Dispersion wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Entfernung des Wassers erfolgt für 24 h bei einer Stellflächentemperatur von -7 °C und einem Druck von 0,31 mbar. Der resultierende Lyokuchen wird im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Die Regeneration der Dispersion erfolgt durch Zugabe einer äquivalenten Menge an Reinstwasser.

3.1.4 Darstellung positiv geladener Calciumphosphat-Nanostäbchen zur Transfektion und zur Gen-Stummschaltung

1 g der 6%igen Ostim[®]-Suspension in Wasser (aap, Dieburg, 60 mg Hydroxylapatit) werden mit Reinstwasser auf ein Volumen von 20 mL Wasser verdünnt.^[7] 2 mL dieser Suspension werden mit 18 mL einer Polyethylenimin-Lösung (PEI verzweigt, 2 g L⁻¹, pH = 9-10, 25 kDa, Sigma) versetzt. Die PEI-haltige Ostim[®]-Suspension wird für 3 min mit dem Ultraschallprozessor dispergiert (Sonotrode 7, 50 % Amplitude, 0,8 Pulse). Die erhaltene Dispersion wird für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und der Rückstand mit einem äquivalenten Volumen an Reinstwasser aufgenommen. Der Rückstand wird bei gleichen Parametern für 2 min redispergiert.

3.1.5 Lyophilisation der positiv geladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen in Gegenwart von Trehalose

Die in 3.1.4 dargestellten Calciumphosphat-Nanostäbchen können in Gegenwart von Trehalose lyophilisiert werden.

Dazu werden 10 mg Trehalose-Dihydrat (Fluka) in 1 mL der erhaltenen Dispersion gelöst. Die Kryoprotektor-haltige Calciumphosphat-Dispersion wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Entfernung des Wassers erfolgt für 24 h bei einer Stellflächentemperatur von -7 °C und einem Druck von 0,31 mbar. Der resultierende Lyokuchen wird im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Regeneration der Dispersion erfolgt durch Zugabe von 1 mL Reinstwasser.

3.1.6 Beladung der positiv geladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen mit EGFP-kodierender DNA

Für die Beladung wird 1 mL der kationischen Calciumphosphat-Nanostäbchen-Dispersion aus 3.1.4 mit 6,25 μL , 12,5 μL , 18,8 μL , 25 μL , 31,3 μL , 37,5 μL , 62,5 μL , 75 μL , 125 μL , 150 μL , 200 μL , 250 μL oder 350 μL der EGFP-kodierenden DNA-Lösung (1 mg mL^{-1} , pcDNA3-EGFP, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) versetzt. Die DNA-Konzentration in jeder Probe, die mit x μL der DNA-Lösung behandelt wurde, berechnet sich nach $w(\text{DNA}) = x/(1 + x/1000)$ $\mu\text{g mL}^{-1}$. Die Hydroxylapatit-Konzentration der Stammlösung beträgt 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sodass sich die Endkonzentration an Hydroxylapatit in der mit DNA beladenen Dispersion mit $w(\text{Hydroxylapatit}) = 300/(1 + x/1000)$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ berechnen lässt.

3.1.7 Beladung der positiv geladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen mit siRNA (anti-EGFP)

Für die Beladung wird 1 mL der kationischen Calciumphosphat-Nanostäbchen-Dispersion aus 3.1.4 mit 1,28 μL , 2,55 μL , 3,84 μL , 5,10 μL , 6,39 μL , 7,65 μL , 10,2 μL , 12,8 μL , 15,3 μL , 25,5 μL , 30,6 μL , 40,8 μL , 51,0 μL oder 71,4 μL der siRNA-Lösung (anti-EGFP, 350 μM , 4,9 mg mL^{-1} , *sense*-Strang: 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3' und *antisense*-Strang: 5'-AUGAACUUCAGGGUCAGCUUGC-3' ($M_w = 14021,4$ g mol^{-1} , Invitrogen, Paisley, UK)) versetzt.

Die siRNA-Konzentration in jeder Probe, die mit x μL der siRNA-Lösung behandelt wurde, berechnet sich nach $w(\text{siRNA}) = 4,9x/(1 + x/1000)$ $\mu\text{g mL}^{-1}$. Die Hydroxylapatit-Konzentration der Stammlösung beträgt 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sodass sich die Endkonzentration an Hydroxylapatit in der mit siRNA beladenen Dispersion mit $w(\text{Hydroxylapatit}) = 300/(1 + x/1000)$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ berechnen lässt.

3.1.8 Darstellung der Polyethylenimin-stabilisierten, mit DNA beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen

Die Herstellung von Polyethylenimin-stabilisierten, mit DNA beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen erfolgt durch die Zugabe von 108 μL der pcDNA3-EGFP-Lösung (1 mg mL^{-1}) zu 600 μL der kationischen Calciumphosphat-Nanostäbchen-Dispersion aus 3.1.4. Nach 30 min Inkubation erfolgt die Umladung durch die Zugabe von 40 μL einer Polyethylenimin-Lösung (PEI verzweigt, 2 g L^{-1} , $\text{pH} = 8,5$, 25 kDa, Sigma). Die resultierende Hydroxylapatit-Konzentration liegt damit bei $300 \cdot 600/748 = 241 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Die finale DNA-Konzentration beläuft sich auf $108/0,748 = 144 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Damit liegt die resultierende DNA-Menge für die Transfektionsversuche bei 5,4 $\mu\text{g pro well}$.

3.1.9 Darstellung der Polyethylenimin-stabilisierten, mit siRNA (anti-EGFP) beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen

Die Herstellung von Polyethylenimin-stabilisierten, mit siRNA (anti-EGFP) beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen erfolgt durch die Zugabe von 10 μL der siRNA-Lösung ($350 \text{ } \mu\text{M}$, $4,9 \text{ mg mL}^{-1}$) zu 300 μL der kationischen Calciumphosphat-Nanostäbchen-Dispersion aus 3.1.4. Nach 30 min Inkubation erfolgt die Umladung durch die Zugabe von 20 μL einer Polyethylenimin-Lösung (PEI verzweigt, 2 g L^{-1} , $\text{pH} = 8,5$, 25 kDa, Sigma).

Die resultierende Hydroxylapatit-Konzentration liegt damit bei $300 \cdot 300/330 = 273 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Die siRNA-Menge beläuft sich auf $4,9 \cdot 10/0,330 = 149 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Damit liegt die resultierende siRNA-Menge für die Genstummschaltungsversuche bei 5,55 $\mu\text{g pro well}$.

3.1.10 Zellbiologische Untersuchung zur Transfektion von HeLa- und MG63-Zellen mit EGFP-kodierender DNA

Für die Transfektion mit EGFP-kodierender DNA werden HeLa- (Zervix-Epithelzelllinie) und MG63-Zellen (humane Osteoblasten-ähnliche Zellen) bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre in DMEM (angereichert mit 10 % fetalem bovines Serum (FBS), 100 U mL⁻¹ Penicillin und 100 U mL⁻¹ Streptomycin) kultiviert. Die Zellen werden 12 h vor den Transfektionsexperimenten trypsinisiert und in eine 24-*well*-Multititerplatte mit einer Zelldichte von 5·10⁴ Zellen pro *well* ausgesät. Für die Transfektion werden 500 µL des Zellkulturmediums mit 40 µL der EGFP-DNA-haltigen Dispersion versetzt. Von dieser Mischung werden 500 µL entnommen und zur Zelllinie gegeben. Die Transfektion mit LipofectaminTM 2000 erfolgt nach den Herstellerangaben in einer 24-*well*-Multititerplatte. Der berechnete Anteil an DNA für die Transfektion mit LipofectaminTM 2000 liegt bei 1,0 µg pro *well*. Für alle DNA-haltigen Dispersionen erfolgt der Austausch des Mediums durch frisches Zellkulturmedium nach 7 h. Die Transfektionseffizienz wird mittels durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen 48-72 h nach Zugabe der DNA-haltigen Partikelsysteme bestimmt. Die Transfektionseffizienz wird aus dem Quotienten aller fluoreszierenden Zellen nach erfolgter Transfektion und der Anzahl aller Kontrollzellen gebildet (Gleichung 2).

$$\frac{\text{Anzahl der fluoreszierenden Zellen nach der Transfektion}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \cdot 100 \%$$

(2)

Die zellbiologischen Untersuchungen wurden von Frau M. Sc. Biologie S. Chernousova durchgeführt.

3.1.11 Zellbiologische Untersuchung zur Gen-Stummschaltung von HeLa-EGFP-Zellen mit siRNA (anti-EGFP)

HeLa-EGFP-Zellen (eine genetisch modifizierte Zervix-Epithelzelllinie, die das *enhanced green fluorescent protein* exprimiert) werden bei 37 °C und 10%iger CO₂-Atmosphäre in DMEM (angereichert mit 10 % fetalem bovines Serum (FBS) und G418-Sulfat (Endkonzentration im Medium 50 mg mL⁻¹)) kultiviert. Die Zellen werden 12 h vor den Gen-Stummschaltungsexperimenten trypsinisiert und in eine 24-*well*-Multititerplatte mit einer Zelldichte von 5·10⁴ Zellen pro *well* ausgesät. Für die Gen-Stummschaltungsexperimente werden 500 µL des Zellkulturmediums mit 40 µL der siRNA-haltigen Dispersion versetzt. Von dieser Mischung werden 500 µL entnommen und zur Zelllinie gegeben.

Die Gen-Stummschaltung mit LipofectaminTM 2000 erfolgt nach den Herstellerangaben in einer 24-*well*-Multititerplatte. Der berechnete Anteil an siRNA für die Gen-Stummschaltung mit LipofectaminTM 2000 liegt bei 0,279 µg pro *well*. Für alle siRNA-haltigen Dispersionen erfolgt der Austausch des Mediums durch frisches Zellkulturmedium nach 7 h. Die Gen-Stummschaltungseffizienz wird mittels durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen 48-72 h nach Zugabe der siRNA-haltigen Partikelsysteme bestimmt. Die Quantifizierung der Gen-Stummschaltungseffizienz erfolgt aus der Differenz des prozentualen Anteils der nicht fluoreszierenden Zellen nach erfolgter Gen-Stummschaltung mit siRNA und des prozentualen Anteils der nicht fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle, dividiert durch den Gesamtanteil aller fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle (Gleichung 3). Die zellbiologischen Untersuchungen wurden von Frau M. Sc. Biologie S. Chernousova durchgeführt.

$$\frac{\left(\frac{\text{Anteil der nicht fluoreszierenden Zellen nach erfolgter Transfektion}}{\text{Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}} \right) - \left(\frac{\text{Anteil der nicht fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}}{\text{Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}} \right)}{\text{Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}} \cdot 100 \%$$

(3)

3.1.12 Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Test

Die Zellvitalität der transfizierten Zellen wird 48-72 h nach erfolgter Transfektion mittels MTT-Test bestimmt. Dazu wird MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Sigma) in PBS (5 mg mL^{-1}) gelöst und mit Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1 mg mL^{-1} verdünnt. $300 \mu\text{L}$ des Zellkulturmediums der transfizierten Zellen werden entnommen, durch die MTT-Lösung ersetzt und die Zellen für 1-2 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5%iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Anschließend werden $300 \mu\text{L}$ DMSO zu den Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubation werden $100 \mu\text{L}$ der Lösung entnommen und bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch analysiert (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finnland). Zur Bestimmung der Zellvitalität wird die Absorption der transfizierten Zellen auf die der Kontrolle normalisiert. Die zellbiologischen Untersuchungen wurden von Frau M. Sc. Biologie S. Chernousova durchgeführt.

3.1.13 Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln

Zur Darstellung der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel werden eine Calcium-L-Lactat-Lösung mit der Konzentration $5,54 \text{ g L}^{-1}$ (18 mM, Fluka) und eine Di-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung der Konzentration $1,426 \text{ g L}^{-1}$ (10,8 mM, Merck) angesetzt. Für das Biopolymer Carboxymethylcellulose wird eine Konzentration von 2 g L^{-1} (90 kDa, Sigma) gewählt. Alle Lösungen werden in Reinstwasser angesetzt und mit Ammoniak auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Die Lösung des verwendeten Photosensibilisators Temoporfin (*m*THPC) wird in 2-Propanol angesetzt. Die Konzentration beträgt $c = 1 \text{ g L}^{-1}$ ($1,47 \text{ mmol L}^{-1}$). Zur Herstellung der Nanopartikel werden 5 mL ($54 \text{ } \mu\text{mol}$) der Phosphat-Lösung in einem Becherglas vorgelegt. Dann wird 1 mL ($1,47 \text{ } \mu\text{mol}$) des in 2-Propanol gelösten Photosensibilisators zugegeben und für 1 min gerührt. Diese Lösung wird mit einer Spritze aufgezogen und zusammen mit der Calcium-L-Lactat- und der Polymerlösung in eine Wasservorlage von 20 mL Reinstwasser gegeben. Die Zugabe der Calcium- und der Polymerlösung erfolgt über eine Peristaltikpumpe mit einer Pumpgeschwindigkeit von 5 mL min^{-1} für 1 min. Die parallele Zugabe des Phosphat-*m*THPC-Systems erfolgt ebenfalls über einen Zeitraum von 1 min. Die Dispersion wird für 20 min schwach gerührt. Zur Aufreinigung wird die Dispersion mit der Ultrazentrifuge für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Spritze entfernt und verworfen. Das erhaltene Pellet wird mit 20 mL Reinstwasser aufgenommen und mit dem Ultraschalldisperser redispergiert. Dafür wird das Pellet zunächst mit einem Spatel vorsichtig zerkleinert. Das Redispergieren mit dem Ultraschalldisperser erfolgt mit der Sonotrode 7, einer Amplitude von 60 % und einem Pulse von 0,8 für 2 min. Zur weiteren Aufreinigung wird diese Dispersion erneut für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der farblose Überstand

wird entfernt und das Pellet mit 20 mL Reinstwasser aufgenommen. Es wird bei gleichen Parametern redispergiert und die gelbe Dispersion mit 80 mL Reinstwasser (Verdünnung 1:4) in ein Becherglas überführt. Die Größenverteilung sowie das Zetapotential werden mit dem Zetasizer charakterisiert. Die Farbstoffquantifizierung erfolgt UV-Vis-spektroskopisch anhand einer Kalibrationsgeraden mit unterschiedlichen Mengen an *m*THPC in einer verdünnten Carboxymethylcellulose-Lösung (Abbildung 7).

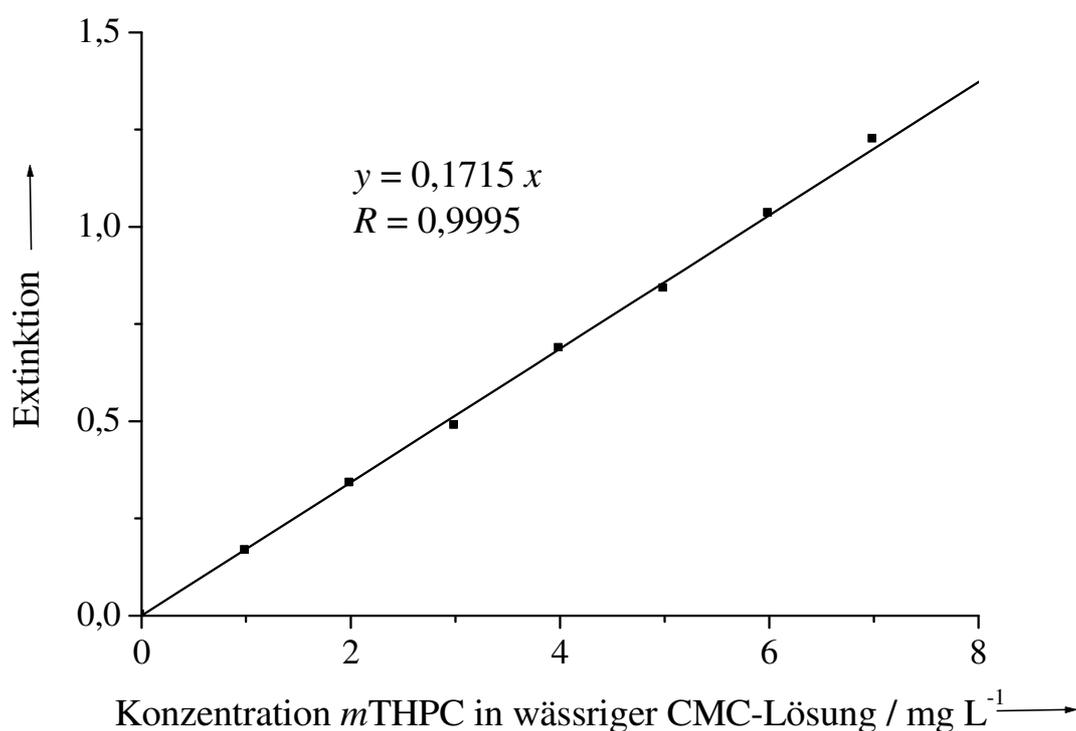


Abbildung 7: Kalibrationsgerade definierter Mengen an *m*THPC in wässriger Carboxymethylcellulose-Lösung zur Bestimmung der Farbstoffkonzentration an den Partikeln.

Die Lyophilisation der erhaltenen Dispersion in Gegenwart von Lactose erfolgt wie bereits in 3.1.5 beschrieben.

Dazu werden 10 mg Lactose-Dihydrat (Sigma) in 1 mL der erhaltenen Dispersion gelöst. Die Kryoprotektor-haltige Calciumphosphat-Dispersion wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Entfernung des Wassers erfolgt für

24 h bei einer Stellflächentemperatur von $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem Druck von $0,31\text{ mbar}$. Der resultierende Lyokuchen wird im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Ausbeute an Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln lag bei 310 mg L^{-1} . Durch den thermogravimetrisch ermittelten Mineralanteil ($61,3\%$) lässt sich eine Ausbeute an Calciumphosphat-Nanopartikeln von $310\text{ mg L}^{-1} \cdot 0,613 = 190\text{ mg L}^{-1}$ berechnen. Nach erfolgter Verdünnung mit Reinstwasser im Verhältnis 1:4 lag die Calciumphosphat-Konzentration bei 38 mg L^{-1} .

3.1.14 Darstellung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln

Die Umladung der in 3.1.13 hergestellten Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel gelingt mit Polyethylenimin. Dies geschieht in Reinstwasser mit einer Konzentration von 2 g L^{-1} (PEI verzweigt, $\text{pH} = 10$, 25 kDa , Sigma). Für die Umladung werden 20 mL der aufgereinigten Dispersion mit $2,5\text{ mL}$ der Polyethylenimin-Lösung versetzt und langsam gerührt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Ultrazentrifugation für 30 min bei 66000 g . Der Überstand wird entfernt und der Rückstand mit 20 mL Reinstwasser aufgenommen. Das Pellet wird mit einem Spatel vorsichtig zerkleinert und mittels Ultraschallprozessor für $1,5\text{ min}$ redispergiert. Die Größenverteilung sowie das Zetapotential werden mit dem Zetasizer charakterisiert.

Die Lyophilisation der erhaltenen Dispersion in Gegenwart von Trehalose erfolgt wie bereits in 3.1.5 beschrieben.

Die gravimetrisch bestimmte Ausbeute an Carboxymethylcellulose-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln lag bei 34 mg L^{-1} . Durch den

thermogravimetrisch ermittelten Mineralanteil (52,2 %) lässt sich eine Ausbeute an Calciumphosphat-Nanopartikeln von $34 \text{ mg L}^{-1} \cdot 0,522 = 18 \text{ mg L}^{-1}$ berechnen.

3.1.15 Darstellung von Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln

Zur Darstellung der Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel werden eine Calcium-L-Lactat-Lösung mit der Konzentration $5,54 \text{ g L}^{-1}$ (18 mM, Fluka), eine Di-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung der Konzentration $1,426 \text{ g L}^{-1}$ (10,8 mM, Merck) und eine Polyethylenimin-Lösung der Konzentration 2 g L^{-1} (PEI verzweigt, pH = 10, 25 kDa, Sigma) angesetzt. Die Calcium- und die Phosphat-Lösung werden über eine Peristaltikpumpe mit einer Pumpgeschwindigkeit von 5 mL min^{-1} in eine Wasservorlage von 20 mL gepumpt. Parallel dazu erfolgt die Zugabe der Polyethylenimin-Lösung mit einer Pumpgeschwindigkeit von 7 mL min^{-1} für 1 min.

Die erhaltene Dispersion wird langsam gerührt. Für die Beladung mit *m*THPC (1 mg mL^{-1} in 2-Propanol) wird 1 min nach der Fällung 1 mL des Farbstoffes zu der Dispersion gegeben und weitere 15 min gerührt. Die erhaltene Dispersion wird unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert. Nach 2 Tagen erfolgt die Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation für 30 min bei 66000 g. Der Überstand wird entfernt und der Rückstand mit 20 mL Reinstwasser aufgenommen. Das Redispergieren erfolgt für 1,5 min mit dem Ultraschallprozessor (Sonotrode 7, Amplitude 50 %, 0,8 Pulse). Die Größenverteilung sowie das Zetapotential werden mit dem Zetasizer charakterisiert. Die Farbstoffquantifizierung erfolgt UV-Vis-spektroskopisch anhand einer Kalibrationsgeraden mit unterschiedlichen Mengen an *m*THPC in einer verdünnten Polyethylenimin-Lösung (Abbildung 8).

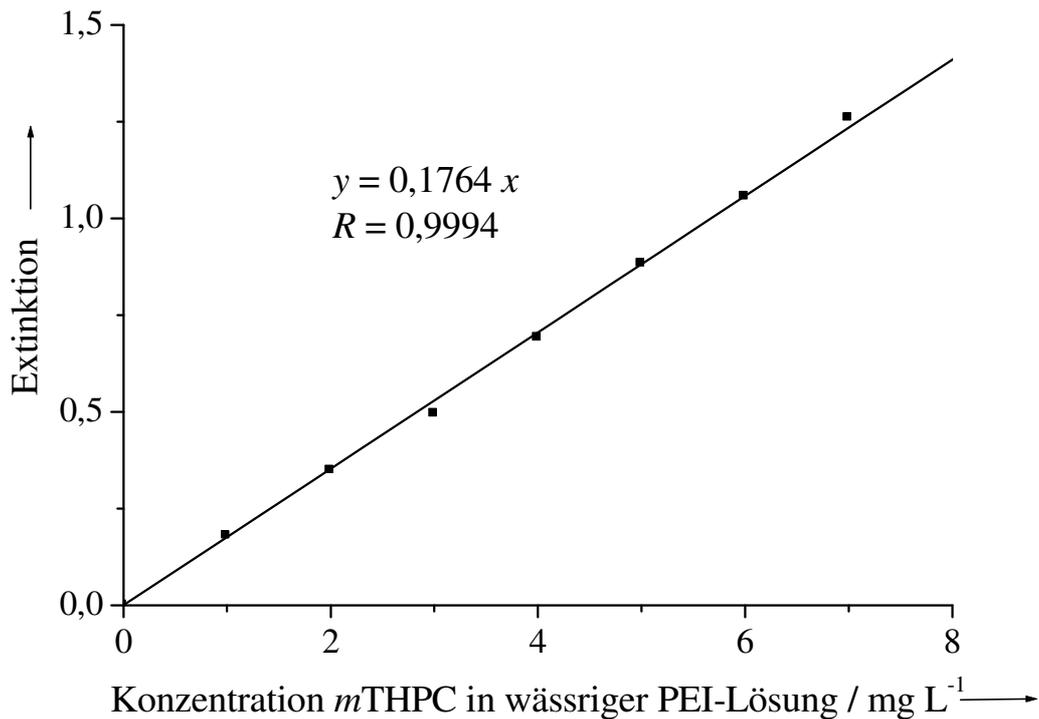


Abbildung 8: Kalibrationsgerade definierter Mengen an *m*THPC in wässriger Polyethylenimin-Lösung zur Bestimmung der Farbstoffkonzentration an den Partikeln.

Die Lyophilisation der erhaltenen Dispersion in Gegenwart von Trehalose erfolgt wie bereits in 3.1.5 beschrieben.

Die gravimetrisch bestimmte Ausbeute an Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln lag bei 223 mg L⁻¹. Durch den thermogravimetrisch ermittelten Mineralanteil (79,9 %) lässt sich eine Ausbeute an Calciumphosphat-Nanopartikeln von $223 \text{ mg L}^{-1} \cdot 0,799 = 178 \text{ mg L}^{-1}$ berechnen.

3.1.16 Darstellung von Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen

1 g der 6%igen Ostim[®]-Suspension in Wasser (aap Dieburg, 60 mg Hydroxylapatit) werden mit Reinstwasser auf ein Volumen von 20 mL Wasser verdünnt. 2 mL dieser Suspension werden mit 18 mL einer Polyethylenimin-Lösung (PEI verzweigt, 2 g L⁻¹, pH = 10, 25 kDa, Sigma) versetzt. Die PEI-haltige Ostim[®]-Suspension wird für 3 min mit dem Ultraschallprozessor dispergiert (Sonotrode 7, 50 % Amplitude, 0,8 Pulse). Die erhaltene Dispersion wird für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und der Rückstand mit einem äquivalenten Volumen an Reinstwasser aufgenommen. Der Rückstand wird bei gleichen Parametern für 2 min redispergiert.

Für die Beladung mit *m*THPC werden 20 mL der aufgereinigten Dispersion mit a) 400 µL (0,59 µmol *m*THPC) und b) 800 µL (1,18 µmol *m*THPC) des in 2-Propanol gelösten Farbstoffes versetzt. Nach 30 min wird die *m*THPC-haltige Dispersion zentrifugiert (30 min, 66000 g) und der Überstand mit der nicht adsorbierten Farbstoff-Komponente entfernt. Der Rückstand wird mit 20 mL Reinstwasser aufgenommen. Es wird für 1 min bei sonst gleichen Parametern redispergiert. Die Größenverteilung sowie das Zetapotential werden mit dem Zetasizer charakterisiert. Die Farbstoffquantifizierung erfolgt UV-Vis-spektroskopisch anhand einer Kalibrationsgeraden mit unterschiedlichen Mengen an *m*THPC in einer verdünnten Polyethylenimin-Lösung (Abbildung 8).

Die Lyophilisation der erhaltenen Dispersion in Gegenwart von Trehalose erfolgt wie bereits in 3.1.5 beschrieben.

3.1.17 Bestimmung der Zelltoxizität der *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel

Die photodynamische Wirkung der *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurde an den folgenden Zelllinien, die von der DSMZ (Braunschweig) oder ATCC (USA) bezogen wurden, untersucht:

HIG-82:	Synoviozytenzellen vom Kaninchen aus der Synovia (Gelenkflüssigkeit)
J774A.1:	Makrophagen (Fresszellen) von der Maus
HT29:	Kolonkarzinomzellen (Darmtumor) vom Menschen
Cal27:	Zungenkarzinomzellen vom Menschen
L929:	Mausfibroblasten

Zur Kultivierung der jeweiligen Zelllinien wird *Dulbecco`s Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 %igem fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin (10000 I.U.) und Streptomycin (10 mg mL⁻¹) der cc-pro GmbH verwendet. Die einzelnen Zelllinien werden mit diesem Zellmedium im Brutschrank bei 37 °C (CO₂-Atmosphäre 5 %, 95 % Luftfeuchtigkeit) in Zellkulturflaschen als Monolage angezogen. Die bis zu einer Dichte von 2·10⁴ Zellen mL⁻¹ gewachsenen Zellen werden in eine 96-*well*-Mikrotiterplatte mit je 10 µL *well*⁻¹ überführt. Die Verdünnung der Stammdispersionen der *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel auf eine Farbstoffkonzentration von 0,5 µM, 2 µM, 4 µM und 6 µM erfolgt mit DMEM (ohne Phenolrot).

Nach erfolgter Zugabe der Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersionen (oder entsprechender Kontrollen) werden die befüllten Mikrotiterplatten bei einer Temperatur von 37 °C für 24 h unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wird der Überstand abgezogen und die verbleibenden Zellen erneut mit 100 µL DMEM aufgenommen. Zur Phototoxizitätsbestimmung werden die Zellen mit

Material und Methoden

dem Laser (Ceralas PDT 652, biolitec AG) und einer Lichtleitfaser (FD-1, MedLight) für 50 s bei einer Wellenlänge von 652 nm (1 W cm^{-2}) bestrahlt. Die bestrahlten Zelllinien werden erneut unter den oben genannten Bedingungen für 24 h im Brutschrank inkubiert bis zur Durchführung der Zelltoxizitäts-Tests. Um die Dunkeltoxizität der Partikel-Systeme oder der Kontrollproben zu bestimmen, wird eine weitere Mikrotiterplatte gleichermaßen mit Proben gefüllt, aber ohne vorherige Bestrahlung für 24 h im Brutschrank inkubiert. Für jede Probe und jede Partikelkonzentration werden vier *wells* zum Vergleich angefertigt. Zur Toxizitätsbestimmung wurde der XTT-Assay verwendet. Dazu werden 500 mg XTT (Natrium 3-[(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)benzosulfonsäure, Applichem GmbH) in 500 mL Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gelöst. Nach dem Austausch des alten Zellmediums gegen frisches XTT-haltiges Medium (50 μM XTT, 50 μL DMEM) werden die Mikrotiterplatten mit den Zellen für 2-3 h im Brutschrank gelagert (37 °C, CO₂-Atmosphäre 5 %), bis eine deutliche Orangefärbung eintritt. Die Intensität der Färbung ist ein direkter Nachweis zur Bestimmung der Zellvitalität. Die Quantifizierung wird absorptionsspektroskopisch mit dem Mikrotiterplatten-Reader Infinite 200 (Fa. Tecan) bestimmt. Die zellbiologischen Untersuchungen wurden von Frau Dr. S. Gräfe von biolitec durchgeführt.

3.1.18 Bestimmung der Bakterientoxizität der *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel

Die für die Toxizitätsbestimmung verwendeten Bakterienstämme waren der Gram-positive *Staphylococcus aureus* (DSM11729) und der Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* (DSM1117). Diese werden über Nacht in einer Caso-Bouillon (Fa. Oxoid) unter aeroben Bedingungen bei 37 °C gezüchtet. Um die Bakterien zu reinigen, werden diese zentrifugiert und unter sterilen Bedingungen in Phosphat-gepufferter Kochsalz-Lösung (PBS) redispergiert. Die erhaltene Bakteriensuspension wird mit PBS auf eine optische Dichte von 0,015 gebracht (bei 600 nm, Schichtdicke 1 cm). Es werden 190 µL der Bakteriensuspension in je ein *well* der 96-*well*-Multititerplatte (Costar[®] 3603, Corning Inc., USA) vorgelegt. Dazu werden 10 µL der *m*THPC-haltigen Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersion gegeben. Diese Mikrotiterplatte wird für 30 bzw. 90 min unter Lichtausschluss bei 37 °C inkubiert. Für jede Partikelkonzentration werden je drei *wells* der Mikrotiterplatte zum Vergleich befüllt. Die Bestrahlung der Proben in dieser Mikrotiterplatte erfolgt durch einen Laser (Ceralas PDT 652, biolitec AG) über eine Lichtleitfaser (FD-1, MedLight) für 100 s bei einer Wellenlänge von 652 nm (1 W cm^{-2}). Die mit dem Laser bestrahlten Proben werden erneut mit Caso-Bouillon aufgenommen und im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Proben aus der Mikrotiterplatte werden mittels des *Spiralplaters Eddy Jet* (iul Instruments, Barcelona, Spanien) in abgestufter Verdünnung auf einen Sojanährboden gebracht und nachfolgend für die jeweilige Bakterienspezies benötigte Wachstumszeit bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zahl der Bakterien jeder Probe wird durch die Bestimmung der Zahl der koloniebildenden Einheiten mit Hilfe des Koloniezähl-Geräts *Countermat Flash* (iul Instruments, Barcelona, Spanien) ermittelt. Um die Dunkeltoxizität der Dispersion zu bestimmen, werden pro Partikelkonzentration je drei *wells* ohne Bestrahlung inkubiert und bei sonst gleichen Parametern untersucht. Die

biologischen Untersuchungen wurden von Frau Dipl. Chem. D. Steen und Herrn Dr. B. Gitter von biolitec durchgeführt.

3.1.19 Fällung Chondroitin-4-sulfat-stabilisierter Calciumphosphat-Nanopartikel durch einen kontinuierlichen Prozess

Die Fällung Chondroitin-4-sulfat-stabilisierter Calciumphosphat-Nanopartikel erfolgt mit dem in 3.1.1 vorgestellten Reaktor. Zunächst werden eine Calcium-L-Lactat-Lösung mit der Konzentration 6 mM und eine Di-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung der Konzentration 3,6 mM angesetzt. Die pH-Werte der Lösungen werden mit Ammoniak auf 9 eingestellt. Für die Chondroitin-4-sulfat-Lösung wird eine Konzentration von 2 g L^{-1} gewählt. Die Calcium- und die Phosphat-Lösung werden mit einem Volumenstrom von 30 mL min^{-1} aus den Vorratsgefäßen gepumpt. Die Schlauchlänge, in der die Keimbildung einsetzt, beträgt 50 mm (innerer Durchmesser 2,54 mm). Über einen weiteren Zufluss wird die Lösung, bestehend aus Chondroitin-4-sulfat, mit einem Volumenstrom von 15 mL min^{-1} zudosiert. Die resultierende Dispersion wird in einem Kunststoffgefäß aufgefangen. Die Aufreinigung erfolgt mittels Ultrazentrifugation für 30 min bei 66000 g. Der Überstand wird entfernt, der Rückstand mit einer äquivalenten Menge an Reinstwasser aufgenommen und redispergiert.

3.2 Physikalisch-chemische Methoden

3.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Oberflächentopografie eines Systems vergrößert abgebildet wird. Hierbei werden zunächst Elektronen von einer Glühwendel thermisch emittiert, mit Hilfe einer Beschleunigungsspannung von 8-30 keV beschleunigt und mit Magnetspulen zu einem definierten Elektronenstrahl gebündelt. Dieser Elektronenstrahl wird auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Um eine elektrische Leitfähigkeit zu gewährleisten, wird die zu untersuchende Substanz oftmals auf Silicium-Wafer oder Kohlepad aufgetragen und mit Gold bedampft. Der nun auf die Oberfläche gerichtete Elektronenstrahl rastert diese ab, wodurch Rückstreuelektronen, Sekundärelektronen und Röntgenstrahlung erzeugt werden. Die Topographie wird durch die Intensität der Sekundärelektronen detektiert. Der Materialkontrast der zu untersuchenden Probe wird mit Hilfe von Rückstreuelektronen erhalten. Aus den gemessenen Signalen wird ein Bild erzeugt. Um die Probenzusammensetzung zu ermitteln, bedient man sich der energiedispersiven Röntgenemissionsspektroskopie (EDX). Hierbei werden die Informationen der charakteristischen Röntgenstrahlung herangezogen. Werden kernnahe Elektronen durch Elektronenbeschuss aus dem Atomverband herausgeschleudert, so füllen weniger stark gebundene Elektronen aus der äußeren Atomhülle diese Elektronenlücke auf. Die Energie, die während dieses Übergangs emittiert wird, ist für jedes Element charakteristisch und führt zur charakteristischen Röntgenstrahlung. Die registrierte Energie der detektierten Röntgenstrahlung kann zur Ermittlung der Probenzusammensetzung herangezogen werden.

3.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie handelt es sich um ein Verfahren, das eine starke Verwandtschaft zur Rasterelektronenmikroskopie aufweist. Die von der Glühwendel thermisch emittierten Elektronen werden hier mit einer Beschleunigungsspannung von 50-150 keV beschleunigt und mit elektromagnetischen Spulen zu einem definierten Strahl fokussiert. Trifft dieser hochenergetisch gebündelte Elektronenstrahl auf die Probe, so tritt er durch sie hindurch und wird teilweise gebeugt. Die Intensität der von der Probe gestreuten Elektronen ist eine Funktion der Elektronendichte sowie der Schichtdicke. Da mit zunehmender Schichtdicke das Verhältnis von inelastischer zu elastischer Streuung zunimmt, ist es notwendig, mit dünnen Proben zu arbeiten, um kontrastreiche Aufnahmen zu erzielen. Die transmittierten Elektronen werden detektiert und von einem Computer zu einem Bild verarbeitet. Daher ist es durch die Transmissionselektronenmikroskopie möglich, die innere Struktur eines Systems zu charakterisieren, während bei der Rasterelektronenmikroskopie lediglich die Topographie dargestellt werden kann.

3.2.3 Röntgenpulverdiffraktometrie

Die Röntgenpulverdiffraktometrie ist ein Verfahren, um Gitterstrukturen kristalliner Feststoffe zu bestimmen. Dabei werden die zu untersuchenden Feststoffe mit charakteristischer Röntgenstrahlung bestrahlt, deren Wellenlänge im Bereich von Atomabständen liegt. Trifft diese Strahlung auf eine Netzebene des Kristalls, so fungiert diese als dreidimensionales Beugungsgitter. Die Beugung der Röntgenstrahlung erfolgt an der Elektronendichte der jeweiligen Gitterpunkte. Ist der Gangunterschied zwischen eingestrahelter und gebeugter Röntgenstrahlung ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge, so befindet sich die Strahlung in Phase, und es wird eine Intensitätssteigerung beobachtet, was als konstruktive Interferenz bezeichnet wird. Sind die Gangunterschiede nicht in

Phase, so erfolgt eine Schwächung beziehungsweise Auslöschung der Strahlen. Hierdurch erreicht man, dass die Strahlung nur unter bestimmten Winkeln Beugungsmaxima aufweist. Diese Winkel werden von einem Detektor registriert und die einzelnen Intensitäten in Abhängigkeit vom Beugungswinkel 2θ aufgetragen. Grundlage zur Strukturaufklärung liefert die Bragg-Gleichung:

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

n : Beugungsordnung

λ : Wellenlänge

d : Netzebenenabstand

θ : Beugungswinkel

Anhand des erhaltenen Diffraktogramms ist es möglich, die Kristallinität einer Probe zu bestimmen. Weiterhin kann man unbekannte Substanzen durch Vergleich ihrer Reflexlagen mit denjenigen aus Literaturdatenbanken eindeutig identifizieren. Dies gelingt sehr gut für kristalline Proben. Ist die Analysesubstanz nanokristallin, so verbreitern sich die Reflexe. Ist die untersuchende Probe röntgenamorph, so erhält man lediglich einen breiten Reflexberg und es ist nicht möglich, weitere Aussagen über die Struktur der Substanz zu treffen.

3.2.4 Atomabsorptionsspektroskopie

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) dient zum quantitativen Nachweis unterschiedlichster Elemente. Der erste Schritt besteht in der Atomisierung der zu untersuchenden Probe. Dies geschieht entweder in einem Graphitrohr oder in einer Gasflamme. Im atomisierten Zustand werden die Atome mit elektromagnetischer Strahlung im ultravioletten Wellenlängenbereich bestrahlt. Dadurch werden die Atome in einen angeregten, instabilen Zustand überführt. Durch Emission von Licht einer spezifischen Wellenlänge können die angeregten Atome erneut den Grundzustand erreichen. Die Intensitätsdifferenz zwischen ein- und austretendem Strahl besitzt eine Proportionalität zur Konzentration der zu bestimmenden Spezies. Diese Intensitätsdifferenz wird von einem Detektor registriert und zum quantitativen Nachweis verwendet.

3.2.5 Elementaranalyse

Um kohlenstoff-, wasserstoff- und stickstoffhaltige Verbindungen analysieren zu können, bedient man sich der Elementaranalyse (EA). Dazu wird eine definierte Menge der Analysesubstanz abgewogen und im Verbrennungsofen unter Sauerstoffatmosphäre oxidiert. Hierbei wird Kohlenstoff aus kohlenstoffhaltigen Verbindungen zu Kohlenmonoxid oder Kohlendioxid, Wasserstoff in wasserstoffhaltigen Verbindungen zu Wasser und Stickstoff in stickstoffhaltigen Verbindungen zu Stickoxiden oder molekularem Stickstoff umgesetzt. Zur vollständigen Oxidation von Kohlenmonoxid wird das teilweise oxidierte Gemisch mit Hilfe eines Trägergases über einen heißen Kupferoxiddraht geleitet. Dabei werden die Stickoxide vollständig zu molekularem Stickstoff reduziert. Dieses Gasgemisch wird zur quantitativen Bestimmung der unterschiedlichen Spezies chromatographisch getrennt und mit Hilfe eines Leitfähigkeitssensors analysiert.

3.2.6 UV-Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektroskopie ist ein Verfahren, bei welchem elektronische Übergänge zur Absorption führen. Die erhaltenen Spektren liegen im Wellenlängenbereich von 200 - 800 nm. Eine Strahlungsquelle erzeugt monochromatisches Licht, das auf die zu untersuchende Probe gerichtet wird. Die aus der Probe heraustretende, durch Absorption abgeschwächte elektromagnetische Strahlung wird von einem Detektor registriert und von einem Computer in ein Spektrum umgewandelt. Die Grundlage für die Auswertung der Spektren liefert das Lambert-Beer'sche-Gesetz:

$$-\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (5)$$

Hier ist I die Intensität der Strahlung, die im Detektor registriert wird, I_0 die Ausgangsstrahlung, E die Extinktion, ε der molare Extinktionskoeffizient (Materialkonstante), c die Konzentration der zu untersuchenden Spezies und d die Länge des Absorptionsweges. Mit Hilfe dieser Beziehung ist es möglich, Konzentrationsverhältnisse bei bekannten Parametern zu ermitteln. Dazu benötigt man lediglich die Intensität der abgeschwächten Strahlung, die aus der Küvette austritt. Diese Beziehung ist jedoch nicht die einzige Gesetzmäßigkeit, um quantitative und qualitative Aussagen zu treffen. Hierbei gibt es bestimmte Auswahlregeln, die für die jeweiligen Übergänge betrachtet werden müssen. Diese Regeln beziehen sich auf die Symmetrie, den Spin und die Überlappung. Das Spinverbot besagt, dass sich der Gesamtspin des Systems während eines elektronischen Übergangs nicht ändern darf. Für zentrosymmetrische Moleküle gilt, dass nur Übergänge zwischen Orbitalen ungleicher Parität erlaubt sind. Zudem sind nur elektronische Übergänge erlaubt, bei denen sich die beteiligten Orbitale signifikant überlappen.

3.2.7 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist ein Verfahren, mit dem der hydrodynamische Radius von Kolloiden bestimmt werden kann. Hier wird die Brown'sche Molekularbewegung der dispergierten Spezies verfolgt. Diese thermische Eigenbewegung der Teilchen hängt von der Größe der Partikel, der Viskosität des Dispersionsmediums und der Temperatur ab. Wird die zu untersuchende Probe mit monochromatischem Licht bestrahlt, so wird ein Teil des Lichtes gestreut, während der restliche Teil der Strahlung durch die Probe dringt. Die durch die Partikel gestreute Strahlung enthält aufgrund der unterschiedlichen Partikelgrößen sowie der daraufhin unterschiedlich schnellen Eigenbewegung der Teilchen Intensitätsfluktuationen (Abbildung 9).

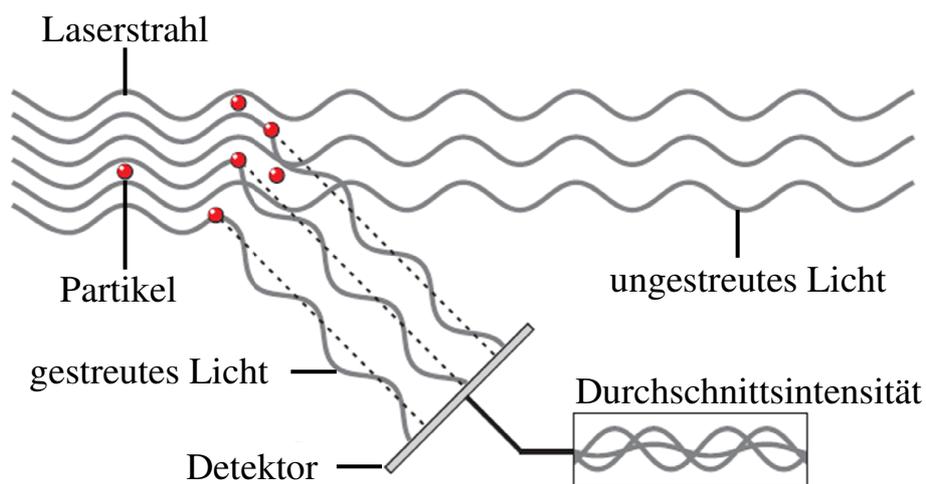


Abbildung 9: Schematische Abbildung zur Funktionsweise der DLS.^[8]

Diese Intensitätsfluktuationen sind die Folge von konstruktiver und destruktiver Interferenz der gestreuten elektromagnetischen Strahlung. Der Detektor registriert die Intensitätsfluktuation der Streustrahlung und wandelt dieses Signal mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung und der Kumulantenmethode in eine Größenverteilung um. Als Ergebnis erhält man den hydrodynamischen Durchmesser der Kolloide sowie die Standardabweichung und den

Polydispersitätsindex (PDI). Der PDI macht eine Aussage über den monodispersen Charakter der ermittelten Größenverteilung. Ist der PDI kleiner als 0,3, so kann das erhaltene Ergebnis als monodispers angesehen werden.

3.2.8 Zetapotential

Wie in 2.3 beschrieben, umgibt das kolloidale Teilchen eine elektrochemische Doppelschicht, bestehend aus einem starren und einem diffusen Teil. Das Zetapotential lässt sich formal als die Potentialdifferenz zwischen dem Scherradius des Partikels und der Volumenphase beschreiben. Befinden sich nun zwei Elektroden im zu untersuchenden kolloidalem System, so führt das Anlegen einer Spannung zum Ladungstransport. Hierbei wandern die geladenen Teilchen zu der entgegengesetzt geladenen Elektrode. Aus diesem Ladungstransport ergibt sich eine Potentialdifferenz, die allerdings nicht direkt ermittelt werden kann. Zur Bestimmung bedient man sich der elektrophoretischen Mobilität sowie der thermischen Eigenbewegung der Partikel. Demnach wird lediglich die Bewegung der Partikel bei einem bekannten elektrischen Feld gemessen und mit Hilfe der Intensitätsfluktuationen ein Geschwindigkeitsausdruck ermittelt. Aus der Henry-Gleichung (6) kann bei sonst bekannten Parametern das Zetapotential berechnet werden.

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa\alpha)}{3\eta} \quad (6)$$

U_E : Elektrophoretische Mobilität

ε : Dielektrische Konstante

ζ : Zetapotential

$f(\kappa\alpha)$: Henry-Funktion

η : Viskosität

3.2.9 Thermogravimetrie

Bei der Thermogravimetrie handelt es sich um eine Messmethode, bei der die zu untersuchende Substanz einem Temperaturprogramm ausgesetzt wird. Dazu wird eine definierte Menge der zu untersuchenden Probe in einen Korund-Tiegel gefüllt und die Temperatur mit konstanter Heizrate erhöht. Die Temperaturbestimmung gelingt mit Hilfe eines Thermoelements in direkter Nachbarschaft zum Tiegel. Durch die Temperaturerhöhung wird ein Masseverlust der Probe bewirkt, der sich mit einer Mikrowaage bestimmen lässt. Man erhält ein Diagramm, bei dem die Änderung der Probenmasse gegen die Temperatur aufgetragen wird. Diese Massenänderungen bei charakteristischen Temperaturen dienen zum Aufschluss der zugehörigen Probenzusammensetzung. Je nachdem, ob unter inerter Gasatmosphäre oder unter oxidierenden Bedingungen gearbeitet werden soll, können als Umgebungsmedien Argon oder Sauerstoff gewählt werden.

3.2.10 Gefriertrocknung

Bei der Gefriertrocknung, auch Lyophilisation genannt, handelt es sich um eine Methode, mit der empfindliche Biomoleküle schonend und unter Beibehaltung ihrer dreidimensionalen Struktur getrocknet werden können. Als Grundprinzip nutzt man hier die Sublimation aus. Der Sublimationsvorgang besteht generell aus dem Übergang von der festen in die gasförmige Phase und lässt sich anhand des Phasendiagramms von Wasser näher diskutieren. Bei atmosphärischem Druck kann in Abhängigkeit der Temperatur sowohl der feste, der flüssige als auch der gasförmige Aggregatzustand von Wasser durchlaufen werden. Wird der Umgebungsdruck geringer als 6 mbar und die Temperatur unter 0 °C gehalten, so wird lediglich der Übergang von der festen in die gasförmige Phase beobachtet. Unter diesen Bedingungen können Proben bei ausreichend niedrigen Temperaturen (unterhalb der eutektischen Temperatur) und Drücken aus dem

gefrorenen Zustand heraus getrocknet werden. In Abhängigkeit von der Beschaffenheit und der adsorbierten Restfeuchte des Materials kann sich an die Primärtrocknung eine Sekundärtrocknung anschließen. Dies erfolgt im Allgemeinen bei höheren Temperaturen und geringeren Drücken.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Darstellung und zellbiologische Untersuchung Carboxymethylcellulose-stabilisierter und Nukleinsäure-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel zur Gen-Stummschaltung

4.1.1 Transfektion

Das Einbringen von Nukleinsäuren (DNA, RNA) fremden Ursprungs in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet und ist ein wichtiger Bestandteil der modernen Medizin.^[9] Vor allem in der Gentherapie wird durch gezieltes Einschleusen von Nukleinsäuren die Bildung eines Zielproteins nach Bedarf angeregt (DNA) oder herunter reguliert (RNA).^[10, 11] Diese Methode eröffnet bei geeigneter Effizienz einen zelltherapeutischen Ansatz zur Behandlung genetisch bedingter Krankheiten.^[12, 13]

Da Nukleinsäuren nicht in der Lage sind, als freie Biomoleküle die Zellmembran zu penetrieren, müssen Methoden entwickelt werden, die das gezielte Einschleusen ermöglichen.^[14] Im Zytoplasma angelangt, können die Nukleinsäuren durch Nukleasen abgebaut werden, was zum Verlust der genetischen Information führt.^[15-17] Aus diesem Grund müssen Strategien entwickelt werden, die den Abbauprozess der genetischen Information durch Nukleasen verhindern. Dringt fremde DNA mit geeignetem Promoter in den Zellkern ein, so wird sie abgelesen, und die Expression des Zielproteins findet statt.^[18, 19]

Auf der Suche nach dem idealen Transfektionssystem wurden im Laufe der Jahre viele Techniken entwickelt. Prinzipiell unterscheidet man zwischen viralen und nicht-viralen Techniken.^[19-21] Das virale Einschleusen genetischer Information in eukaryotische Zellen, auch Transduktion genannt, basiert auf dem Einsatz von Retroviren,^[22-24] Adenoviren^[25-27] und adenoassoziierten Viren^[28-30] und ermöglicht sehr hohe Transfektionseffizienzen.^[19, 31] Trotz dieser

aussichtsreichen Eigenschaften ist der klinische Einsatz risikobehaftet. So wird neben einer immunogenen und inflammatorischen Wirkung auch von einem kanzerogenen Effekt durch den Einsatz solcher Vektoren berichtet.^[19, 20] Um diese Nebenwirkungen zu umgehen, wurde der Einfluss nicht-viraler Vektoren studiert. Generell ist die Transfektionseffizienz nicht-viraler Vektoren weitaus geringer als die von viralen Vektoren.^[32]

Prinzipiell unterscheidet man zwischen physikalischen und chemischen Methoden. Zum Bereich der physikalischen Methoden zählen die Elektroporation, die Mikroinjektion und die *gene gun*. Bei der Elektroporation wird die Porosität und damit die Permeabilität der Zellmembran durch elektrische Pulse erhöht. Dadurch kann die DNA in das Zytoplasma eintreten und zum Zellkern gelangen.^[33, 34] Diese Methode ist sehr effizient, muss jedoch für jede Zelllinie angepasst werden.^[35] Bei der Mikroinjektion wird die DNA direkt in den Zellkern appliziert.^[36] Diese Methode umgeht die Gefahr des potentiellen Abbaus der DNA durch Nukleasen im Zytoplasma und besitzt daher sehr hohe Transfektionseffizienzen.^[37] Ein bedeutender Nachteil liegt in der proportional zur Zellzahl steigenden Transfektionsdauer.^[38, 39] So müssen alle Zellen nacheinander behandelt werden, was für *in vivo*-Studien nicht praktikabel ist. Die *gene gun* ist eine Transfektions-Technik, bei der mit DNA-beladene Gold-Nanopartikel als Projektile fungieren und auf die Zielzellen gerichtet werden.^[40, 41] Die DNA-beladenen Geschosse treten auf diesem Wege in das Zytoplasma der Zielzellen ein. Einen bemerkenswerten Nachteil dieser Methode stellt das geringe Penetrationsvermögen der Goldnanopartikel ins Zielgewebe dar.^[42] So können ausschließlich Zellen der äußersten Gewebeschichten mit signifikantem Erfolg transfiziert werden.^[43]

Zu den chemischen Transfektions-Methoden werden neben kationischen Substanzen auch anorganische Nanopartikel gezählt.^[19, 44, 45] Kationische Substanzen zeigen aus elektrostatischer Sicht eine hohe Affinität zum negativ

geladenen Phosphat-Rückgrat von Nucleinsäuren. Durch den Einsatz kationischer Polymere wie Polyethylenimin bilden sich mit Nucleinsäuren sogenannte Polyplexe aus, die einen kationischen partikulären Charakter besitzen. Die positive Ladung führt zu einer hohen Akkumulation der Polyplexe auf der negativ geladenen Zellmembran, wodurch die endozytotische Aufnahme stimuliert wird.^[44, 46] Dies lässt sich auf den Einsatz von Lipiden als Transfektionsvektoren übertragen. Ein wesentlicher Nachteil, der sich bei der Anwendung kationischer Polymere oder Lipide als Vektoren ergibt, ist die in vielen Fällen hohe Toxizität gegenüber den zu transfizierenden Zielzellen.^[19, 46, 47] Um diese Problematik zu umgehen, wurden anorganische Nanopartikel entwickelt und als Trägersysteme für Nucleinsäuren untersucht. So wird der Einsatz von Gold-Nanopartikeln in der Literatur diskutiert.^[48-51] Weiterhin konnte die erfolgreiche Transfektion mit DNA-beladenen Siliciumoxid-Nanopartikeln^[52-54] als auch mit Kohlenstoffnanoröhren (CNT) realisiert werden.^[55, 56] Aufgrund ihres magnetischen Charakters sind Eisenoxid-Nanopartikel als Träger für pharmazeutische Wirkstoffe besonders interessant. Mittels extern angelegter Magnetfelder können solche Nanopartikel lokalisiert und zum Zielort geführt werden.^[57, 58] Unter den keramischen Systemen nehmen Calciumphosphat-Nanopartikel einen besonderen Stellenwert ein. Calciumphosphat ist biokompatibel und daher als nanopartikuläres Trägermaterial unbedenklich.

Eine Pionierarbeit zu Calciumphosphat-Präzipitaten für die Transfektion wurde 1973 von Graham und van der Eb beschrieben.^[59] Hierbei wird eine DNA- mit einer Calciumchlorid-Lösung vermischt und nachträglich eine Phosphat-haltige Pufferlösung hinzugefügt. Der sich ausbildende Niederschlag besteht aus DNA-haltigen Calciumphosphat-Mikro- und Nanopartikeln, die von den Zellen endozytotisch aufgenommen werden können. Ein Nachteil dieses Standardverfahrens ist die geringe Reproduzierbarkeit der

Transfektionseffizienzen aufgrund Einflussfaktoren wie pH-Wert und Temperatur sowie Polydispersität und Morphologie der Partikel.^[12, 19, 60]

4.1.2 Calciumphosphat-Nanopartikel als Träger-System für die Transfektion

Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, zeichnet sich Calciumphosphat als Bestandteil von Knochen und Zähnen durch seine hervorragende Biokompatibilität aus.^[61-63]

Aus diesem Grund ist die Verwendung von Calciumphosphat als nanopartikulärer Träger für die Transfektion unbedenklich.^[64, 65] Einige Nachteile bezüglich des Standardverfahrens von Graham und van der Eb wurden bereits in Kapitel 4.1.1 diskutiert. Um eine bessere Kontrolle über Reproduzierbarkeit und Polydispersität der Calciumphosphat-Nanopartikel zu erhalten, haben sich im Laufe der Zeit mehrere Forschungsgruppen auf die Optimierung solcher Vektoren spezialisiert.^[66, 67]

Seit einigen Jahren beschäftigt sich die Arbeitsgruppe Epple mit der Herstellung biokompatibler Calciumphosphat-Nanopartikel als Träger für die Transfektion. Im Laufe der Zeit wurden neue Strategien für das effiziente Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellen entwickelt. Einen wesentlichen Beitrag lieferte hier die Forschungsarbeit von Sokolova *et al.* Sokolova *et al.* gelang die Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit DNA und Oligonukleotiden durch einen Fällungsprozess.^[68, 69] Um die Nukleinsäuren vor dem intrazellulären Abbau durch Nukleasen zu schützen, wurden weitere Schichten von Calciumphosphat und DNA aufgetragen.^[69, 70] Dieser Ansatz zeigte eine signifikante Steigerung der Transfektionsraten.^[69] Neumann *et al.* untersuchten den intrazellulären Calcium-Spiegel während der Transfektion an T24-Zellen mit Hilfe der Standard Calciumphosphat-Methode und mit DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Durch den Gebrauch des radioaktiven Isotops $^{45}\text{Ca}^{2+}$ konnte die Calciumkonzentration während der

Transfektion innerhalb der Zellen in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt werden. In seiner Arbeit wurde gezeigt, dass der intrazelluläre Calcium-Spiegel während der Transfektion bei der Standard Calciumphosphat-Methode stark anstieg. Dies führte zu einer erhöhten Zelltoxizität. Dieser Effekt wurde durch den Gebrauch von DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nicht beobachtet. Bei vergleichbarer Transfektionseffizienz wurde für die DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel kein zelltoxischer Effekt beschrieben.^[11] Der Ablauf einer nanopartikelvermittelten Transfektion lässt sich in unterschiedliche Abläufe gliedern (Abbildung 10).

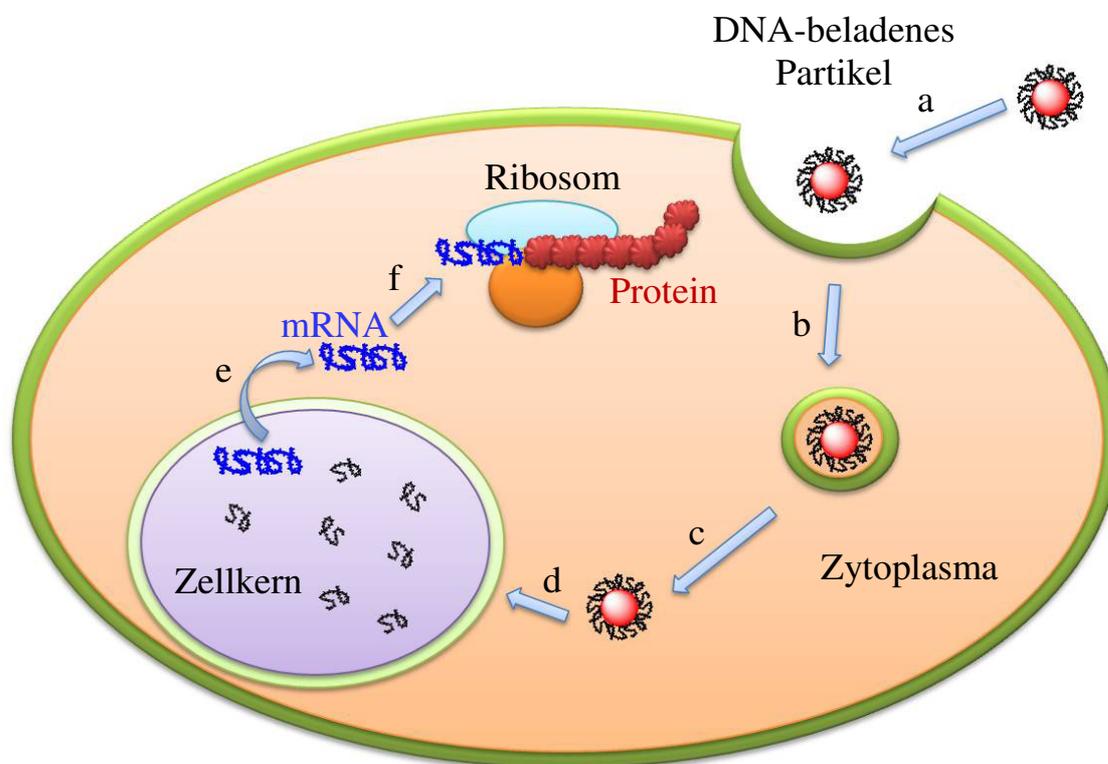


Abbildung 10: Schematische Abfolge der Einzelprozesse, die während der Transfektion durchlaufen werden; **a)** Das DNA-beladene Partikel nähert sich der Zelle und wird auf der Zellmembran immobilisiert; **b)** Eintritt des Partikels in das Zytoplasma durch Endozytose; **c)** Freisetzung des Partikels aus dem Vesikel in das Zytoplasma; **d)** Eintritt der DNA in den Zellkern und Bildung der prä-mRNA; **e)** Austritt der mRNA in das Zytoplasma; **f)** Translation der mRNA an den Ribosomen.

Zunächst müssen die Nanopartikel auf der Zellmembran adsorbiert und immobilisiert werden (a). Im nächsten Schritt erfolgt die Einstülpung der Zellmembran unter Ausbildung eines intrazellulären Vesikels bzw. eines Endosoms (b) und der Eintritt ins Zytoplasma.^[71] Hier kann die Fusion des intrazellulären Vesikels mit einem Lysosom erfolgen, was zum Abbau der DNA führen kann.^[72] Damit ist die Freisetzung des Partikels aus dem Endosom ein essentieller Schritt und sollte möglichst schnell erfolgen (c). Ist das Partikel einmal im Zytoplasma freigesetzt, kann eine Degradation der DNA durch Nukleasen erfolgen.^[64, 73] Daher sollte ein Schutz der Nukleinsäuren vor diesen Abbauprozessen durch ein erfolgreiches Trägersystem gewährleistet sein. Kommt es zur Aufnahme der DNA in den Zellkern, so wird die Sequenz von der RNA-Polymerase abgelesen. Es erfolgt die Bildung der prä-mRNA (Transkription), die Prozessierung zur mRNA und der Austritt ins Zytoplasma zu den Ribosomen (e, f). Dort findet die Bildung des kodierten Proteins statt (Translation).

4.1.3 Mechanismus der RNA-Interferenz

Der mechanistische Verlauf der RNA-Interferenz (RNAi) wurde durch die Pionierarbeit von Fire und Mello im Jahre 1998 erstmals beschrieben.^[74] Sie stellten einen manipulativen Einfluss von doppelsträngigen RNA-Sequenzen (dsRNA) auf die Genexpression des Fadenwurms *C. elegans* fest.^[74-76] Im Laufe der Jahre wurden weitere RNA-Interferenz-Untersuchungen an eukaryotischen Zellen durchgeführt.^[10, 77, 78] Der komplette Mechanismus der RNA-Interferenz besteht aus einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Komponenten und lässt sich in einzelne aufeinander folgende Schritte gliedern. Als Ausgangssystem dient hier eine doppelsträngige RNA (dsRNA) mit spezifischer Sequenz, die in das Zytoplasma einer Zelle eingebracht werden muss.^[79, 80] Diese dsRNA wird von der RNase Typ-III Endonuklease, dem sogenannten *Dicer* in viele kleine

RNA-Einheiten gespalten. Die so erhaltenen RNA-Duplexe werden als *small interfering* RNA (siRNA) bezeichnet und bestehen im Durchschnitt aus 21-23 Basenpaaren.^[81-84] Diese siRNA-Fragmente besitzen jeweils am 3'-Ende eines Stranges einen sogenannten *overhang*, an dem 2 Nukleotide ungepaart überlappen (Abbildung 11).^[85] Ein wesentlicher Aspekt, der für eine zielgerichtete Proteinregulation essentiell ist, zeigt sich in der Länge der siRNA. So sollte die Basenpaaranzahl keinen Wert über 30 annehmen, da sonst die Bildung von Interferonen eine unspezifische Degradation aller mRNA-Sequenzen mit sich zieht.^[86, 87] Im nächsten Schritt erfolgt die Einlagerung der siRNA in einen Proteinkomplex, der aus Proteinen der Argonaut-Familie besteht.^[88-91] Der entstandene Komplex wird als *prä-RNA induced silencing complex* (prä-RISC) bezeichnet.^[79, 92, 93] Die nachgeschaltete Entspiralisierung der siRNA und der darauffolgenden Abspaltung des *sense*-Stranges führt zum Verbleib des *antisense*-Stranges im Proteinkomplex zur Aktivierung des RISC-*loading* Komplexes.^[79, 82, 94, 95] Der gebundene *antisense*-Strang führt den RISC-*loading* Komplex zu den komplementären mRNA-Sequenzen. Im darauffolgenden Schritt erfolgt die Spaltung der Ziel-mRNA und damit die Genstummschaltung des Proteins.^[10, 96, 97] Damit ist die RNA-Interferenz als eine post-transkriptionelle Methode einzustufen.^[98, 99] Der schematische Ablauf der RNA-Interferenz ist in Abbildung 11 dargestellt.

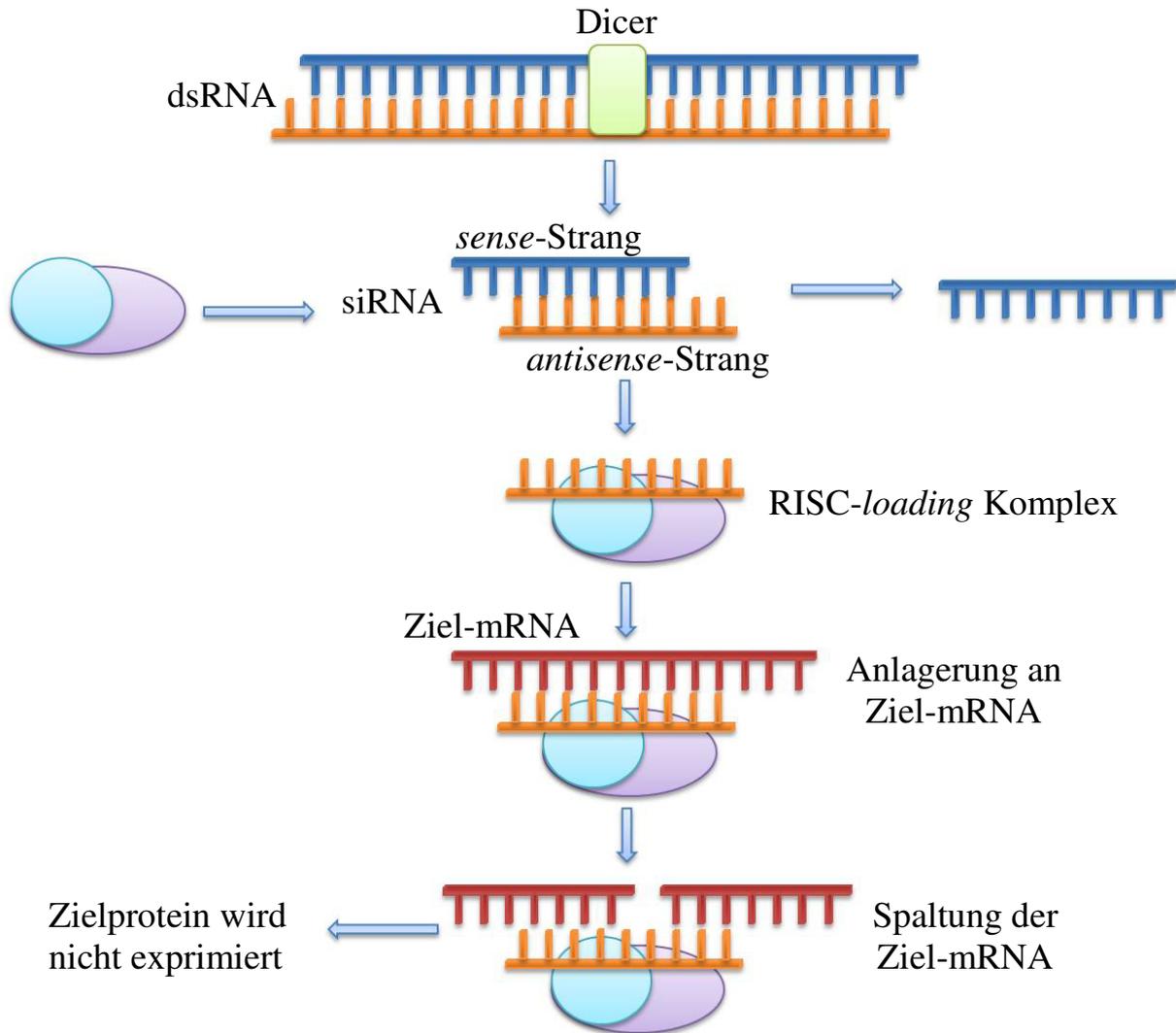


Abbildung 11: Schematische Abbildung zur Erläuterung der Genstummschaltung. Doppelsträngige RNA wird durch den *Dicer* in siRNA-Duplexe gespalten. Es erfolgt die Einbettung des siRNA-Duplexes in die Argonaut-Einheit und die darauffolgende Entspiralisierung und Abspaltung des *sense*-Stranges zur Aktivierung des *RISC-loading* Komplexes. Der *RISC-loading*-Komplex lagert sich an die Ziel-mRNA an und spaltet diese. Das Zielprotein wird nicht exprimiert.

4.1.4 Einführung in die Thematik

Die kontinuierliche Darstellung Polymer-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel ist aus wirtschaftlicher Sicht für einen kommerziellen Einsatz von großer Bedeutung. Soll das Polymer durch teure Wirkstoffe wie beispielsweise Nukleinsäuren ersetzt werden, so muss die Wirtschaftlichkeit eines solchen Verfahrens zur Herstellung von Dispersionen überprüft werden.

Die Herstellung von Calciumphosphat-Nanopartikeln durch einen kontinuierlichen Fällungsprozess wurde bereits von Tadic und Welzel etabliert.^[100, 101] Urch *et al.* übertrugen dieses Konzept und erweiterten die Ergebnisse auf Polymer-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel, die elektrophoretisch auf Titan und Siliciumoberflächen abgeschieden wurden.^[102]

Später stellten Ganesan *et al.* einen kontinuierlichen Fällungsprozess von Calciumphosphat-Nanopartikeln vor, die mit einem phosphorylierten Porphyrin-Derivat funktionalisiert wurden.^[103] Die Fällung DNA-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel durch einen Fällungsprozess konnte erstmals von Welzel *et al.* realisiert werden. Dabei wurden eine Calcium- und eine Phosphatlösung über Peristaltikpumpen zusammengeführt. Unmittelbar nach der Calciumphosphat-Keimbildung wurde die Suspension zur Erhaltung der kolloidalen Stabilität mit DNA versetzt.^[104] Die kontinuierliche Fällung DNA-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel wurde bereits in meiner Diplomarbeit beschrieben.^[105] Zur Gewährleistung einer ausreichend elektrosterischen Stabilisierung musste mit einem Überschuss an DNA während der Fällung gearbeitet werden.

Eine aus wirtschaftlicher Sicht essentielle Herausforderung liegt zudem in der Langzeitstabilisierung solcher Dispersionen. Da die Koagulation nanopartikulärer Systeme in wässrigen Medien im Laufe der Zeit zunimmt, müssen Strategien entwickelt werden, die eine Alterung inhibieren.

Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel wird die kontinuierliche Darstellung von Carboxymethylcellulose (CMC)-funktionalisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln diskutiert. Um einen möglichst effizienten Einsatz teurer Biomoleküle zu gewährleisten, wurde versucht, das biokompatible Polymer Carboxymethylcellulose zur Stabilisierung zu nutzen und gleichzeitig eine Funktionalisierung durch DNA herbeizuführen.

Carboxymethylcellulose ist ein anionischer Polyelektrolyt und als Lebensmittelzusatzstoff in der EU zugelassen (Abbildung 12).^[106] Aus diesem Grund ist eine Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Carboxymethylcellulose aus biomedizinischer Sicht besonders interessant.

DNA besitzt aufgrund des Phosphat-Rückgrats ebenfalls einen anionischen Charakter. Eine Mischung aus Carboxymethylcellulose und DNA als Stabilisierungssystem schließt aufgrund der gleichnamigen Ladung der Polymere eine Bildung von Polyplexen aus.

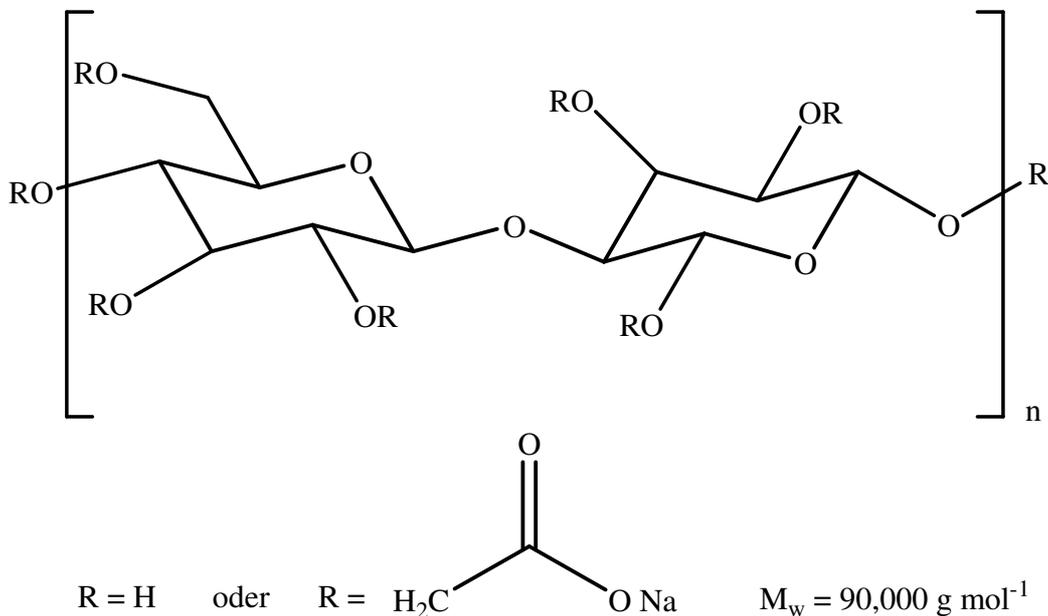


Abbildung 12: Monomereinheit der verwendeten Carboxymethylcellulose (90 kDa).

Des Weiteren wird ein Verfahren zur Langzeitlagerung der Dispersionen mittels Lyophilisation in Gegenwart unterschiedlicher Kryoprotektoren vorgestellt. Im Anschluss wird auf die biologische Wirksamkeit der erhaltenen Nanopartikel im Falle einer Funktionalisierung durch siRNA (anti-EGFP) und die Genstummschaltung an EGFP-exprimierenden HeLa-Zellen eingegangen.

4.1.4.1 Darstellung und Charakterisierung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln

In meiner Diplomarbeit wurde die erfolgreiche Darstellung DNA-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel durch eine kontinuierliche Fällung vorgestellt. Dieser Aufbau wurde zur Darstellung Carboxymethylcellulose-stabilisierter und DNA-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel übernommen. Die Pumpenschläuche der Calcium- und der Phosphat-Lösungen waren über ein Y-Stück verbunden. Die durchströmenden Lösungen mischten sich in einem 50 mm langen und 2,54 mm breiten zylindrischen Abschnitt, in dem die Calciumphosphat-Keimbildung einsetzte. Nach der Keimbildung erfolgte die Zudosierung der Polymerlösung zur Funktionalisierung der Partikel über ein weiteres Y-Stück.

So war es möglich, durch eine Variation der Calciumphosphat-Keimbildungszeit (τ_j) und der anschließenden Zugabe des Polymers die optimalen Fällungsbedingungen für die kolloidale Stabilität zu erreichen. Der schematische Aufbau des Fällungsreaktors ist in Abbildung 13 dargestellt.

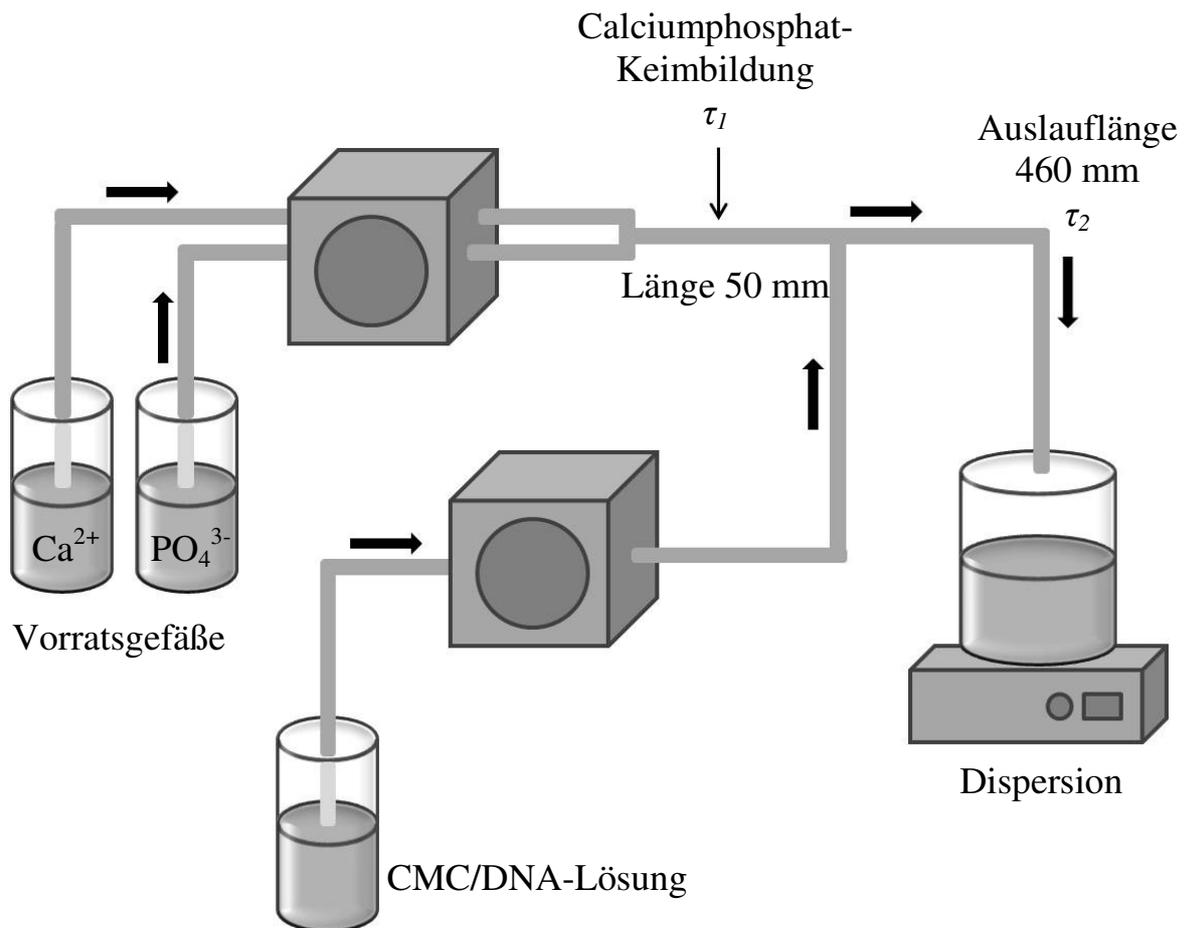


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Fällungsreaktors zur Darstellung Carboxymethylcellulose-stabilisierter und DNA-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die Funktionalisierung durch DNA erfolgte mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Carboxymethylcellulose (2 g L^{-1}) und DNA (1 g L^{-1}) (siehe Kapitel 3.1.1).

Zur Darstellung der Nanopartikel wurde eine Pumpgeschwindigkeit der Calcium- und der Phosphat-Lösung von jeweils 30 mL min^{-1} gewählt. Die resultierende Calciumphosphat-Keimbildungszeit τ_1 lag damit bei 0,25 s. Die Polymerzugabe erfolgte mit einer Pumpgeschwindigkeit von 10 mL min^{-1} . Die mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltenen Größenverteilungen der

Nanopartikel sind in Abbildung 14 für unterschiedliche Mischungsverhältnisse von CMC und DNA zusammengefasst.

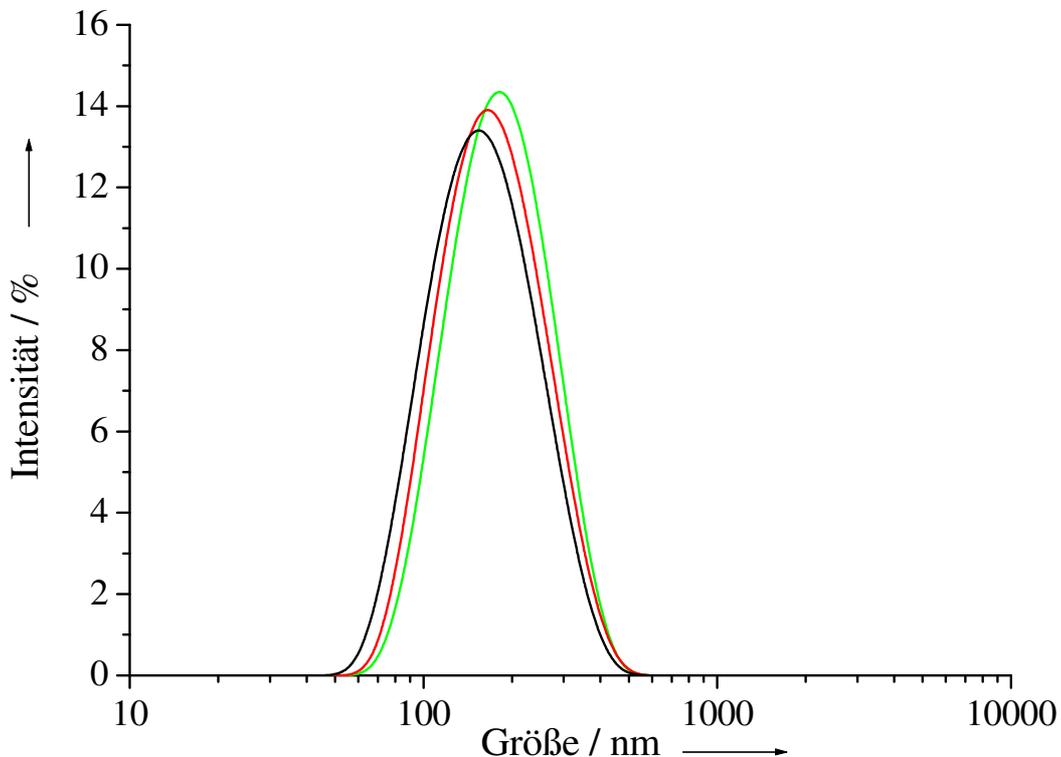


Abbildung 14: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilungen der mit unterschiedlichen Mengen von Carboxymethylcellulose und DNA funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel. Beispielhaft sind die Größenverteilungen für die Volumenverhältnisse der Lösungen von CMC:DNA von 10:0,5 (grün), 10:5 (rot) und 10:10 (schwarz) dargestellt.

Die hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel lagen zwischen 150 nm und 190 nm. Die zugehörigen Polydispersitätsindizes bestätigten mit Werten zwischen 0,14 und 0,18 das Vorliegen von monodispersen Dispersionen. Die Zetapotentiale zeigten Werte zwischen -27 mV und -30 mV. Diese Werte deuteten auf eine elektrostatische Stabilisierung durch die eingesetzte Polymermischung hin. Zusätzlich war eine sterische Stabilisierung durch die voluminösen Polymerschleifen des gequollenen Polymers gewährleistet.

Ergebnisse und Diskussion

Zur näheren Charakterisierung wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der zentrifugierten und redispergierten Calciumphosphat-Nanopartikel angefertigt. In Abbildung 15 sind repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln gezeigt.

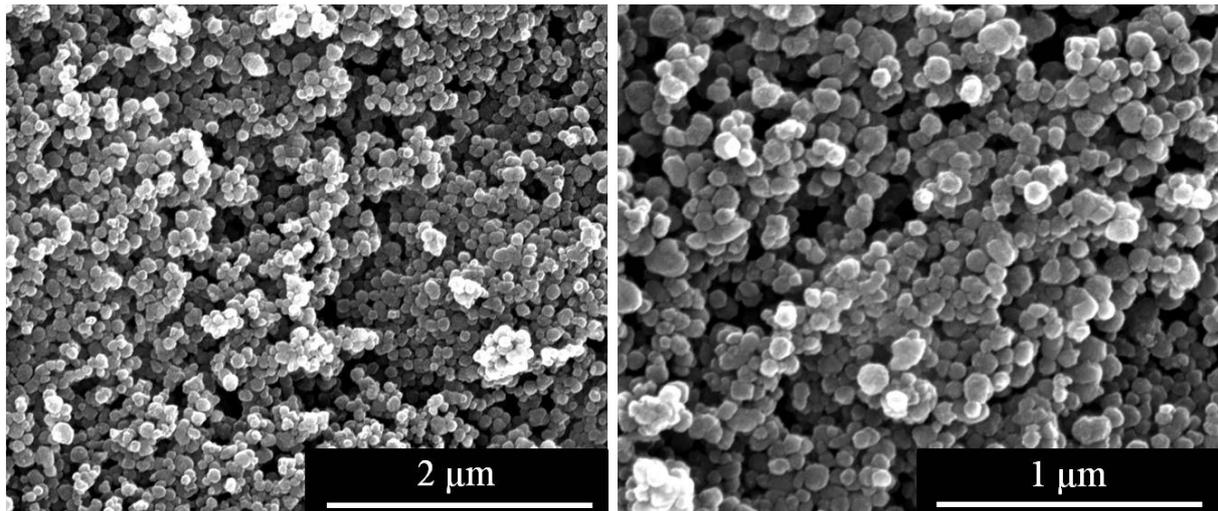


Abbildung 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach der Aufreinigung in unterschiedlichen Vergrößerungen.

Die in Abbildung 15 dargestellten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen kugelförmige Nanopartikel in annähernd einheitlicher Form und Größe mit durchschnittlichen Durchmessern von 50 nm bis 80 nm. Die im Vergleich zur Dynamischen Lichtstreuung geringere Größe kam durch das Einfallen der organischen Hülle im Hochvakuum zustande. So wurde lediglich der Calciumphosphat-Kern abgebildet. Im Gegensatz dazu wurde in der Dynamischen Lichtstreuung das Aufquellen der stabilisierenden Polymerschicht durch Wassermoleküle und Gegenionen berücksichtigt.

Zur weiteren Charakterisierung wurden thermogravimetrische Analysen durchgeführt.

Hierzu wurden die abzentrifugierten und getrockneten Feststoffe der Dispersionen in einen Korund-Tiegel überführt und unter Sauerstoffatmosphäre thermisch zersetzt. Die erhaltenen Thermogramme unterschieden sich nur unwesentlich voneinander. Ein repräsentatives Thermogramm für ein Mischungsverhältnis von CMC:DNA von 10:5 ist in Abbildung 16 dargestellt.

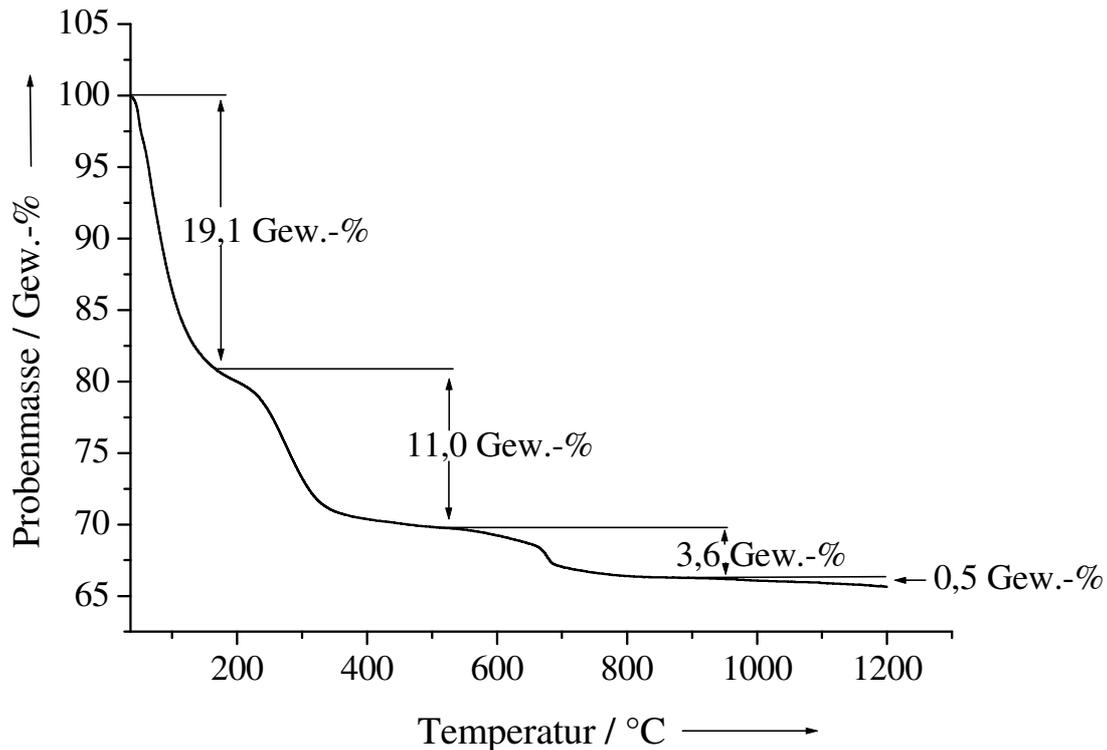


Abbildung 16: Thermogramm der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel für ein Mischungsverhältnis von CMC:DNA von 10:5, durchgeführt unter Sauerstoffatmosphäre (Durchflussgeschwindigkeit 50 mL min^{-1}) und einer Heizrate von 1 K min^{-1} nach Zentrifugation und Trocknung an der Luft für zwei Tage.

Im Temperaturbereich von 100 °C bis 180 °C ließ sich die thermische Desorption von Wasser erkennen. Die in Abbildung 16 dargestellten Calciumphosphat-Nanopartikel besaßen einen Wasseranteil von etwa $19,1 \text{ Gew.-%}$. Im Temperaturbereich von 200 °C bis 1000 °C kam es zum Abbrand der organischen Bestandteile (Carboxymethylcellulose und DNA). In

Ergebnisse und Diskussion

diesem Temperaturbereich ließen sich die Massenverluste in zwei Stufen trennen. Die erste Stufe lag im Temperaturbereich von 200 °C bis 500 °C (11,0 Gew.-%), die zweite im Bereich von 500 °C bis 1000 °C (3,6 Gew.-%). Damit ergab sich für die CMC-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel ein organischer Gesamtanteil von 14,6 Gew.-%. Im Temperaturbereich ab 1000 °C bis 1200 °C kam es zur thermischen Abspaltung von Kohlendioxid (0,5 Gew.-%) aus den während der Fällung eingebauten Carbonat-Ionen. Der Einbau von Carbonat-Ionen in das Calciumphosphat-Gitter erfolgte durch den basischen Charakter der Stammlösungen unter Luftatmosphäre. Hier wurde Kohlendioxid im Basischen unter Ausbildung von Hydrogencarbonat-Ionen gelöst. Nach erfolgter Deprotonierung wurden die resultierenden Carbonat-Ionen in das Gitter eingebaut.

Um den adsorbierten DNA-Anteil an den Partikeln in Abhängigkeit vom eingesetzten Mischungsverhältnis von Carboxymethylcellulose und DNA zu untersuchen, wurden vom abzentrifugierten und getrockneten Feststoff elementaranalytische Bestimmungen durchgeführt. Da weder in reinem Calciumphosphat noch in der Carboxymethylcellulose Stickstoff vorlag, konnten die aus der Elementaranalytik erhaltenen Anteile für Stickstoff nur von der eingesetzten DNA stammen. Über den zuvor elementaranalytisch bestimmten Stickstoffanteil der reinen DNA ließ sich so der prozentuale Anteil der adsorbierten DNA quantifizieren (Gleichung 7).

$$\frac{N_{\text{DNA, ad}}}{N_{\text{DNA, rein}}} \cdot 100 \text{ Gew.-%} = X_{\text{DNA, ad}} \quad (7)$$

$N_{\text{DNA, ad}}$: Adsorbierter Stickstoffanteil an den Partikeln

$N_{\text{DNA, rein}}$: Stickstoffanteil der reinen DNA

$X_{\text{DNA, ad}}$: Prozentual adsorbierter DNA-Anteil an den Partikel

Ergebnisse und Diskussion

Eine beispielhafte Rechnung für ein Volumenverhältnis von CMC:DNA von 10:0,5 ergibt:

$$\frac{0,19}{14,06} \cdot 100 \text{ Gew.-%} = 1,35 \text{ Gew.-%}$$

Die mittels Thermogravimetrie erhaltenen Werte, die elementaranalytischen Daten sowie die berechneten DNA-Anteile sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

Tabelle 4: Elementaranalytische und thermogravimetrische Zusammensetzung der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel.

Volumenverhältnisse von CMC (2 g L ⁻¹) : DNA (1 g L ⁻¹)									
Komponente	1:0	10:0,25	10:0,5	10:1	10:2,5	10:5	10:7,5	10:10	0:1
Ca ²⁺ (AAS) / Gew.-%	25,6	29,6	28,7	28,2	28,2	27,9	27,2	27,2	26,5
PO ₄ ³⁻ (UV) / Gew.-%	36,1	43,8	43,1	43,2	42,8	42,0	41,7	40,9	39,3
C / Gew.-%	6,56	3,38	3,43	3,46	3,72	4,01	4,22	4,29	4,17
H / Gew.-%	2,74	2,62	2,61	2,65	2,61	2,65	2,64	2,66	2,57
N / Gew.-%	-	< 0,10	0,19	0,33	0,64	0,99	1,20	1,28	1,51
Ca/P (n:n)	1,68	1,61	1,58	1,55	1,57	1,58	1,55	1,58	1,60
Mineralanteil / Gew.-% (TG)	68,1	72,8	69,6	68,6	67,6	66,3	68,9	73,4	75,2
Organischer Anteil / Gew.-% (TG)	13,5	14,6	13,9	13,5	15,8	14,6	14,0	16,2	10,6
CO ₃ ²⁻ / Gew.-% (TG)	1,1	1,2	0,4	1,4	0,5	0,7	1,1	1,6	0,8
H ₂ O / Gew.-% (TG)	18,4	12,6	16,5	17,9	16,6	19,1	17,1	10,4	14,2
DNA-Anteil / Gew.-% berechnet	-	< 0,71	1,35	2,31	4,55	7,04	8,53	9,10	10,74

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Elementaranalytische Zusammensetzung der verwendeten Polymere CMC und DNA.

Komponente	CMC	DNA
C / Gew.-%	36,40	33,28
H / Gew.-%	5,08	4,19
N / Gew.-%	-	14,06
PO ₄ ³⁻ UV/ Gew.-%	-	6,20

Die in Tabelle 4 aufgeführten molaren Ca/P-Verhältnisse variierten leicht und lagen bei Werten zwischen 1,55 und 1,68. Damit handelte es sich fast ausschließlich um calciumdefizitären Hydroxylapatit. Ein Einfluss des Mischungsverhältnisses der verwendeten Polymere auf das Ca/P-Verhältnis war nicht zu erkennen. Aus Tabelle 4 ließ sich ein deutlicher Trend für die DNA-Beladung erkennen: Je höher der DNA-Gehalt in der Ausgangslösung, desto größer der adsorbierte DNA-Anteil auf den Partikeln.

Eine Aussage, ob DNA-funktionalisierte- neben CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln vorlagen oder diese aus einer Mischung aus CMC und DNA stabilisiert waren, konnte durch die vorliegenden Daten nicht eindeutig geklärt werden.

Für die Berechnung der Anzahl der adsorbierten DNA- bzw. CMC-Moleküle auf der Calciumphosphat-Oberfläche eines Nanopartikels für die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse der Stammlösungen wurde zunächst das Volumen eines Calciumphosphat-Nanopartikels berechnet.

Aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ließ sich ein Radius von 35 nm für einen Calciumphosphat-Nanopartikel bestimmen. Aus diesem Wert ließ sich das Volumen eines kugelförmigen Nanopartikels bestimmen.

$$V_{\text{CaP}} = \frac{4}{3} \pi r^3 = 1,796 \cdot 10^5 \text{ nm}^3 = 1,796 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3 \quad (8)$$

Ergebnisse und Diskussion

Die Masse eines Nanopartikels ließ sich über die folgende Beziehung ermitteln:

$$\begin{aligned} m_{\text{CaP}} &= V_{\text{CaP}} \cdot \rho_{\text{CaP}} = 1,796 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3 \cdot 3200 \text{ kg m}^{-3} \\ &= 5,747 \cdot 10^{-19} \text{ kg} \end{aligned} \quad (9)$$

Dieser Wert entsprach für die ausschließlich mit DNA funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel einem thermogravimetrisch bestimmten Mineralanteil von 75,2 Gew.-%. Abzüglich des Wasseranteils von 14,2 Gew.-% ergab sich ein Massenanteil eines DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikels von $100,0 \text{ Gew.-%} - 14,2 \text{ Gew.-%} = 85,8 \text{ Gew.-%}$. Die Masse eines DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikels ohne Wasser war demnach:

$$m_{\text{CaP/DNA}} = \frac{85,8}{75,2} \cdot m_{\text{CaP}} = 6,557 \cdot 10^{-19} \text{ kg} \quad (10)$$

Mit dem prozentual adsorbierten DNA-Anteil von 10,74 Gew.-% war die Masse an DNA auf einem Calciumphosphat-Nanopartikel $m_{\text{DNA}} = 7,042 \cdot 10^{-20} \text{ kg}$. Die Molmasse M_{DNA} der eingesetzten DNA lag bei 20000 g mol^{-1} . Die Masse eines DNA-Moleküls ließ sich aus dem Quotienten der DNA-Molmasse und der Avogadrozahl berechnen:

$$m_{\text{DNA-Molekül}} = \frac{M_{\text{DNA}}}{K_{\text{Av}}} = \frac{20 \text{ kg mol}^{-1}}{6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}} = 3,321 \cdot 10^{-23} \text{ kg} \quad (11)$$

Die Anzahl der auf der Oberfläche adsorbierten DNA-Moleküle auf der Calciumphosphat-Oberfläche eines Nanopartikels ließ sich mit der folgenden Beziehung bestimmen:

Ergebnisse und Diskussion

$$N_{\text{DNA-Molekül}} = \frac{m_{\text{DNA}}}{m_{\text{DNA-Molekül}}} = \frac{7,042 \cdot 10^{-20} \text{ kg}}{3,321 \cdot 10^{-23} \text{ kg}} = 2120 \quad (12)$$

Damit waren 2120 DNA-Moleküle auf einem ausschließlich mit DNA-funktionalisiertem Calciumphosphat-Nanopartikel adsorbiert. Der Platzbedarf eines auf der Calciumphosphat-Oberfläche adsorbierten DNA-Moleküls A_{DNA} ließ sich aus dem Quotienten der Oberfläche eines Nanopartikels A_{CaP} und der adsorbierten Anzahl der DNA-Moleküle $N_{\text{DNA-Molekül}}$ bestimmen:

$$A_{\text{CaP}} = 4\pi r^2 = 15394 \text{ nm}^2 \quad (13)$$

$$A_{\text{DNA}} = \frac{A_{\text{CaP}}}{N_{\text{DNA-Molekül}}} = \frac{15394 \text{ nm}^2}{2120} = 7,26 \text{ nm}^2 \quad (14)$$

Der durchschnittliche Platzbedarf eines auf der Calciumphosphat-Oberfläche adsorbierten DNA-Moleküls betrug damit $7,3 \text{ nm}^2$. Die Länge eines DNA-Moleküls mit 25 Basenpaaren liegt bei etwa 10 nm .^[107] Der Durchmesser einer Helixwindung beträgt etwa 2 nm .^[108] So müsste für ein adsorbiertes und hydratisiertes DNA-Molekül mit etwa 50 Basenpaaren ein weitaus größerer Platzbedarf zu finden sein. Eine Erklärung für den verhältnismäßig geringen Wert könnte zum einen daran liegen, dass die adsorbierte DNA kompakt und in einer Knäuelstruktur auf der Calciumphosphat-Oberfläche adsorbiert war. Zum anderen könnte die DNA endständig auf der Calciumphosphat-Oberfläche adsorbiert sein und büstenartig in das Umgebungsmedium ragen.

Für die CMC- und DNA-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel ließen sich gleiche Berechnungen durchführen. Für diese Berechnungen mussten die elementaranalytisch bestimmten Kohlenstoffanteile berücksichtigt werden. Ausgehend von der adsorbierten DNA-Menge ließ sich durch die Differenz der Kohlenstoffwerte der adsorbierte Anteil der CMC an den Partikeln berechnen.

Ergebnisse und Diskussion

Der zugehörige Platzbedarf von CMC (90000 Da) auf einem Calciumphosphat-Nanopartikel ließ sich analog bestimmen. Als Ergebnis erhielt man einen Wert von etwa 19,4 nm². Dieser Platzbedarf war für ein Cellulosederivat mit einer Molekularmasse von 90000 Da ebenfalls zu gering. Eine mögliche Ursache dafür könnte in einer kompakten und dichten Formation der adsorbierten Carboxymethylcellulose-Einheiten liegen. Zusätzlich wäre eine verknäuelte Struktur der adsorbierten Carboxymethylcellulose auf der Calciumphosphat-Oberfläche denkbar. Eine Auflistung der jeweiligen Anteile an CMC und DNA in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Zusammenstellung der adsorbierten CMC- und DNA-Anteile auf der Oberfläche eines Calciumphosphat-Nanopartikels in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis der Stammlösungen von CMC:DNA.

CMC:DNA	CMC- Moleküle	CMC / Gew.-%	DNA- Moleküle	DNA / Gew.-%
1:0	793	18,02	-	-
10:0,5	378	8,10	280	1,35
10:1	340	7,39	479	2,31
10:2,5	288	6,07	972	4,55
10:5	215	4,59	1487	7,04
10:7,5	175	3,79	1777	8,53
10:10	163	3,47	1923	9,10
0:1	-	-	2120	10,74

Trägt man die auf den Partikeln adsorbierten Polymeranteile von CMC und DNA in Abhängigkeit des DNA-Anteils der Stammlösungen auf (Tabelle 2), so erhält man den in Abbildung 17 dargestellten Verlauf.

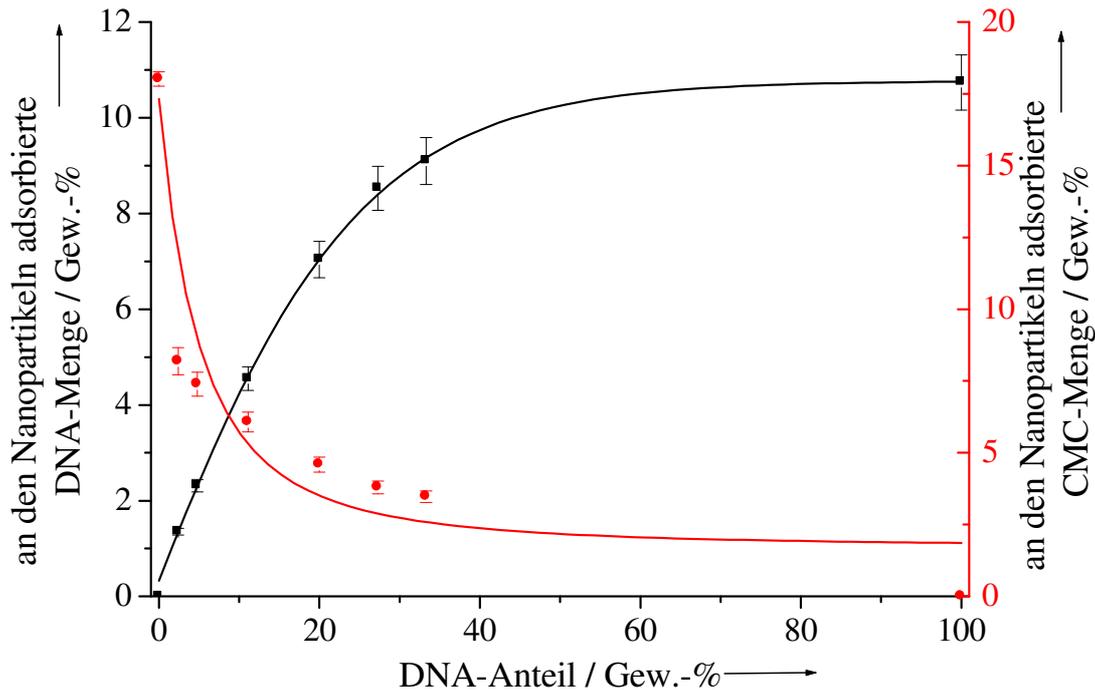


Abbildung 17: Berechnete Anteile der auf den Calciumphosphat-Nanopartikeln adsorbierten DNA- (schwarz) bzw. CMC-Mengen (rot) in Abhängigkeit vom Massenverhältnis der Ausgangslösung (DNA:CMC).

Der überproportionale Anstieg der adsorbierten DNA-Menge bei vergleichsweise geringen DNA-Konzentrationen der Ausgangslösungen (0-20 Gew.-% DNA) lässt sich durch die hohe Affinität des Phosphat-Rückgrats der DNA zu den auf der Calciumphosphat-Oberfläche befindlichen Calcium-Ionen erklären. Dieser Anteil stieg für höhere DNA-Konzentrationen der Ausgangslösungen weiter an, näherte sich allerdings einem DNA-Adsorptionsgrenzwert im Bereich von 11 Gew.-%. Hier war eine vollständige Sättigung der Calciumphosphat-Nanopartikeloberfläche durch DNA erreicht.

Um die Kristallinität der Polymer-beschichteten Calciumphosphat-Nanopartikel zu bestimmen, wurde der abzentrifugierte und getrocknete Feststoff mittels Röntgenpulverdiffraktometrie untersucht. Ein repräsentatives Diffraktogramm für ein Polymermischungsverhältnis von CMC:DNA von 10:0,5 ist in Abbildung 18 dargestellt.

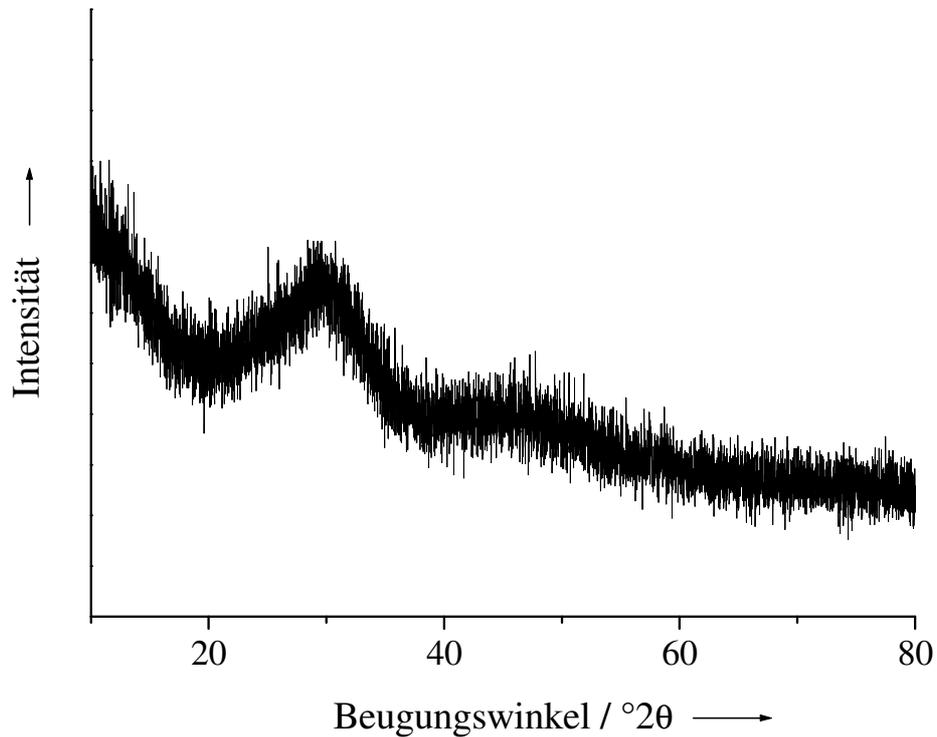


Abbildung 18: Röntgenpulverdiffraktogramm der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel bei einem Mischungsverhältnis von CMC:DNA von 10:0,5.

Das erhaltene Diffraktogramm zeigte eine sehr starke Reflexverbreiterung, die den amorphen Charakter der Probe deutlich werden ließ.

4.1.4.2 Lyophilisation von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln in Gegenwart unterschiedlicher Kryoprotektoren.

Die Langzeitlagerung biologisch-aktiver Substanzen ist aus industrieller Sicht von großer Bedeutung. So können Proteine in Lösung bei Lagerung über einen längeren Zeitraum ihre Faltung ändern, was zur Agglomeration und schließlich zur Denaturierung führen kann.^[109-111] Für RNA-haltige Wirkstoffe, insbesondere bei RNA-haltigen Dispersionen, kommt es im wässrigen Medium nach einiger Zeit zur Hydrolyse und damit zum Abbau der Nukleotidsequenz.^[112, 113] Darüber hinaus kann für kolloidal-stabilisierte Dispersionen eine Alterung in Form einer Koagulation der Partikel eintreten.^[2, 68] Die agglomerierten Partikel können so nicht mehr effektiv endozytotisch von Zellen aufgenommen werden.^[114, 115]

Um diese Problematik zu umgehen, wird der Einsatz sogenannter Kryoprotektoren in der Literatur beschrieben.^[114, 116-121] Kryoprotektoren werden in Gegenwart des Biomoleküls gelöst, schockgefroren und anschließend lyophilisiert. Da während der Lyophilisation die Wassermoleküle sublimiert werden und somit eine Denaturierung eintreten kann, müssen die eingesetzten Kryoprotektoren die Stabilität des zu trocknenden Gutes unter Beibehaltung seiner dreidimensionalen Struktur gewährleisten.^[114] Dabei bildet sich ein sogenannter Zuckerkuchen bzw. Lyokuchen aus, in den die Biomoleküle eingebettet sind.^[114]

Weiterhin sollten die eingesetzten Systeme nicht toxisch sein und keine chemische Reaktion mit dem zu trocknenden Gut eingehen. Aus diesem Grund bedient man sich unter anderem der Mono- oder Disaccharide. Diese Moleküle verfügen über Hydroxylgruppen, die die Position der Wassermoleküle im hydratisierten Gerüst einnehmen können.^[114] Während des Trocknungsprozesses muss die Temperatur des zu trocknenden Gutes unterhalb der

Ergebnisse und Diskussion

Glasübergangstemperatur T_g gehalten werden. Steigt die Temperatur während des Trocknungsprozesses über T_g , so kommt es zum Kollaps und damit zum Einfall des Lyokuchens, was zur Denaturierung des Biomoleküls führen kann.^[110, 114]

Die zur Stabilisierung eingesetzten Kryoprotektoren sind in Abbildung 19 dargestellt. Hierbei handelt es sich um die häufig eingesetzten Disaccharide Saccharose, Trehalose und Lactose sowie das Monosaccharid Mannitol.^[110, 114, 117]

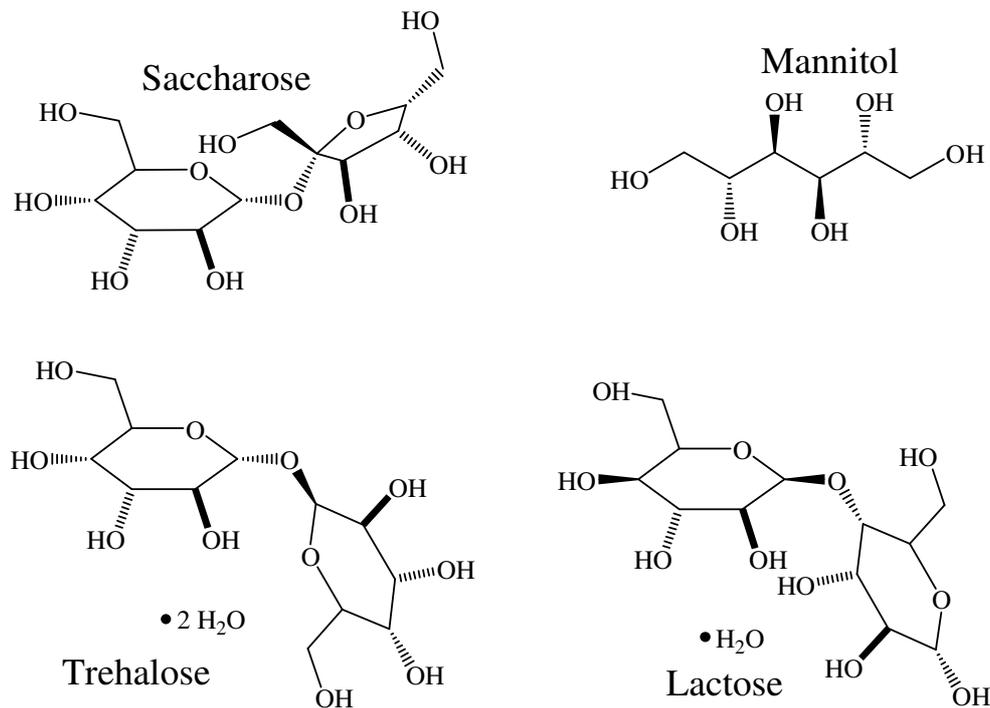


Abbildung 19: Auflistung der eingesetzten Kryoprotektoren.

Für die Gefriertrocknung wurden jeweils 10 mg der in Abbildung 19 dargestellten Kryoprotektoren in 1 mL der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel-Dispersion gelöst. Im Anschluss erfolgten das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und die Lyophilisation bei -7 °C bei 0,31 mbar für 24 h. In Abbildung 20 sind die Gegenüberstellung der erhaltenen Lyokuchen sowie die nach der Wasserzugabe regenerierten Dispersionen dargestellt.

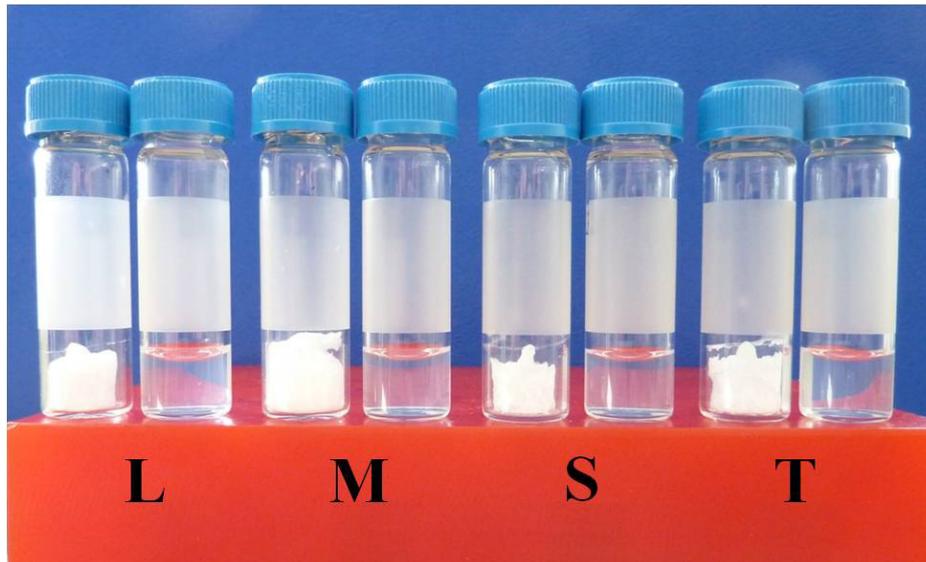


Abbildung 20: Zuckerkuchen der mit Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart unterschiedlicher Kryoprotektoren (jeweils links) und nach der nachträglichen Wasseraufnahme (jeweils rechts). **L:** Lactose; **M:** Mannitol; **S:** Saccharose; **T:** Trehalose.

Die in Abbildung 20 dargestellten Lyokuchen (L: Lactose; M: Mannitol; S: Saccharose und T: Trehalose) waren voluminös und formstabil. Ein Kollaps der Lyokuchen durch zu geringe Menge der eingesetzten Kryoprotektoren wurde nur für Saccharose beobachtet. Die nach der Wasseraufnahme regenerierten Dispersionen zeigten makroskopisch keine Agglomerate. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde der kolloidale Charakter der regenerierten Dispersionen nach der Wasseraufnahme mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht. Bei den hier eingesetzten Mengen an Kryoprotektoren zeichneten sich lediglich Lactose und Trehalose als aussichtsreiche Kandidaten für eine gute Kryokonservierung aus. Nur diese Kryoprotektoren konnten in den hier eingesetzten Mengen eine Beibehaltung des monodispersen Charakters nach der Wasseraufnahme gewährleisten. Die Überlagerung der Größenverteilungen für die mit Carboxymethylcellulose stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel (Volumenverhältnis CMC:DNA = 10:2,5) vor

und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose sind in Abbildung 21 dargestellt.

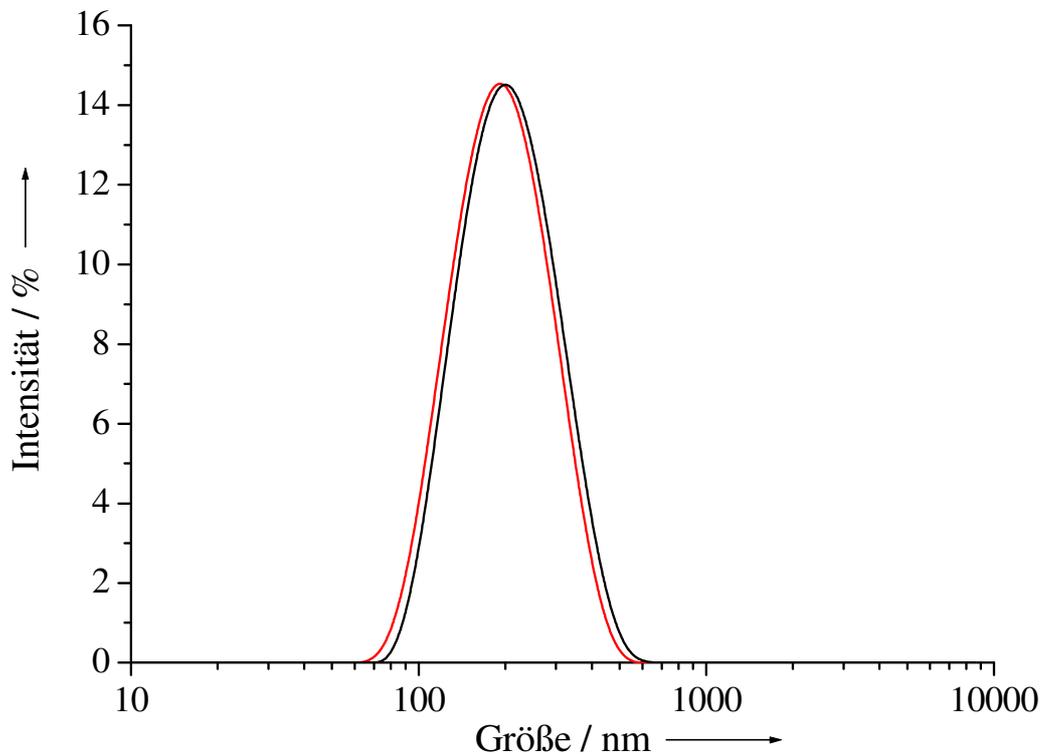


Abbildung 21: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilungen der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel vor (rot) und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose (schwarz). Repräsentativ ist das Ergebnis für das Volumenverhältnis von CMC:DNA = 10:2,5 dargestellt.

Die Ergebnisse in Abbildung 21 zeigen, dass der monodisperse Charakter der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit DNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose und anschließender Wasseraufnahme nicht gemindert wurde. Es waren makroskopisch keine Agglomerate identifizierbar. Das Konzept der Kryokonservierung mit Trehalose konnte somit auch auf dispergierte Calciumphosphat-Nanopartikel angewendet werden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7 enthält die hydrodynamischen Durchmesser, die zugehörigen Polydispersitätsindizes und die Zetapotentiale vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose für alle DNA-Beladungen.

Tabelle 7: Zusammenstellung der hydrodynamischen Radien, der zugehörigen Polydispersitätsindizes und der Zetapotentiale vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose für die unterschiedlich DNA-beladenen und Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

vor Lyophilisation				nach Lyophilisation		
Volumenverhältnis CMC:DNA / mL	Größe / nm	PDI	ζ -Potential / mV	Größe / nm	PDI	ζ -Potential / mV
10:0,25	179	0,157	-28±6	200	0,154	-20±5
10:0,5	176	0,143	-28 ±7	178	0,168	-19±6
10:1	173	0,156	-27±7	182	0,191	-26±6
10:2,5	176	0,138	-28±6	191	0,116	-27±5
10:5	164	0,158	-30±6	179	0,145	-30±5
10:7,5	155	0,180	-29±6	162	0,128	-27±5
10:10	153	0,140	-28±6	174	0,189	-26±6

4.1.4.3 Zellbiologische Untersuchung zur Gen-Stummschaltung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit siRNA beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose

Die Herstellung Carboxymethylcellulose-stabilisierter und siRNA-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel mit der in Kapitel 4.1.4.1 vorgestellten Fällungsapparatur ließ sich mit der zur Verfügung stehenden Menge an siRNA nicht realisieren.

Aus diesem Grund wurde der Fällungsaufbau von Sokolova *et al.* übernommen.^[122] Hierbei wurden die Calcium- und die Phosphat-Lösung schnell in ein Becherglas gepumpt, um die Calciumphosphat-Keimbildung zu initiieren. Nach kurzer Zeit wurde ein definiertes Volumen der unfunktionalisierten Calciumphosphat-Suspension mit einer Spritze entnommen und nachträglich zu einer Polymervorlage aus einer Mischung von Carboxymethylcellulose und siRNA gegeben. Der schematische Ablauf ist in Abbildung 22 dargestellt.

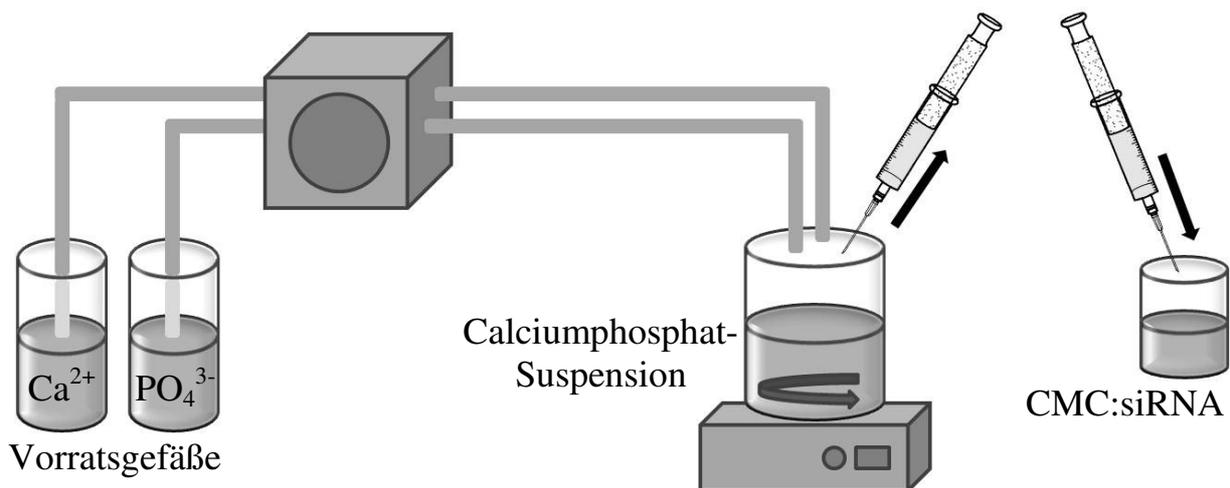


Abbildung 22: Schematischer Versuchsaufbau zur Darstellung Carboxymethylcellulose-stabilisierter und siRNA-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel.

Ergebnisse und Diskussion

Die zur Funktionalisierung eingesetzten Volumina der unfunktionalisierten Calciumphosphat-Suspension sowie die eingesetzten Mengen an Carboxymethylcellulose (CMC) und siRNA (anti-EGFP) für unterschiedliche Mischungsverhältnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Zusammenstellung der eingesetzten Volumina zur Darstellung Carboxymethylcellulose-stabilisierter und siRNA-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel. Des Weiteren sind die finalen Mengen der eingesetzten siRNA für unterschiedliche Mischungsverhältnisse pro *well* angegeben.

Komponente	10:0,25	10:0,5	10:1,0	10:2,5	10:5,0	10:7,5	10:10,0
CaP / μL	943	943	472	283	189	189	189
CMC / μL	153,3	149,6	71,4	39,3	21,0	18,0	15,7
siRNA / μL	3,8	7,6	7,2	7,9	10,5	13,5	15,7
siRNA pro <i>well</i> / μg	0,13	0,25	0,48	0,88	1,76	2,27	2,64

Zur Gefriertrocknung wurden die erhaltenen Dispersionen mit Trehalose versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Die Dispersionen konnten durch einfache Wasserzugabe zu den Lyokuchen redispergiert werden. Ein ähnliches Konzept wurde bereits von Anchordoquy *et al.* publiziert. Dort wurden Lipid/DNA-Komplexe in Gegenwart von Trehalose und Saccharose ohne Verlust der Transfektionseffizienz und der kolloidalen Stabilität lyophilisiert.^[123, 124]

Für die Gen-Stummschaltungsversuche wurden HeLa-Zellen, die das EGF-Protein (*enhanced green fluorescent protein*) stabil exprimieren (HeLa-EGFP), verwendet.^[7, 125] Aufgrund der kontinuierlichen Produktion von EGFP fluoreszieren die Zellen bei geeigneter Lichtbestrahlung grün. Die Sequenz der eingesetzten siRNA (anti-EGFP) ist komplementär zur mRNA, die das EGF-Protein kodiert. Der RISC-loading Komplex bindet spezifisch an diese mRNA,

Ergebnisse und Diskussion

die post-transkriptional gespalten und von Enzymen im Zytoplasma degradiert wird. In Folge bleibt die Expression von EGFP aus, und die grüne Fluoreszenz der Zellen verschwindet.

Da bei den Gen-Stummschaltungsversuchen keine vollständige Expression von EGFP in allen Zellen erfolgte, musste zu jedem Experiment eine Kontrolle durchgeführt werden, um den Anteil der Zellen zu bestimmen, die das EGFP nicht exprimierten. Die Gen-Stummschaltungseffizienz berechnet sich dann nach Gleichung (3).

$$\frac{\left(\frac{\text{Anteil der nicht fluoreszierenden Zellen nach erfolgter Transfektion}}{\text{Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}} \right) - \left(\frac{\text{Anteil der nicht fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}}{\text{Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}} \right)}{\text{Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle}} \cdot 100 \% \quad (3)$$

Hier wird die Differenz der nicht fluoreszierenden Zellen in der Kontrolle und der nicht fluoreszierenden Zellen nach erfolgter Transfektion mit den grün-fluoreszierenden Zellen vor der Gen-Stummschaltung ins Verhältnis gesetzt.

Eine repräsentative Zusammenstellung von fluoreszenz- und durchlichtmikroskopischen Aufnahmen nach erfolgter Gen-Stummschaltung vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose für ein Mischungsverhältnis von CMC:siRNA von 10:5 ist in Abbildung 23 zusammengestellt.

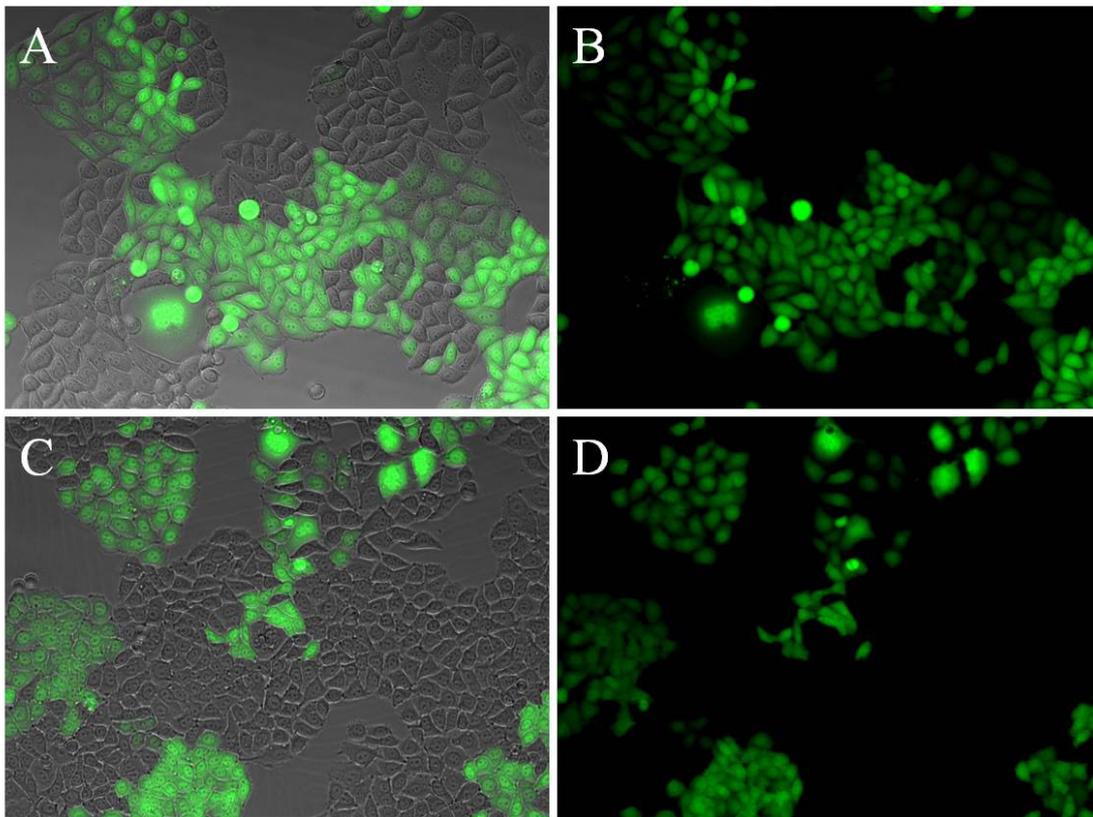


Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische und durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit anti-EGFP-siRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln (Mischungsverhältnis von CMC:siRNA von 10:5) zur Gen-Stummschaltung des EGF-Proteins an HeLa-EGFP-Zellen vor (A, B) und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose (C, D).

In Abbildung 23 zeigt sich, dass grün-fluoreszierende Zellen neben nicht grün-fluoreszierenden Zellen vorlagen. Damit kam es zu einer erfolgreichen Gen-Stummschaltung von EGFP durch die siRNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die nach Gleichung (3) ermittelten Gen-Stummschaltungseffizienzen für die mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen an CMC:siRNA funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose sind in Abbildung 24 zusammengestellt.

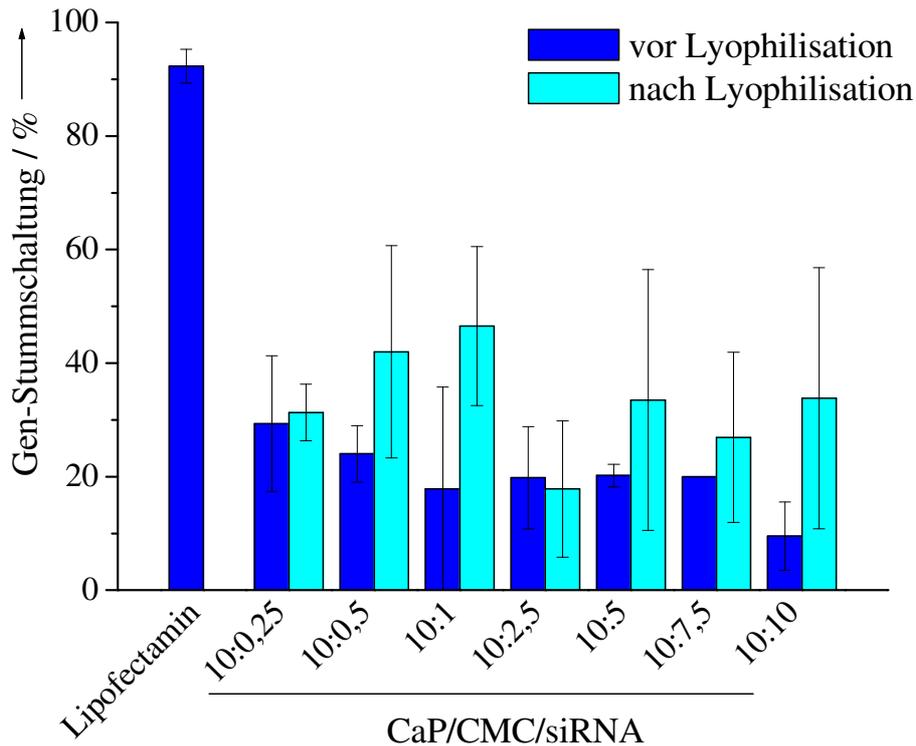


Abbildung 24: Gen-Stummschaltungseffizienzen der mit unterschiedlichen Mengen an Carboxymethylcellulose-stabilisierten und siRNA (anti-EGFP)-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel vor (dunkelblau) und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose (hellblau). Zum Vergleich ist die Gen-Stummschaltungseffizienz mit Lipofectamin dargestellt.

Aus Abbildung 24 geht hervor, dass Lipofectamin als Kontrolle mit einer Gen-Stummschaltungseffizienz von 93 % nahezu quantitativ die Bildung von EGFP in dauerhaft EGFP-exprimierenden HeLa-Zellen herunter regulierte. Die Gen-Stummschaltungseffizienzen der mit unterschiedlichen Mengen an siRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel lagen im Schnitt bei 20 %. Diese Effizienzen waren unabhängig von der eingesetzten siRNA-Menge und vergleichbar mit den einschaligen CaP/siRNA-Nanopartikeln von Sokolova *et al.*^[69, 125, 126] Bei den in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Systemen zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Gen-Stummschaltungseffizienz (30 % bis 50 %), vergleichbar mit den dreischaligen CaP/siRNA-Nanopartikeln

von Sokolova *et al.*^[125, 126] Die Anwesenheit von Trehalose stimulierte demnach die endozytotische Aufnahme der siRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel, woraus eine gesteigerte Gen-Stummschaltung resultierte. Dieser stimulierende Effekt durch Trehalose wurde bereits von Tseng *et al.* 2007 publiziert. Hier zeigten die generierten Lipid/DNA- bzw. PEI/DNA-Komplexe in Gegenwart von Trehalose eine deutliche Steigerung der Transfektionseffizienzen.^[127, 128] Trehalose zeigt aufgrund des hydrophilen Charakters eine hohe Affinität zu den polaren Gruppen der Phospholipid-Doppelschicht und der dort eingebauten Proteine.^[129, 130] Als Kryoprotektor schützt Trehalose die Integrität und Funktion der Zellmembran bei schwankenden Umgebungsparametern wie Hitze, Kälte oder Dehydratation.^[131, 132] Als mögliche Ursache für das erhöhte Penetrationsvermögen der Nanopartikel könnte daher eine Anlagerung der Trehalose-Moleküle auf der Membran angenommen werden, wodurch ebenfalls die Nanopartikel auf der Membran stärker immobilisiert und damit von den Zellen verstärkt endozytiert wurden.

Um die Zellvitalität zu bestimmen, wurde der MTT-Test herangezogen. Hierbei werden die zu untersuchenden Zellen mit einem wasserlöslichen Tetrazolium-Salz inkubiert. Nach erfolgter Aufnahme in die Zellen kommt es nur innerhalb der lebenden Zellen zur Reduktion des Tetrazolium-Salzes durch intrazelluläre Enzyme zu einem wasserunlöslichen Formazan-Derivat. Der resultierende Farbumschlag von gelb zu violett kann UV-Vis-spektroskopisch erfasst und die Vitalität durch ein Kontrollexperiment mit unbehandelten Zellen bestimmt werden.^[133] Die Zellvitalitäten der HeLa-EGFP-Zellen nach erfolgter Gen-Stummschaltung mit siRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln und mit Lipofectamin sind in Abbildung 25 zusammengefasst.

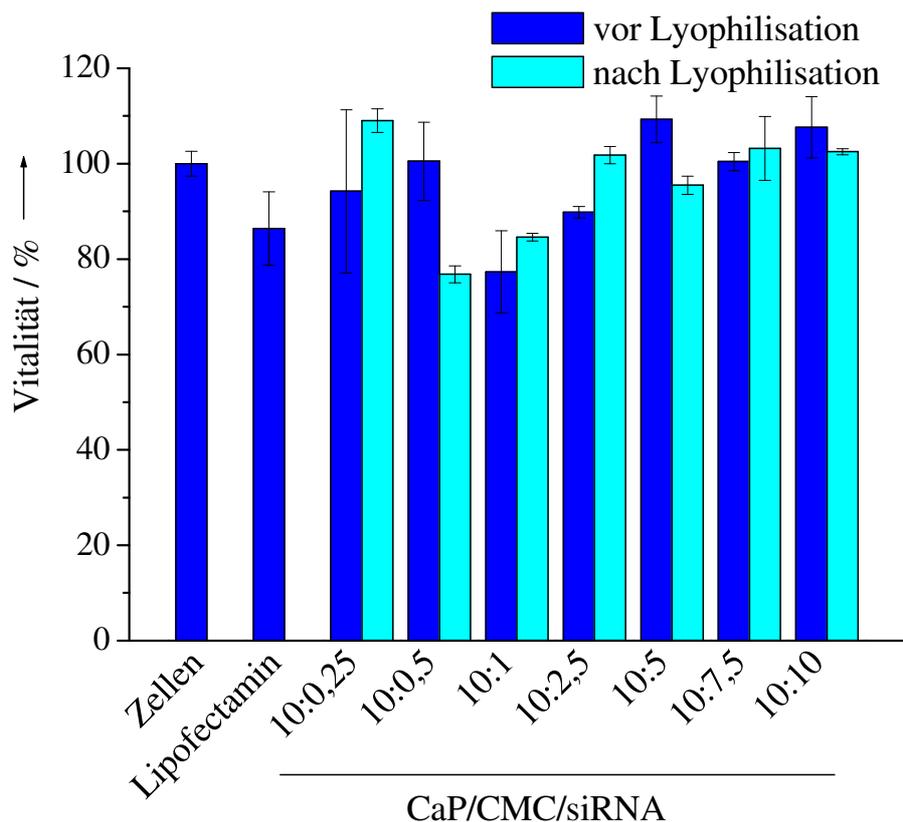


Abbildung 25: Mittels MTT-Tests bestimmte Zellvitalitäten nach Inkubation mit siRNA- und CMC-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose. Als Vergleich ist die Zellvitalität der unbehandelten Zellen sowie nach erfolgter Gen-Stummschaltung mit Lipofectamin aufgeführt.

Die Vitalität nach erfolgter Gen-Stummschaltung lag für alle Systeme bei 80 % bis 100 %. Der Trehalose-Zusatz zeigte in der eingesetzten Menge keinen toxischen Effekt auf die Zellen. Auch das zur Kontrolle eingesetzte Transfektionssystem Lipofectamin zeigte keine toxische Wirkung.

4.2 Darstellung von positiv geladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen zur Transfektion und zur Gen-Stummschaltung

4.2.1 Einführung in die Thematik

Das Knochenersatzmaterial Ostim[®] besteht aus phasenreinem Hydroxylapatit und hat nanopartikulären Charakter.^[134, 135] Ostim[®] wird vollsynthetisch hergestellt und in Form einer Paste in Knochendefekte appliziert.^[136] Es wird vor allem in der Orthopädie sowie in der Mund- und der Kieferchirurgie eingesetzt.^[135] Es dient zur Auffüllung und zur Rekonstruktion von Knochendefekten und zeichnet sich besonders durch seine große spezifische Oberfläche sowie eine gute Resorbierbarkeit aus.^[137-139] Ostim[®] stimuliert die Proliferationsrate von knochenbildenden Zellen und steigert damit die Knochenheilung. Toxikologische Studien zeigen eine gute Biokompatibilität und eine sehr gute Verträglichkeit gegenüber biologischen Systemen.^[140, 141] Bislang wird Ostim[®] im medizinischen Bereich erfolgreich eingesetzt und ist europaweit zugelassen.^[142]

Basierend auf diesem Knochenersatzmaterial wurde 2010 von mir erstmals eine Funktionalisierung durch Nukleinsäuren beschrieben. Dazu wurde die unfunktionalisierte Suspension in Gegenwart unterschiedlicher Nukleinsäuren mittels Ultraschall dispergiert, was zu einer kolloidal-stabilen Dispersion führte.^[7]

Eine Aufkonzentration der erhaltenen Dispersion führte zu einer transfizierenden Paste, basierend auf Calciumphosphat-Nanostäbchen und DNA bzw. siRNA. Die erhaltene Transfektionseffizienz dieses Materials lag unter dem Wert für einschalige Calciumphosphat-Nanopartikel nach Sokolova *et al.*^[69, 122] Die verhältnismäßig niedrige Transfektionseffizienz wurde durch den Gebrauch des Ultraschalldispersers erklärt, wodurch während des Dispersionsprozesses eine Fragmentierung der Nukleinsäuren eintrat.^[143, 144] Die Fragmentierung von Nukleinsäuren geht mit dem Verlust von genetischer

Information einher. So kann die Sequenz nicht mehr abgelesen werden, und die Expression des Proteins bleibt aus. Die Stummschaltung eines Proteins durch den Einsatz von siRNA kann auf diese Weise ebenfalls geschwächt werden.

Um die Fragmentierung der eingesetzten Nukleinsäuren während des Dispersionsprozesses ausschließen zu können, entstand die Idee, die Ostim[®]-Suspension zunächst mit Polyethylenimin (PEI), einem kationischen Polymer, zu funktionalisieren (Abbildung 26). Eine nachträgliche Beladung könnte so die Fragmentierung der Nukleinsäuren mittels Ultraschall vermeiden. Unter vielen bereits in Kapitel 4.1.1 vorgestellten Vektoren zeichnet sich Polyethylenimin durch seine hohe Adsorptionskapazität gegenüber Nukleinsäuren aus.^[145] Durch den sogenannten Protonenschwamm-Effekt (*proton-sponge-effect*) schützen die resultierenden Polyplexe die Nukleinsäuren vor dem enzymatischen Abbau durch Endonukleasen und liefern dadurch sehr hohe Transfektions-effizienzen.^[146]

Die Problematik eines solchen Transfektionsvektors liegt in der erhöhten Toxizität gegenüber den zu transfizierenden Zellen.^[147] Dies lässt sich an folgendem Beispiel erklären: Durch den *proton-sponge*-Effekt kommt es zu einer erhöhten Akkumulation der kationischen Polyplexe auf der negativ geladenen Zellmembran. Nach der endozytotischen Aufnahme des Polyplexes kann es zu einer Fusion des intrazellulären Vesikels mit einem Lysosom kommen.^[148] Durch den geringen pH-Wert innerhalb des Lysosoms erfolgt eine Protonierung der Aminogruppen des Polyethylenimins, was zu Diffusion von Wasser und Chlorid-Ionen aufgrund des osmotischen Gradienten in das Lysosom führt.^[149-151] In Folge quillt das Lysosom auf, platzt und setzt seine Bestandteile in das Zytoplasma frei. So entkommt die DNA dem lysosomalen Abbau und kann zum Zellkern gelangen. Neben der DNA werden auch die anderen Bestandteile des Lysosoms in das Zytoplasma freigesetzt, was zum Zelltod führen kann.^[47] Daher müssen Transfektionsstrategien entwickelt

werden, die mit einem möglichst geringen Anteil an Polyethylenimin oder vergleichbar toxischen Substanzen auskommen.

In der Literatur wurde der erfolgreiche Einsatz mehrschaliger DNA-beladender Calciumphosphat-Nanopartikel beschrieben. Die Transfektionseffizienz konnte durch eine zusätzliche Schicht an Polyethylenimin erheblich gesteigert werden.^[152]

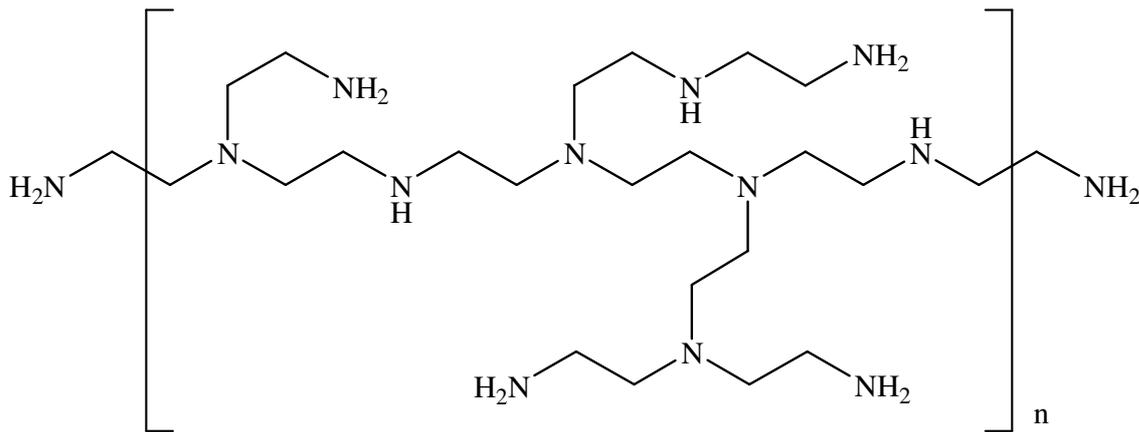


Abbildung 26: Monomereinheit des verwendeten Polyethylenimins (PEI, verzweigt, 25 kDa).

4.2.1.1 Darstellung und Charakterisierung positiv geladener Calciumphosphat-Nanostäbchen

Zur Funktionalisierung wurden 1 g der 6%igen wässrigen Ostim[®]-Suspension mit 20 mL Reinstwasser verdünnt. Im nächsten Schritt wurden 2 mL der verdünnten Suspension mit 18 mL einer Polyethylenimin-Lösung mittels Ultraschall dispergiert. Die erhaltene Dispersion wurde zur Entfernung des überschüssigen Polymeranteils ultrazentrifugiert, der Überstand entfernt und der Rückstand in Reinstwasser redispergiert. Zur Langzeitlagerung wurde die erhaltene Dispersion in Gegenwart von Trehalose als Kryoprotektor lyophilisiert. Die Zugabe einer äquivalenten Menge an Reinstwasser führte zur Regeneration der Ausgangsdispersion. Die erhaltenen Größenverteilungen, die

mittels Dynamischer Lichtstreuung erhalten wurden, sind in Abbildung 27 dargestellt.

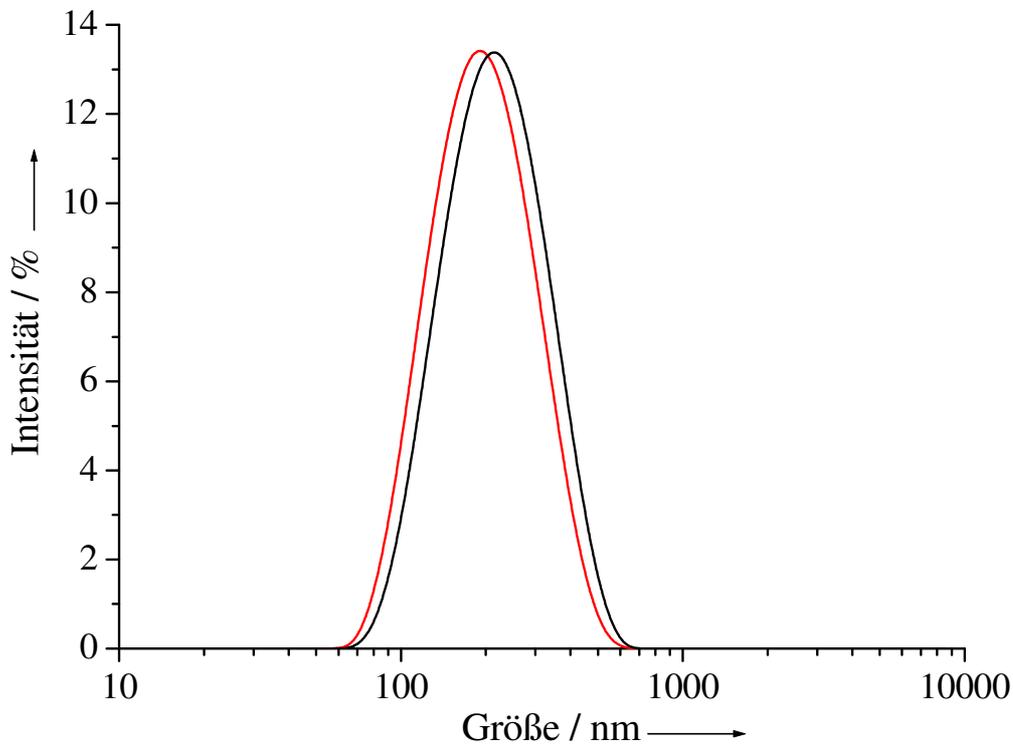


Abbildung 27: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilung der Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen nach der Aufreinigung (rot). Daneben ist die Größenverteilung der in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Dispersion nach erfolgter Wasseraufnahme dargestellt (schwarz).

Die in Abbildung 27 dargestellten Größenverteilungen zeigen einen monodispersen Charakter ohne Agglomerate. Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel nach der Aufreinigung und anschließender Redispersion lag bei 190 nm (rot). Der zugehörige Polydispersitätsindex bestätigte mit einem Wert von 0,182 das Vorliegen eines monodispersen Systems. Das Zetapotential besaß Werte zwischen 40 mV bis 45 mV. Dieser Wert deutete auf eine stark elektrostatisch stabilisierte Dispersion durch die Aminogruppen des Polyethylenimins hin, die hier protoniert vorlagen. Für die in

Ergebnisse und Diskussion

Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Dispersion (Abbildung 27, schwarz) zeigte sich nach der Wasseraufnahme eine leichte Größenzunahme. Das Maximum der Größenverteilung lieferte einen Wert von 200 nm. Dieser Größenzuwachs von 10 nm lag im Bereich des Messfehlers, könnte aber auch durch den Zusatz von Trehalose erklärt werden. Der Zusatz von Trehalose erhöhte die Viskosität des Lösungsmittels. Dadurch wurde die Brown'sche Molekularbewegung verringert und die Partikel erschienen in der Dynamischen Lichtstreuung größer. Der Polydispersitätsindex bestätigte mit einem Wert von 0,143 den monodispersen Charakter der Dispersion. Das Zetapotential lag mit einem Wert von +36 mV im elektrostatisch stabilen Bereich. Weiterhin wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der aufgereinigten Dispersion angefertigt (Abbildung 28).

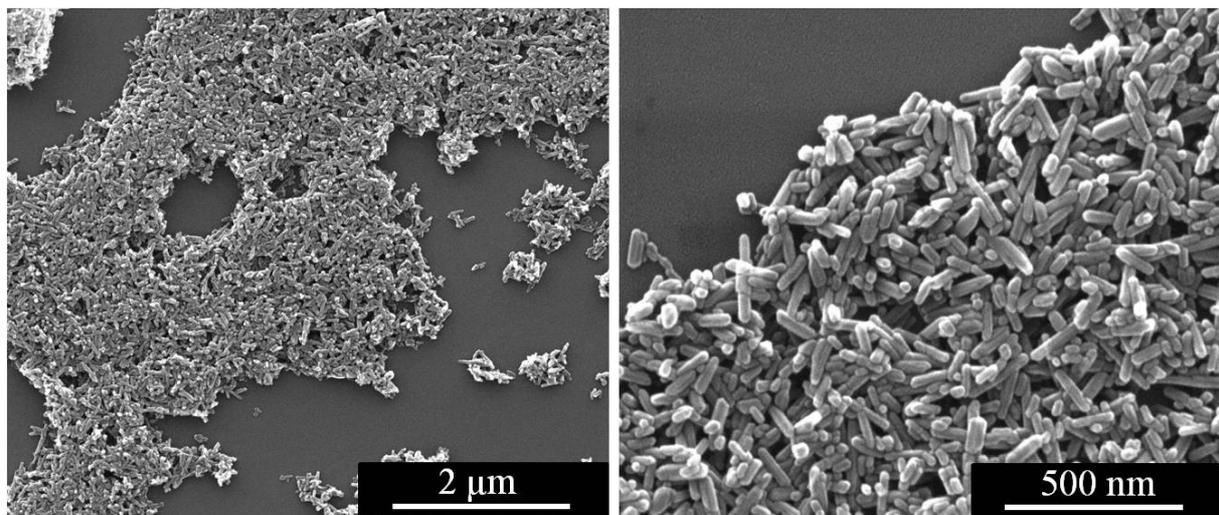


Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Polyethylenimin-beschichteten Calciumphosphat-Nanostäbchen nach der Aufreinigung.

Die in Abbildung 28 dargestellten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine stäbchenförmige Morphologie. Die Länge der Nanostäbchen lag zwischen 100 nm und 200 nm und deckte sich gut mit den Ergebnissen der Dynamischen Lichtstreuung. Für kleine Aspektverhältnisse kann der Einfluss der Rotationsbewegung zur Bestimmung der Größenverteilung von Nanostäbchen in Dispersion mittels Dynamischer Lichtstreuung vernachlässigt werden. Aufgrund der schnellen Rotation der Nanostäbchen in Dispersion fällt die Translationsbewegung stärker ins Gewicht. Die Dynamische Lichtstreuung nimmt einen kugelförmigen Charakter des dispergierten Materials an und misst somit die durchschnittliche Länge der Nanostäbchen.^[153, 154] Die Breite der Partikel belief sich auf etwa 10 nm bis 20 nm. Die stabilisierende Polymerschicht wurde aufgrund des angelegten Hochvakuums nicht beobachtet. Zur näheren Charakterisierung wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 29).

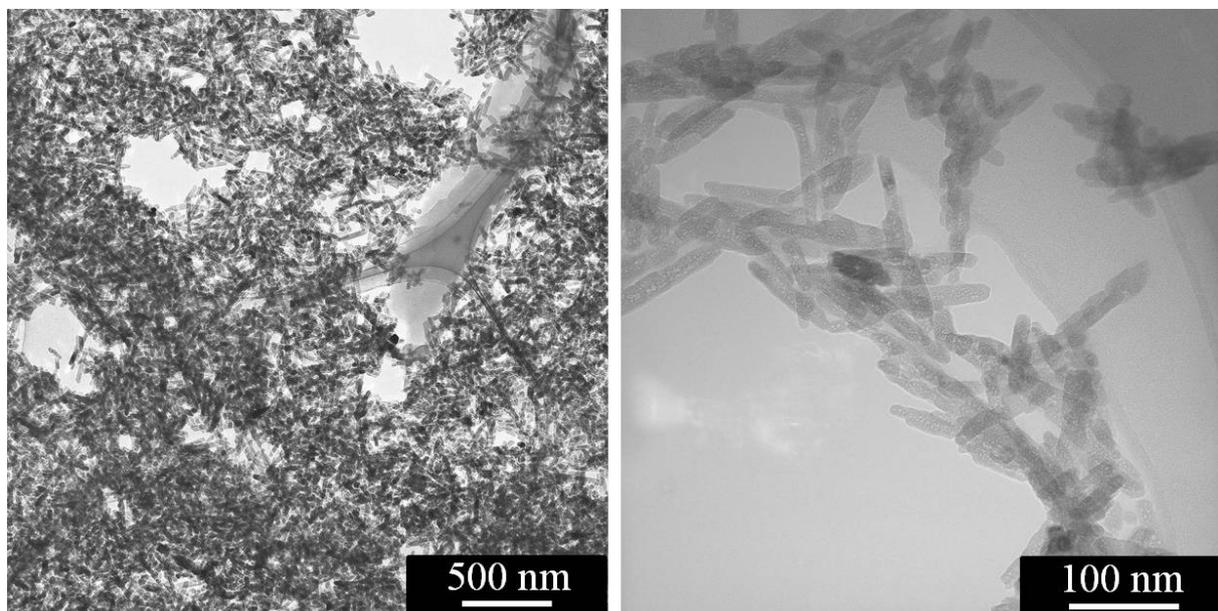


Abbildung 29: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen nach der Aufreinigung.

Ergebnisse und Diskussion

Die in Abbildung 29 aufgeführten transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen deckten sich gut mit den Resultaten der Rasterelektronenmikroskopie. Es zeigte sich ebenfalls ein stäbchenförmiger Charakter mit durchschnittlicher Länge zwischen 80 nm und 150 nm. Die Breite der Stäbchen lag auch hier bei 10 nm bis 20 nm.

In Abbildung 30 ist ein Foto der in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Dispersion abgebildet. Zum Vergleich ist die nach der Wasseraufnahme regenerierte Dispersion zu sehen. Auf der rechten Seite ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der in Trehalose eingebetteten Nanostäbchen aufgeführt.

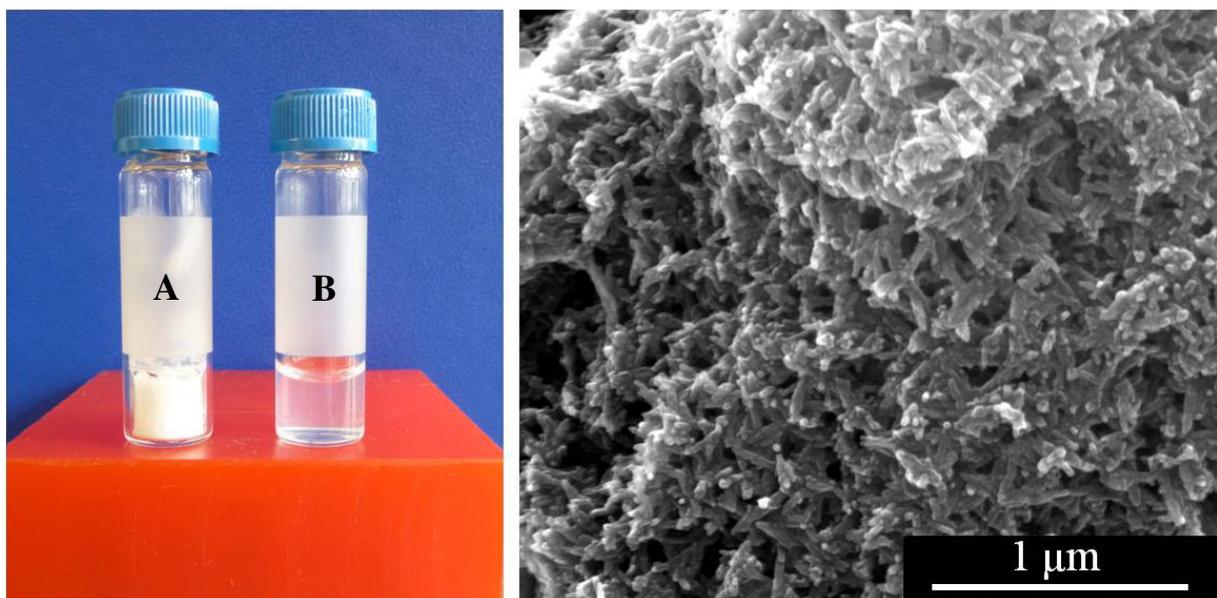


Abbildung 30: Foto der in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen vor (**A**) und nach (**B**) der Wasserzugabe (links). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der in Trehalose eingebetteten Calciumphosphat-Nanostäbchen (rechts).

Ergebnisse und Diskussion

Das in Abbildung 30 dargestellte lyophilisierte Material (links, A) zeigte einen ausgeprägten Lyokuchen, in dem die Nanostäbchen eingebettet vorlagen. Dies wurde in der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme verdeutlicht. Die in der Matrix eingebetteten Nanostäbchen lagen verklebt und fixiert im Lyokuchen vor. Die sich während der Lyophilisation ausbildende Zuckermatrix war bei 4 °C über längere Zeit formstabil und jederzeit redispergierbar. In Abbildung 30 (links, B) ist die nach der Wasseraufnahme regenerierte Trehalose-haltige Dispersion dargestellt. Es waren makroskopisch keine Agglomerate zu erkennen.

Zur weiteren Charakterisierung wurden thermogravimetrische Analysen ohne Trehalosezusatz durchgeführt. Hierzu wurden die abzentrifugierten und getrockneten Feststoffe in einen Korund-Tiegel überführt und unter Sauerstoffatmosphäre thermisch zersetzt. Hierbei handelte es sich um das mit Polyethylenimin-stabilisierte und zum Vergleich um das unfunktionalisierte Material (Abbildung 31).

Die in Abbildung 31 dargestellten Thermogramme zeigten im Temperaturbereich um 100 °C die thermische Desorption von Wasser. Hier zeigten die mit Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen einen mit 1,1 Gew.-% unwesentlich höheren Wasseranteil als die unfunktionalisierten Partikel (0,5 Gew.-%). Im Temperaturbereich von 150 bis 600 °C überlagerte sich in einer zweiten Stufe die thermische Desorption von Wasser mit dem Abbrand der stabilisierenden Polymerschicht.

Für das unfunktionalisierte Material lag der Wasserverlust in dieser Stufe bei 2,2 Gew.-%. Für die mit Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen lag der organische Anteil nach Abzug der gleichen Menge an Wasser bei 6,2 Gew.-%.

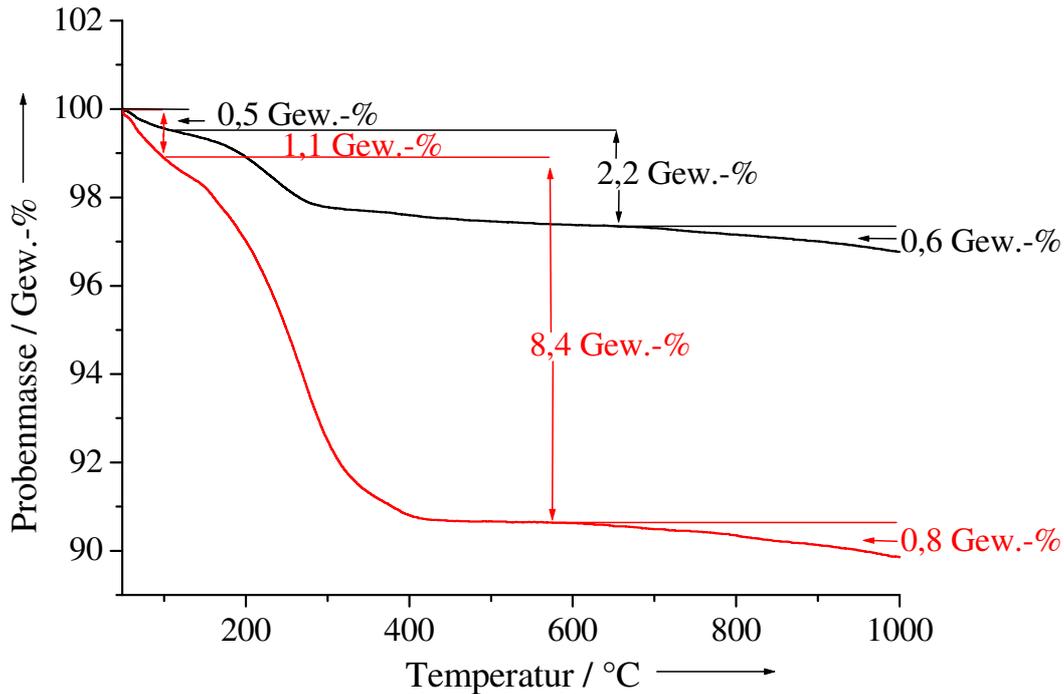


Abbildung 31: Thermogravimetrische Analyse der Polyethylenimin-beschichteten (rot) und der unfunktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen (schwarz) unter Sauerstoffatmosphäre (50 mL min^{-1}) und einer Heizrate von 1 K min^{-1} .

Ab einer Temperatur von 600 °C kam es zur thermischen Zersetzung des Carbonatanteils unter Ausbildung von Kohlendioxid. Für das unfunktionalisierte Material wurde ein Wert von $0,6 \text{ Gew.-%}$ erzielt. Der entsprechende Carbonatanteil lag damit bei $0,8 \text{ Gew.-%}$. Für die mit Polyethylenimin stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen lag der entsprechende Carbonatanteil mit $1,1 \text{ Gew.-%}$ etwas höher.

Die mittels Thermogravimetrie und Elementaranalyse bestimmte Zusammensetzung von Ostim[®] und des mit Polyethylenimin-stabilisierten Ostims[®] ist in Tabelle 9 aufgelistet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Zusammenfassung der mittels Elementaranalyse und Thermogravimetrie erhaltenen Daten für das unfunctionalisierte und das mit Polyethylenimin stabilisierte Ostim.

Komponente	Ostim	Ostim/PEI
Ca ²⁺ (AAS) / Gew.-%	37,08	39,94
PO ₄ ³⁻ (UV) / Gew.-%	55,9	50,5
C / Gew.-%	-	3,84
H / Gew.-%	0,55	1,36
N / Gew.-%	-	1,97
Mineralgehalt / Gew.-% (TG)	97,3	90,5
Molares Ca/P-Verhältnis	1,57	1,88
Organischer Anteil / Gew.-% (TG)	-	6,2
Carbonatgehalt / Gew.-% (TG)	0,8	1,1
Wassergehalt / Gew.-% (TG)	0,5+2,2	1,1+2,2

Durch den mittels Elementaranalyse bestimmten Stickstoffwert ließ sich der Anteil des adsorbierten Polyethylenimins berechnen. Aus Abbildung 26 wurde der Stickstoffanteil auf etwa 32,6 Gew.-% geschätzt. Mit der folgenden Beziehung (15) konnte so der adsorbierte Polyethylenimin-Anteil an den Partikeln bestimmt werden.

$$\frac{N_{\text{PEI, ad}}}{N_{\text{PEI, rein}}} \cdot 100 \text{ Gew.-%} = X_{\text{PEI, ad}} \quad (15)$$

$N_{\text{PEI, ad}}$: An den Partikeln adsorbierter Stickstoffanteil

$N_{\text{PEI, rein}}$: Stickstoffanteil des reinen Polyethylenimins = 32,6 Gew.-%

$X_{\text{PEI, ad}}$: Prozentual adsorbierter Polyethylenimin-Anteil an den Partikel

Setzt man den Wert für Stickstoff aus Tabelle 9 ein, so erhält man:

$$\frac{1,97}{32,56} \cdot 100 \text{ Gew.-%} = 6,05 \text{ Gew.-%}$$

Der aus dem Stickstoffanteil berechnete Polymergehalt deckte sich mit 6,1 Gew.-% sehr gut mit dem der thermogravimetrischen Analyse (6,2 Gew.-%). Somit konnte von einem adsorbierten Polyethylenimin-Anteil auf den Partikeln von etwa 6 Gew.-% ausgegangen werden.

Um die Kristallinität zu bestimmen, wurde der abzentrifugierte Feststoff der Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen mittels Röntgenpulverdiffraktometrie untersucht (Abbildung 32). Zum Vergleich sind das unfunktionalisierte Material und die Literaturreflexe für Hydroxylapatit dargestellt.

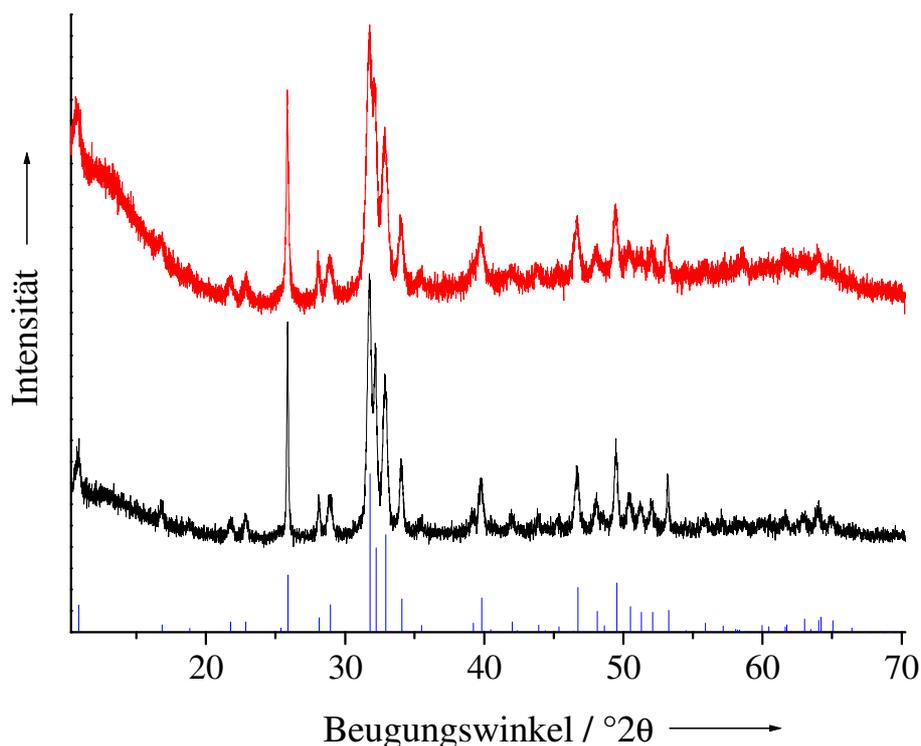


Abbildung 32: Röntgenpulverdiffraktogramme der Polyethylenimin-stabilisierten (rot) und der unfunktionierten Calciumphosphat-Nanostäbchen (schwarz). Zum Vergleich sind die Literaturreflexe für Hydroxylapatit aus der ICDD-Datenbank (84-1998) aufgeführt.

Die in Abbildung 32 dargestellten Diffraktogramme zeigen breite Reflexe, die auf ein nanokristallines Material schließen lassen. Die Lage und das Intensitätsverhältnis der erhaltenen Reflexe bestätigten eindeutig das Vorliegen von Hydroxylapatit.

Aufbauend auf einem Polyethylenimin-stabilisierten Trägermaterial konnten bereits unterschiedliche nanopartikuläre Materialien mit Nukleinsäuren beladen werden. So untersuchten Thomas *et al.* Polyethylenimin-stabilisierte Gold-Nanopartikel, die nachträglich mit DNA beladen wurden, als potentielle Träger für die Transfektion von Zellen.^[155] Hu *et al.* beschrieben die Abhängigkeit des Zetapotentials von Polyethylenimin-stabilisierten Gold-Nanopartikeln vom Belegungsgrad mit DNA.^[156] Arsianti *et al.* untersuchten die endozytotische Aufnahme von magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln, die mit Polyethylenimin stabilisiert und nachträglich mit DNA funktionalisiert wurden.^[157] He *et al.* nutzten ebenfalls Polyethylenimin-stabilisierte Silica-Nanopartikel als effizientes Trägermaterial für DNA zur Transfektion von Zellen.^[158] Damit ließ sich dieser Ansatz basierend auf einem Hydroxylapatit-Kern in diese Arbeiten sehr gut eingliedern und stellte eine Erweiterung der bisherigen Erkenntnisse dar. Der große Vorteil eines Calciumphosphat-Kerns liegt in der Biodegradierbarkeit dieses Materials, wodurch ein Einsatz für die Gen-Therapie vorteilhaft ist.

Um die Adsorptionskapazität der Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen zu bestimmen, wurden unterschiedliche Mengen einer Modell-DNA (< 50 bp, 1 g L^{-1}) zu 1 mL der Stammdispersion gegeben. Nach 30 min wurden der hydrodynamische Durchmesser und das Zetapotential mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmt.

Die Auftragung der kolloidalen Größenverteilungen sowie der Zetapotentiale in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an DNA ist in Abbildung 33 graphisch dargestellt.

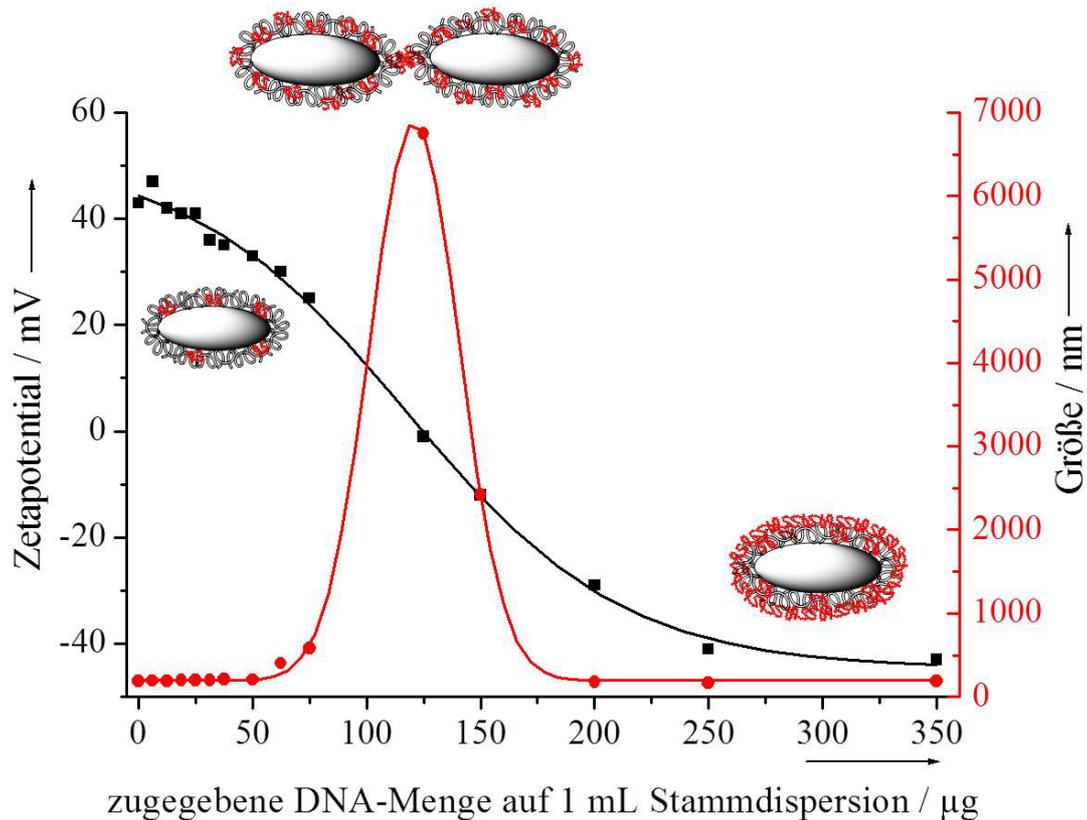


Abbildung 33: Kolloid-chemische Charakteristika der Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen nach erfolgter Zugabe unterschiedlicher Mengen an Modell-DNA. Der rote Kurvenverlauf repräsentiert den hydrodynamischen Radius, der schwarze Verlauf den Wechsel des Zetapotentials. Grau: Hydroxylapatit-Nanostäbchen; Schwarze Schleifen: Polyethylenimin; Rote Schleifen: Modell-DNA.

Die kolloid-chemische Charakterisierung in Abbildung 33 zeigt, dass bis zu einer DNA-Menge von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Stammdispersion keine Veränderung des hydrodynamischen Durchmessers zu beobachten war. Eine leichte Verminderung des stark positiven Zetapotentials war mit zunehmender DNA-Zugabe zu beobachten. Dieser Verlauf zeigte, dass die DNA vom kationischen Trägersystem komplexiert bzw. dotiert wurde. Das negativ geladene Rückgrat der DNA kompensierte anteilig mit steigendem DNA-Anteil die positive Ladung der Nanopartikel. In diesem Bereich (bis $50 \mu\text{g DNA}$) besaßen die

Partikel stets eine positive Ladung. Ab einer zugegebenen DNA-Menge von $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Stammdispersion kam es zur Agglomeration der Nanopartikel. Dieser Effekt ließ sich durch den Verlust der elektrostatischen Stabilisierung erklären. Das Zetapotential lag bei dieser Konzentration bei 0 mV. Es kam zur Brückenflockung und damit zum Verlust des kolloidalen Charakters der Dispersion.^[2, 5] Ab einer Menge von etwa $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Stammdispersion ließen sich erneut kolloidale Größenordnungen vergleichbar mit denjenigen der Ausgangsdispersion feststellen. Hier besaß das Zetapotential eine negative Ladung. Bei dieser Menge kam es zur erhöhten DNA-Adsorption auf der kationischen Oberfläche, was weiter zu einer vollständigen Umladung der Partikel durch DNA führte. Die erhaltenen Dispersionen waren kolloidal-stabil und ließen sich mit dem Konzept der *layer-by-layer*-Technik erklären.^[159-161] Die Triebkraft des Komplexierungsvorgangs von Polyethylenimin mit DNA oder anderen Polyelektrolyten ungleichnamiger Ladung resultiert neben der elektrostatischen Wechselwirkung aus einer Zunahme der Entropie im Gesamtsystem. So werden die auf der Polymeroberfläche adsorbierten Gegenionen durch die Adsorption eines voluminösen Polyelektrolyts verdrängt und in das Dispersionsmittel freigegeben. Die zusätzlich freie Beweglichkeit der Ionen im Dispersionsmittel führt so zu einer Entropiesteigerung im Gesamtsystem.^[162]

4.2.1.2 Transfektionsergebnisse an HeLa- und MG63-Zellen mit EGFP-kodierender DNA

Um die Transfektionseffizienzen der Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen in Abhängigkeit von der zugegebenen DNA-Menge zu bestimmen, wurde pcDNA3-EGFP als genetisch aktives Plasmid verwendet. Bei erfolgreicher Transfektion erfolgt die Expression des EGF-Proteins (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP), das fluoreszenzmikroskopisch erfasst werden kann. Die Transfektionseffizienz lässt sich aus dem Quotienten der Anzahl der grün-fluoreszierenden Zellen und der Gesamtanzahl der Zellen berechnen.^[7]

$$\frac{\text{Anzahl der fluoreszierenden Zellen nach der Transfektion}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \cdot 100 \%$$

(2)

Für die Transfektion wurden die Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen mit unterschiedlichen Mengen der EGFP-kodierenden DNA versetzt und auf die Zellen gegeben. In Abbildung 34 sind repräsentative Überlagerungen von durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zur Ermittlung der Transfektionseffizienz an HeLa-Zellen aufgeführt.

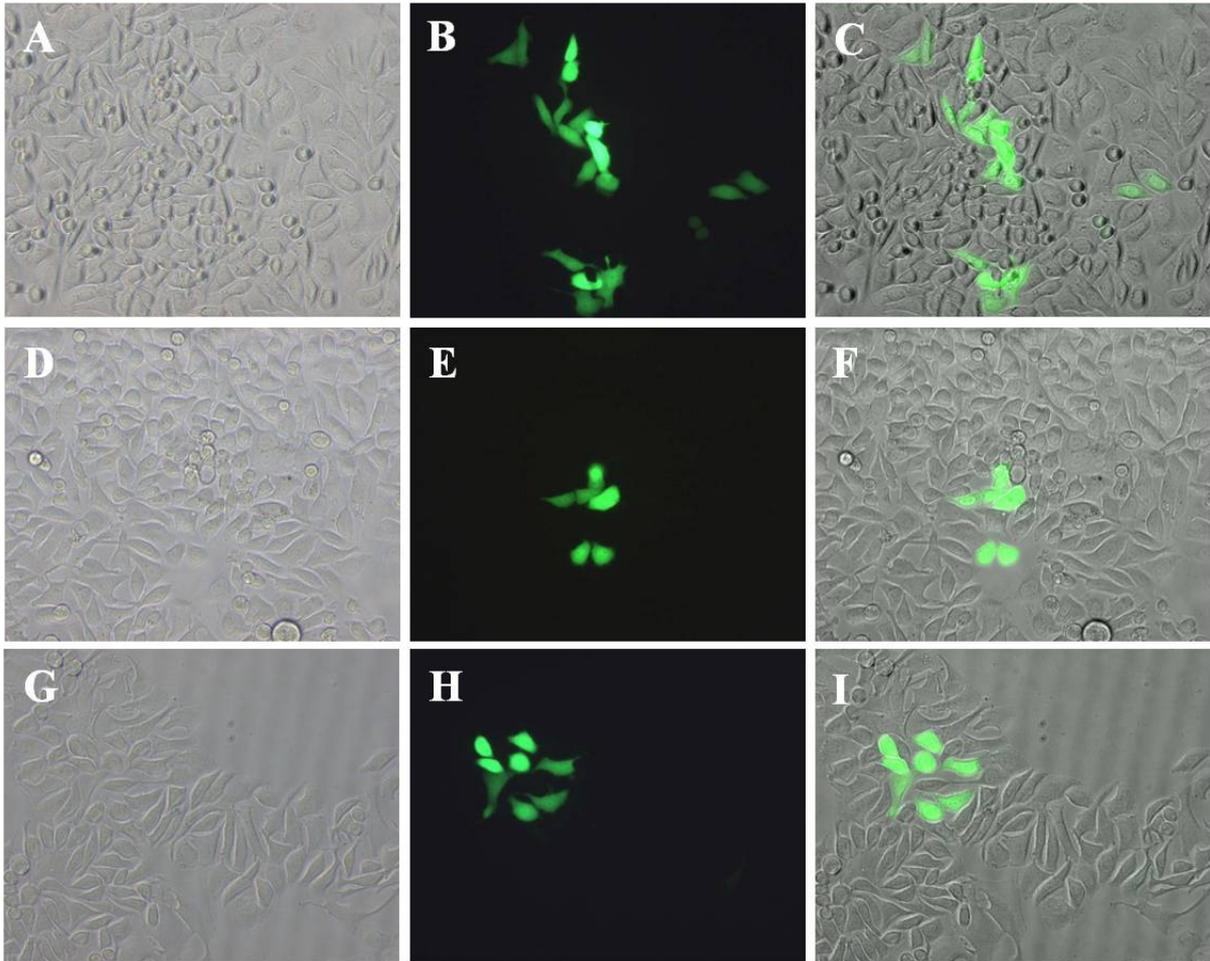


Abbildung 34: Durchlicht- (A, D, G) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B, E, H) von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit Polyethylenimin-stabilisierten und mit unterschiedlichen Mengen an EGFP-DNA beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen. Die Bilder C, F, I stellen Überlagerungen von durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dar. A, B und C stellen Aufnahmen aus dem kationischen Bereich dar; D, E und F repräsentieren den agglomerierten Bereich; G, H und I gehören zu den Transfektionseffizienzen im anionischen Bereich.

Ergebnisse und Diskussion

Aus Abbildung 34 lässt sich abschätzen, dass die Aufnahmen A, B und C bis zu einer zugegebenen Menge an DNA von 50 μg (kationischer Bereich) eine höhere Transfektionseffizienz als diejenige der D, E, F-Serie aus dem agglomerierten Bereich besaß. Eine leichte Steigerung ließ sich aus dem anionischen Bereich für die Bildserie G, H, I ablesen. Die Transfektionseffizienzen in Abhängigkeit der zugegebenen DNA-Menge sind in Abbildung 35 dargestellt.

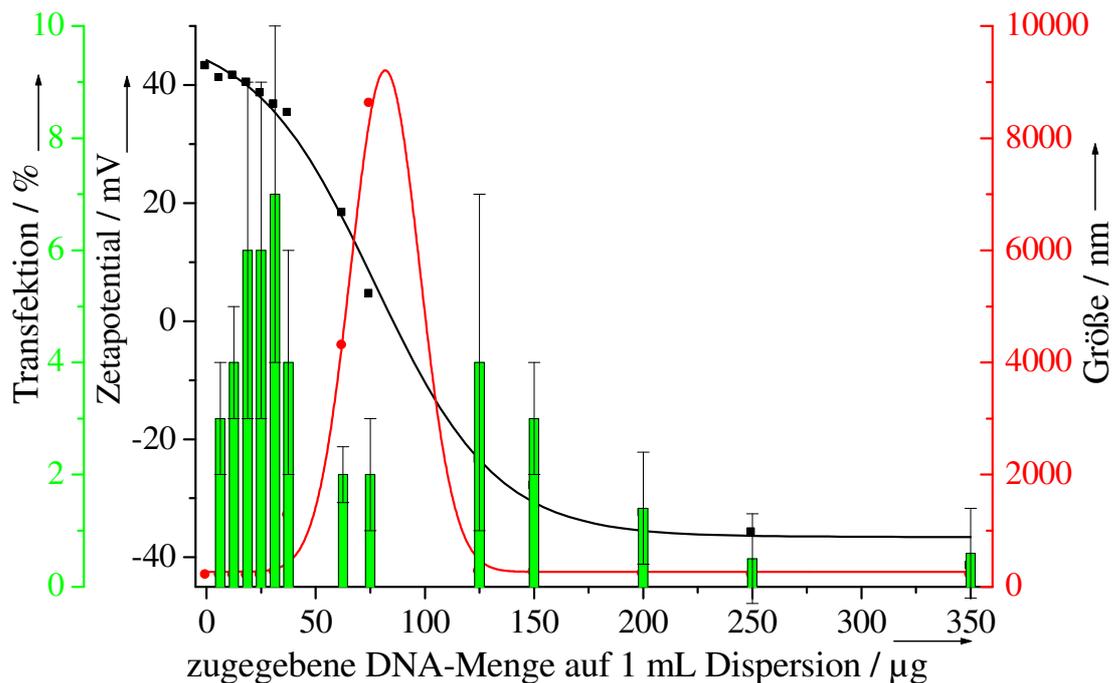


Abbildung 35: Transfektionseffizienzen der mit unterschiedlichen Mengen an EGFP-kodierender DNA beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen an HeLa-Zellen. Die vertikalen Balken (grün) repräsentieren die Transfektionseffizienz. Der rote Kurvenverlauf repräsentiert den hydrodynamischen Radius, der schwarze Verlauf den Wechsel des Zetapotentials.

Aus Abbildung 35 geht hervor, dass die Transfektionseffizienz im kationischen Bereich trotz der verhältnismäßig geringen DNA-Mengen mit Werten bis 8 % am stärksten war. Dieses Resultat ließ sich auf die Ladung der Partikel zurückführen. Durch die positive Ladung des Trägersystems kam es zu einer erhöhten Akkumulation auf der negativ geladenen Zellmembran und so zu einer erhöhten endozytotischen Aufnahme.

Thomas *et al.* untersuchten 2003 die Transfektionseffizienz von Polyethylenimin-stabilisierten und mit DNA beladenen Gold-Nanopartikeln an COS-7-Zellen. Die Transfektionseffizienz lag bei etwa 25 %.^[155] Im Jahr 2009 konnten Xia *et al.* mit einem ähnlichen Konzept Transfektionseffizienzen von bis zu 70 % erreichen. Als Basis dienten hierfür Silica-Nanopartikel, die mit Polyethylenimin stabilisiert und nachträglich mit DNA beladen wurden.^[163]

Für das in dieser Arbeit vorgestellte System fiel die Transfektionseffizienz im agglomerierten Bereich auf 2 %. Hier waren die Partikel zu groß, um von den Zellen effizient aufgenommen zu werden. Die Transfektionseffizienzen lagen im anionischen Bereich zwischen 1 % und 4 % und waren daher mit den einschaligen CaP/DNA-Nanopartikeln nach Sokolova *et al.* vergleichbar.^[69, 122] Aufgrund der negativen Ladung kam es nicht zu einer effizienten endozytotischen Aufnahme der Partikel.

Die Transfektionseffizienz des in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Materials nach erfolgter Beladung mit EGFP-kodierender DNA ist in Abbildung 36 dargestellt. Die Transfektionseffizienz des zuvor in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Materials fiel nach der Beladung mit EGFP-kodierender DNA wesentlich geringer aus (1 % bis 4 %). Dieser Effekt konnte nur durch die Anwesenheit von Trehalose erklärt werden. Möglicherweise inhibierte die Anwesenheit von Trehalose die Komplexierung der DNA innerhalb der Polymerschleifen des Polyethylenimins. Der daraus verringerte adsorbierte DNA-Anteil auf der Oberfläche der Polyethylenimin-stabilisierten

Calciumphosphat-Nanostäbchen führte zu einem signifikanten Verlust der Transfektionseffizienz.

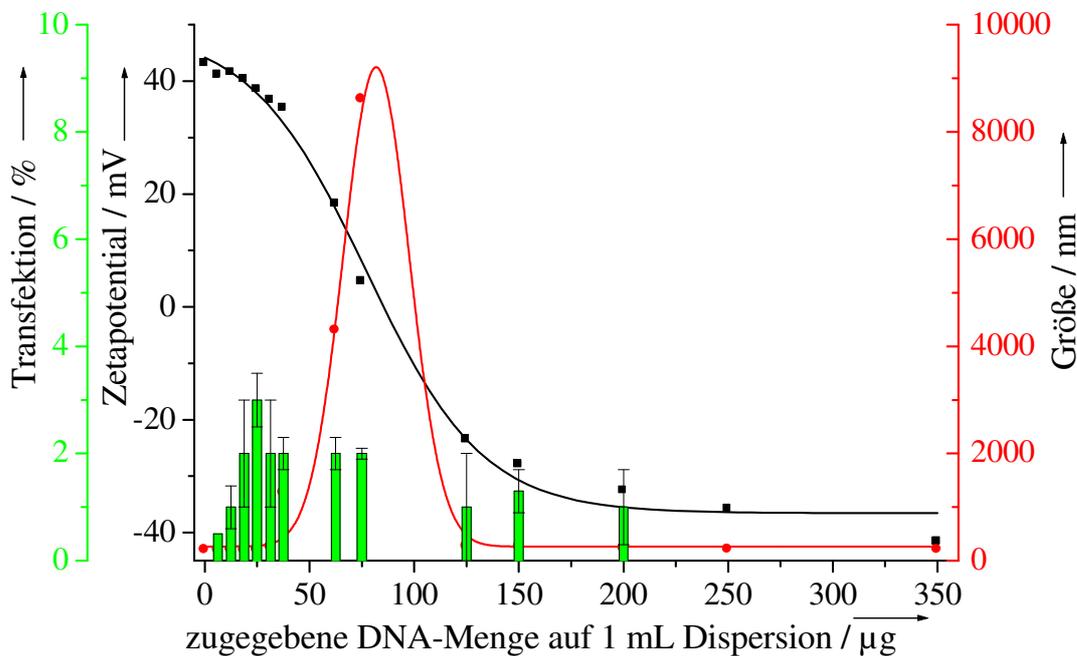


Abbildung 36: Transfektionseffizienzen der mit unterschiedlichen Mengen an EGFP-kodierender DNA beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen an HeLa-Zellen nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose und Redispersion in Reinstwasser. Die vertikalen Balken (grün) repräsentieren die Transfektionseffizienzen. Der rote Kurvenverlauf repräsentiert den hydrodynamischen Radius, der schwarze Verlauf den Wechsel des Zetapotentials.

In allen Untersuchungen wurde Lipofectamin als Kontrolle eingesetzt. Die Transfektionsrate lag für HeLa-Zellen bei etwa 60 %. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der MTT-Test herangezogen (Abbildung 37). Die Zellvitalität nach erfolgter Transfektion mittels Lipofectamin war sehr gering und lag bei lediglich 30 %. Für das hier eingesetzte Trägersystem basierend auf Polyethylenimin-stabilisierten und EGFP-DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen lag die Zellvitalität nach erfolgter Transfektion unabhängig vom

Ergebnisse und Diskussion

Trehalose-Zusatz und der DNA-Beladung zwischen 80 % und 100 %. Damit war das hier eingesetzte Trägersystem als nicht toxisch einzustufen.

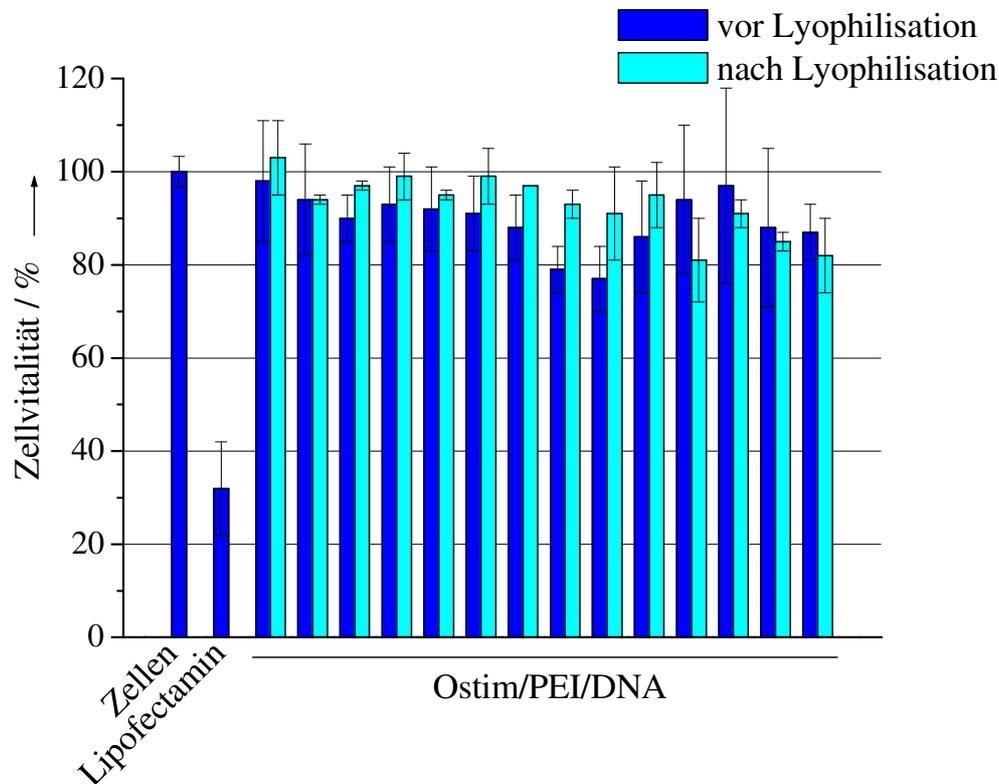


Abbildung 37: Mittels MTT-Test ermittelte Vitalitätswerte der mit unterschiedlichen Mengen an DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen nach der Transfektion vor (dunkelblau) und nach (hellblau) der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose an HeLa-Zellen. Als Kontrolle sind die Vitalitätswerte der unbehandelten Zellen sowie die mit Lipofectamin behandelten Zellen aufgeführt.

Weiterhin wurden die Partikelsysteme auf ihre Transfektionseffizienz an einer Osteoblasten-ähnlichen-Zelllinie (MG63) getestet. Eine detaillierte Auflistung der Transfektionseffizienzen in Abhängigkeit von der zugegebenen DNA-Menge ist in Abbildung 38 dargestellt.

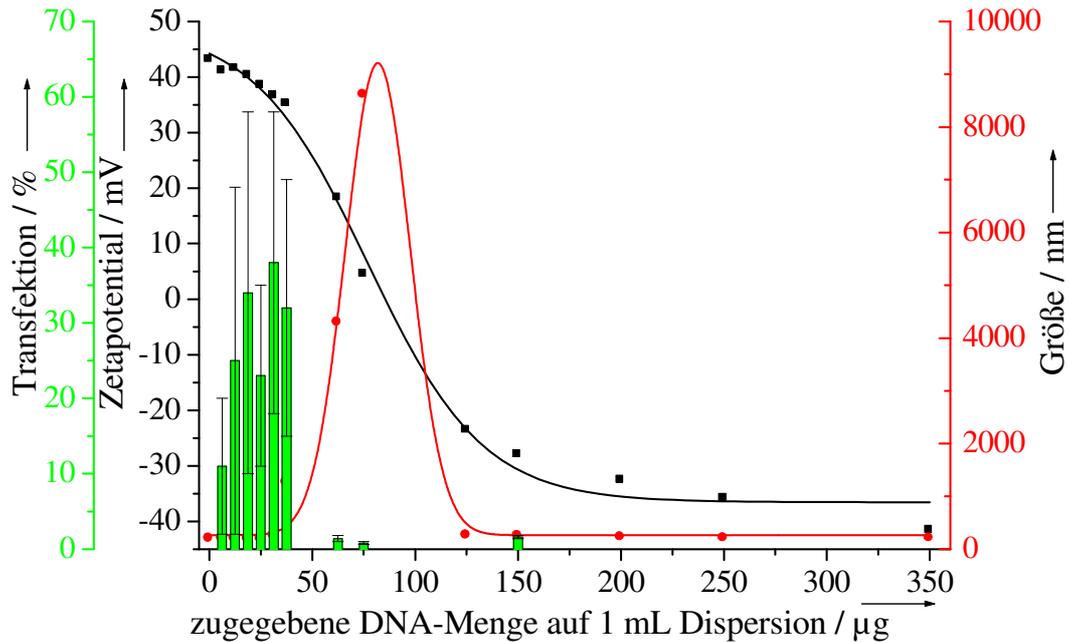


Abbildung 38: Transfektionseffizienzen der mit unterschiedlichen Mengen an EGFP-kodierender DNA beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen an MG63-Zellen. Die vertikalen Balken (grün) repräsentieren die Transfektionseffizienz. Der rote Kurvenverlauf repräsentiert den hydrodynamischen Radius, der schwarze Verlauf den Wechsel des Zetapotentials.

Bei MG63-Zellen ist die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Ladung der Partikel ausgeprägter. Hier waren lediglich die kationischen Träger in der Lage die Zellen signifikant zu transfizieren. Die Transfektionseffizienzen lagen mit Werten von 30 % bis 40 % wesentlich höher als bei HeLa-Zellen. Die Empfindlichkeit unterschiedlicher Zelltypen gegenüber der Transfektion und Gen-Stummschaltung ist in der Literatur beschrieben.^[164-166] Im kationischen Bereich (zugegebene DNA-Menge bis 50 μg) waren die Transfektionseffizienzen der hier vorgestellten Partikel mit denjenigen von Thomas *et al.* basierend auf Gold-Nanopartikeln vergleichbar.^[155] Die Transfektionseffizienz für das zuvor in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte

und nachträglich mit EGFP-DNA beladene Material ist in Abbildung 39 dargestellt.

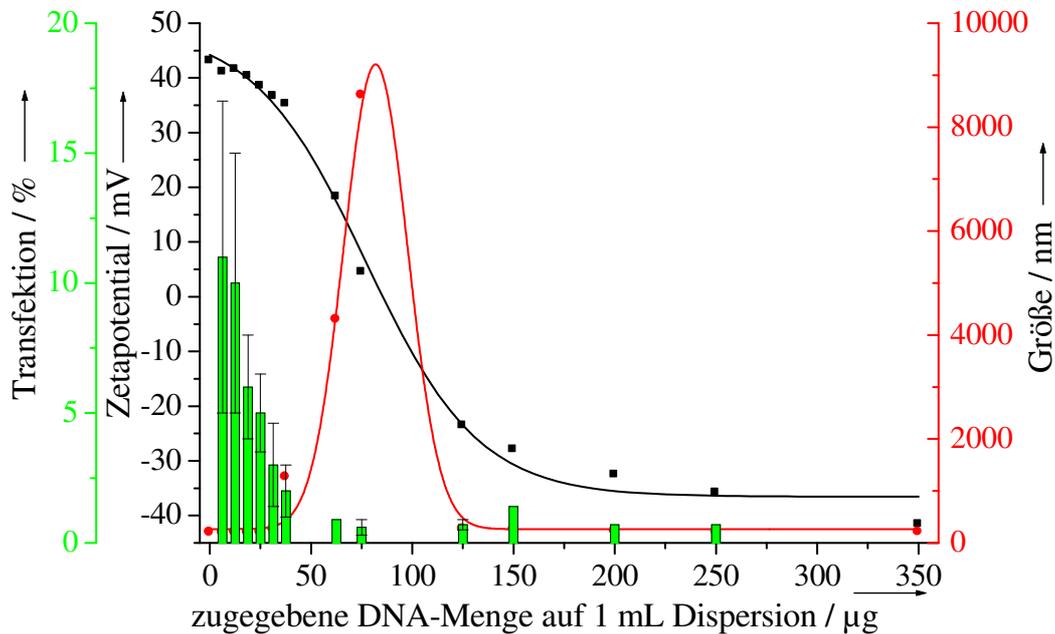


Abbildung 39: Transfektionseffizienzen der mit unterschiedlichen Mengen an EGFP-kodierender DNA beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen an MG63-Zellen nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose. Die vertikalen Balken (grün) repräsentieren die Transfektionseffizienz. Der rote Kurvenverlauf repräsentiert den hydrodynamischen Radius, der schwarze Verlauf den Wechsel des Zetapotentials.

Die Transfektionseffizienzen fielen auch hier im Vergleich zur Trehalose-freien Dispersion geringer aus (2 % bis 10 %). Dieser Effekt wurde bereits für die HeLa-Zellen diskutiert. Die Affinität der DNA zur kationischen Oberfläche der Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen schien durch die Anwesenheit von Trehalose inhibiert zu werden. Die Kontrolle mit Lipofectamin lieferte in allen Fällen eine Transfektionseffizienz von etwa 31 %. Eine Zusammenstellung der mittels MTT-Test bestimmten Zellvitalitäten von MG63-Zellen nach erfolgter Transfektion ist für alle Systeme in Abbildung 40 dargestellt.

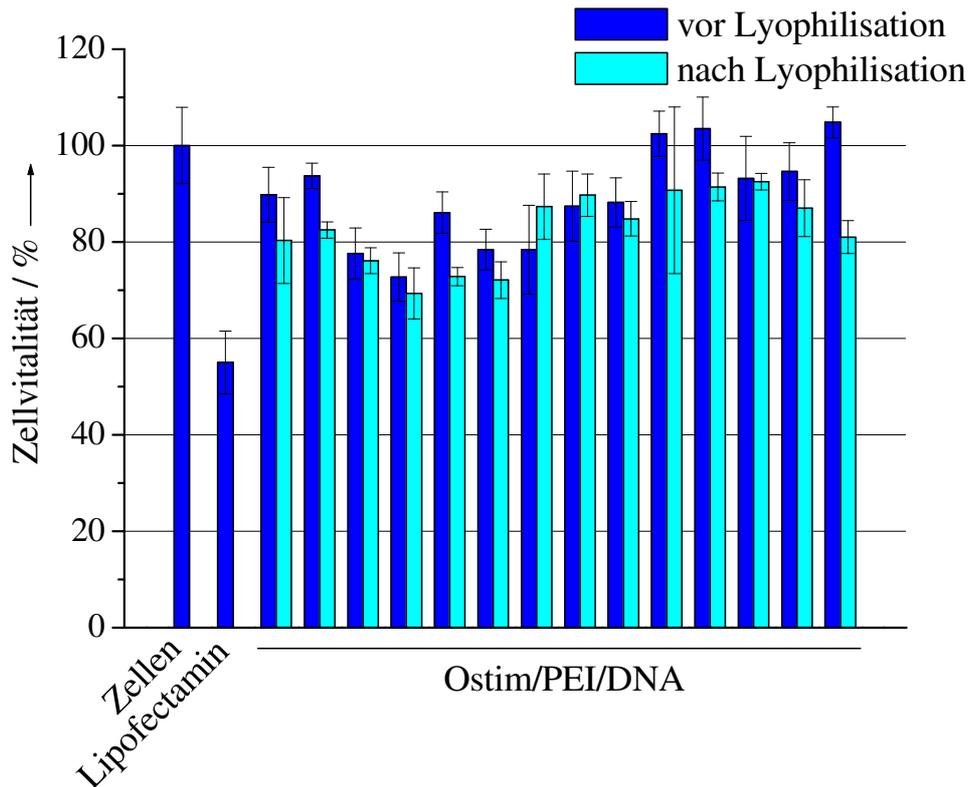


Abbildung 40: Mittels MTT-Test ermittelte Vitalitätswerte der mit unterschiedlichen Mengen an DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen nach der Transfektion vor (dunkelblau) und nach (hellblau) der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose an MG63-Zellen. Als Kontrolle sind die Vitalitätswerte der unbehandelten sowie der mit Lipofectamin behandelten Zellen aufgeführt.

Die Zellvitalität nach der Transfektion mit Lipofectamin war gering und lag bei etwa 55 %. Für das hier eingesetzte Trägersystem, basierend auf Polyethylenimin-stabilisierten und mit EGFP-DNA beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen, wurde eine Zellvitalität nach der Transfektion unabhängig vom Trehalose-Zusatz und der DNA-Beladung von 80 % bis 100 % erzielt. Damit war das hier beschriebene Trägersystem als nicht toxisch einzustufen.

4.2.1.3 Gen-Stummschaltung an HeLa-EGFP-Zellen mit siRNA (anti-EGFP)

Zur Bestimmung der Gen-Stummschaltungseffizienz wurden die Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen nachträglich mit siRNA (anti-EGFP) beladen und an HeLa-Zellen, die EGFP kontinuierlich exprimieren, getestet (HeLa-EGFP). In Abbildung 41 ist eine repräsentative Zusammenstellung von durchlicht- (A, D, G) und fluoreszenzmikroskopischen (B, E, H) Aufnahmen zur Ermittlung der Gen-Stummschaltungseffizienz an HeLa-EGFP-Zellen aufgeführt. Zur Verdeutlichung ist zusätzlich die Überlagerung beider Aufnahmen dargestellt (C, F, I). Aus Abbildung 41 lässt sich abschätzen, dass die Bildserie A, B und C aus dem kationischen Bereich eine höhere Gen-Stummschaltungseffizienz als diejenige der D, E, F-Serie aus dem agglomerierten Bereich besaß. Ein geringfügig besseres Resultat zeigte der anionische Bereich für die Bildserie G, H, I.

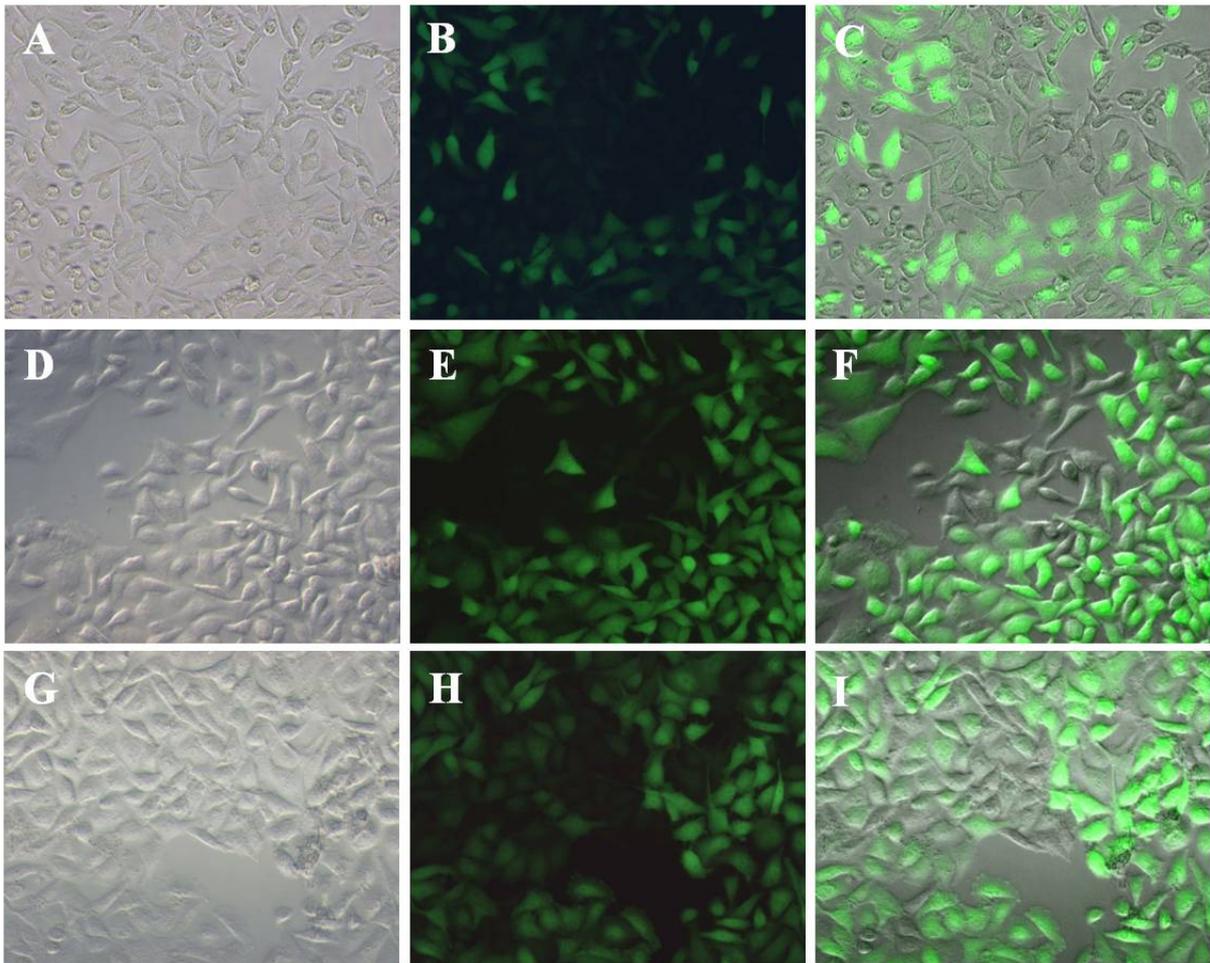


Abbildung 41: Durchlicht- (A, D, G) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B, E, H) der mit Polyethylenimin stabilisierten und mit unterschiedlichen Mengen an siRNA (anti-EGFP) beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen nach der Gen-Stummschaltung an HeLa-EGFP-Zellen. Die Bilder C, F, I stellen Überlagerungen von durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dar. A, B und C stellen Aufnahmen aus dem kationischen Bereich dar; D, E und F repräsentieren den agglomerierten Bereich; G, H und I gehören zu den Gen-Stummschaltungseffizienzen im anionischen Bereich.

Eine detaillierte Auflistung der Gen-Stummschaltungseffizienz in Abhängigkeit von der zugegebenen siRNA-Menge ist in Abbildung 42 dargestellt.

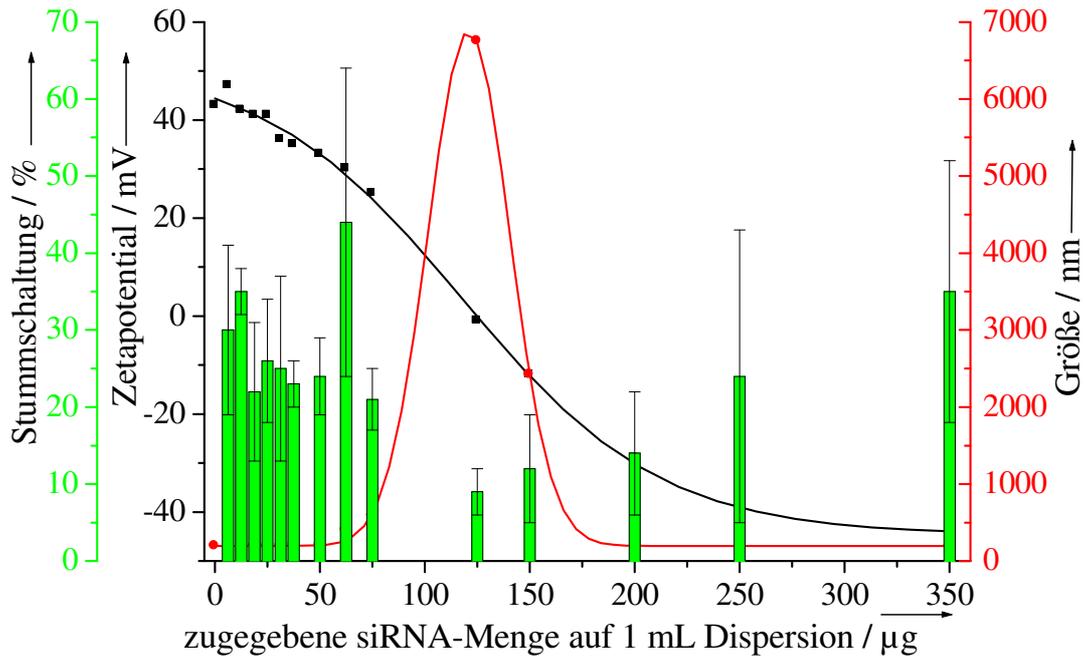


Abbildung 42: Gen-Stummschaltungseffizienzen der mit unterschiedlichen Mengen an siRNA (anti-EGFP) beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen an HeLa-EGFP-Zellen. Die vertikalen Balken (grün) repräsentieren die Gen-Stummschaltungseffizienz. Der rote Kurvenverlauf repräsentiert den hydrodynamischen Radius, der schwarze Verlauf den Wechsel des Zetapotentials.

Die Gen-Stummschaltungseffizienzen lagen im kationischen Bereich bei 30 % bis 40 % und waren daher mit den dreischaligen CaP/siRNA-Nanopartikeln von Sokolova *et al.* vergleichbar.^[125] Die im Vergleich zur Transfektion mit DNA gesteigerte Gen-Stummschaltungseffizienz mit siRNA ließ sich damit erklären, dass die siRNA lediglich in das Zytoplasma eintreten musste um ihre Aktivität zu entfalten, während die DNA auf dem Weg zum Zellkern durch Nukleasen abgebaut werden konnte. Song *et al.* nutzten 2010 Polyethylenimin-stabilisierte Gold-Nanopartikel, um siRNA zu komplexieren. In ihren Gen-Stummschaltungsexperimenten konnte die Expression des Zielproteins um 60 % reduziert werden.^[167] Die dort eingesetzten Gold-Nanopartikel hatten

Ergebnisse und Diskussion

durchschnittliche Größen von 15 nm und waren demnach deutlich kleiner als die hier eingesetzten Calciumphosphat-Nanostäbchen. Für das in dieser Arbeit vorgestellte Trägermaterial lag die Gen-Stummschaltungseffizienz im agglomerierten Bereich um 10 %. Hier lagen die Partikel aufgrund fehlender elektrostatischer Abstoßung koaguliert vor. Die agglomerierten Partikel waren zu groß, um von den Zellen effektiv endozytiert zu werden. Im anionischen Bereich war durch die Gewährleistung des kolloidalen Charakters der Partikel ein leichter Gewinn der Gen-Stummschaltungseffizienz zu beobachten. Trotz des anionischen Charakters wurde eine Effizienz zwischen 20 % und 30 % erreicht. Die Gen-Stummschaltungseffizienz für das zuvor in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte und anschließend mit siRNA (anti-EGFP) beladene Material ist in Abbildung 43 dargestellt.

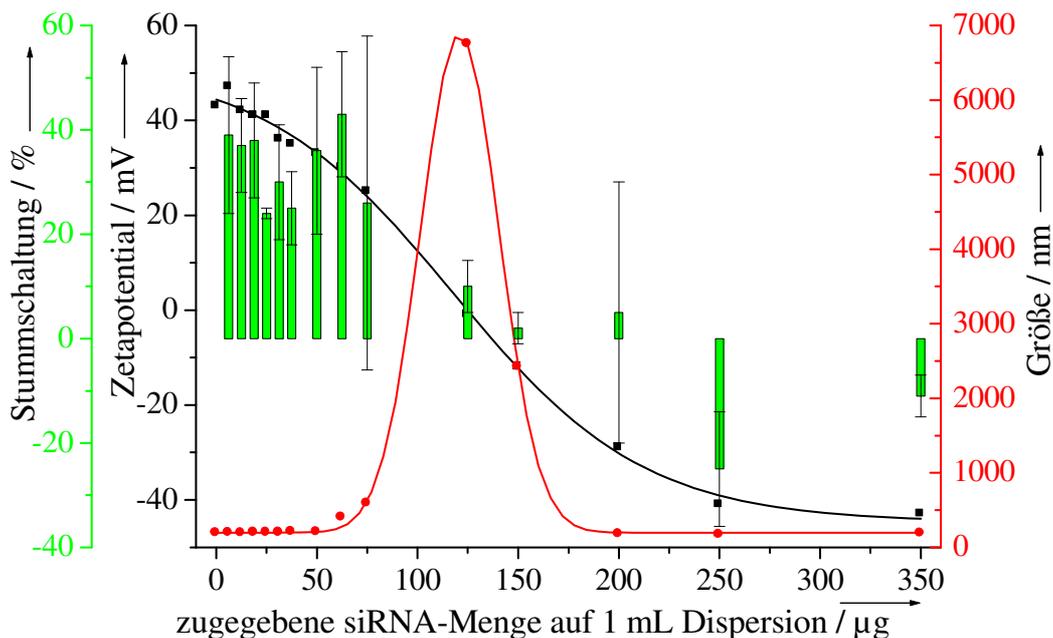


Abbildung 43: Gen-Stummschaltungseffizienzen der mit unterschiedlichen Mengen an siRNA (anti-EGFP) beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen an HeLa-EGFP-Zellen nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose. Die vertikalen Balken (grün) repräsentieren die Gen-Stummschaltungseffizienz. Der rote Kurvenverlauf repräsentiert den hydrodynamischen Radius, der schwarze Verlauf den Wechsel des Zetapotentials.

Ergebnisse und Diskussion

Die durchschnittliche Gen-Stummschaltungseffizienz lag im kationischen Bereich zwischen 30 % und 40 % und war damit zur Trehalose-freien Dispersion unverändert. Für höhere siRNA-Mengen konnte ein signifikanter Verlust der Gen-Stummschaltungseffizienz beobachtet werden. Die Kontrolle mit Lipofectamin lieferte in allen Fällen eine Gen-Stummschaltungseffizienz von etwa 90 %.

Die Zusammenstellung der mittels MTT-Test bestimmten Zellvitalitäten nach erfolgter Gen-Stummschaltung ist für alle Systeme in Abbildung 44 dargestellt.

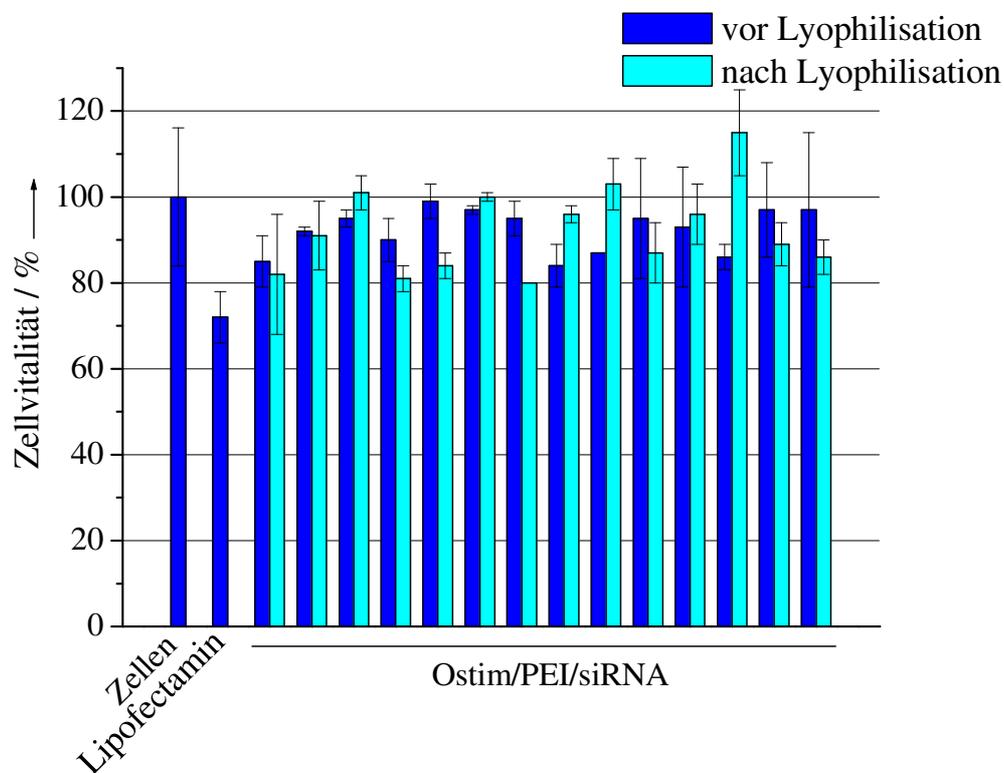


Abbildung 44: Mittels MTT-Test bestimmte Vitalitätswerte der mit unterschiedlichen Mengen an siRNA-beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen nach der Transfektion vor (dunkelblau) und nach (hellblau) der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose an HeLa-EGFP-Zellen. Als Kontrolle sind die Vitalitätswerte der unbehandelten sowie der mit Lipofectamin behandelten Zellen aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Zellvitalität nach der Transfektion mit Lipofectamin lag bei etwa 70 %. Für das hier eingesetzte Trägersystem, basierend auf Polyethylenimin-stabilisierten und mit siRNA (anti-EGFP) beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen, wurde eine Zellvitalität nach erfolgter Transfektion unabhängig vom Trehalose-Zusatz und der siRNA-Beladung von 80 % bis 100 % erzielt. Damit war das hier eingesetzte Trägersystem als nicht zytotoxisch einzustufen.

4.2.1.4 Umladung der Nukleinsäure-beladenen Nanostäbchen mit Polyethylenimin

Um die endozytische Aufnahme weiter zu steigern, wurden die kationischen Partikel mit EGFP-kodierender DNA oder siRNA (anti-EGFP) umgeladen und nachträglich mit einer zusätzlichen Schicht aus Polyethylenimin nach dem *layer-by-layer*-Verfahren ausgestattet.^[159-161] Die Größenverteilung der Dispersion wurde in allen Fällen mittels Dynamischer Lichtstreuung erfasst (Abbildung 45).

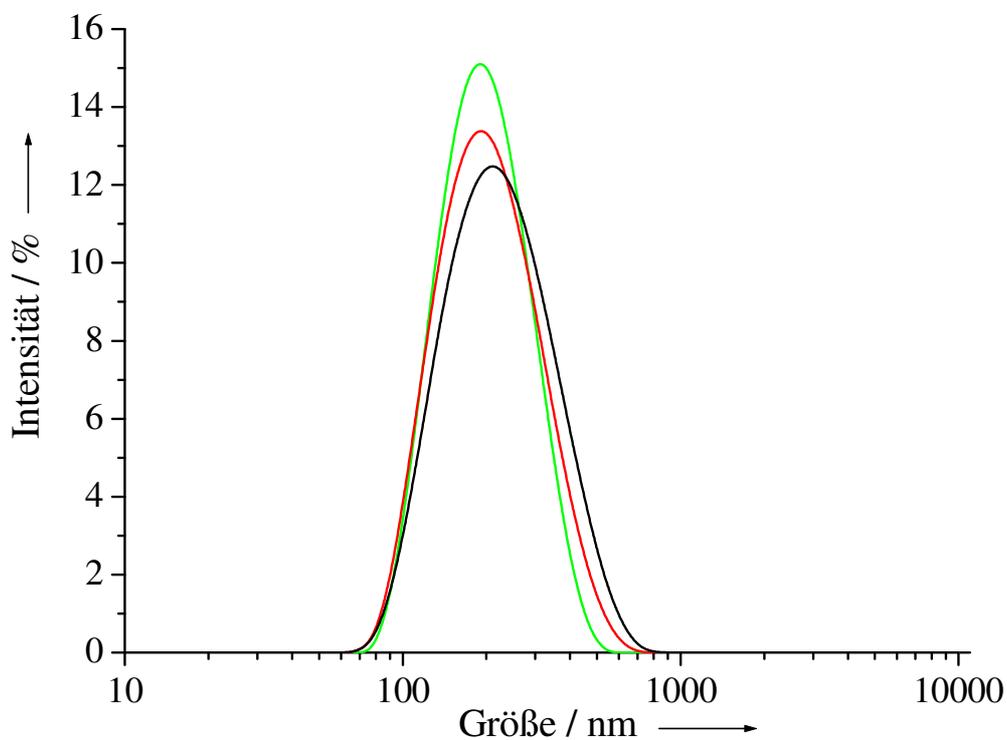


Abbildung 45: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilungen der Polyethylenimin-stabilisierten (grün), mit DNA beladenen (rot) und erneut mit Polyethylenimin umgeladenen (schwarz) Calciumphosphat-Nanostäbchen.

Die in Abbildung 45 dargestellten Größenverteilungen zeigen einen monodispersen Charakter ohne Agglomerate. Die hydrodynamischen Durchmesser lagen zwischen 190 nm und 200 nm. Die dazugehörigen

Polydispersitätsindizes bestätigten mit Werten zwischen 0,14 und 0,16 das Vorliegen von monodispersen Systemen. Die Anwesenheit der aufgetragenen Schichten wurde durch das Zetapotential nachgewiesen (Abbildung 46).^[168]

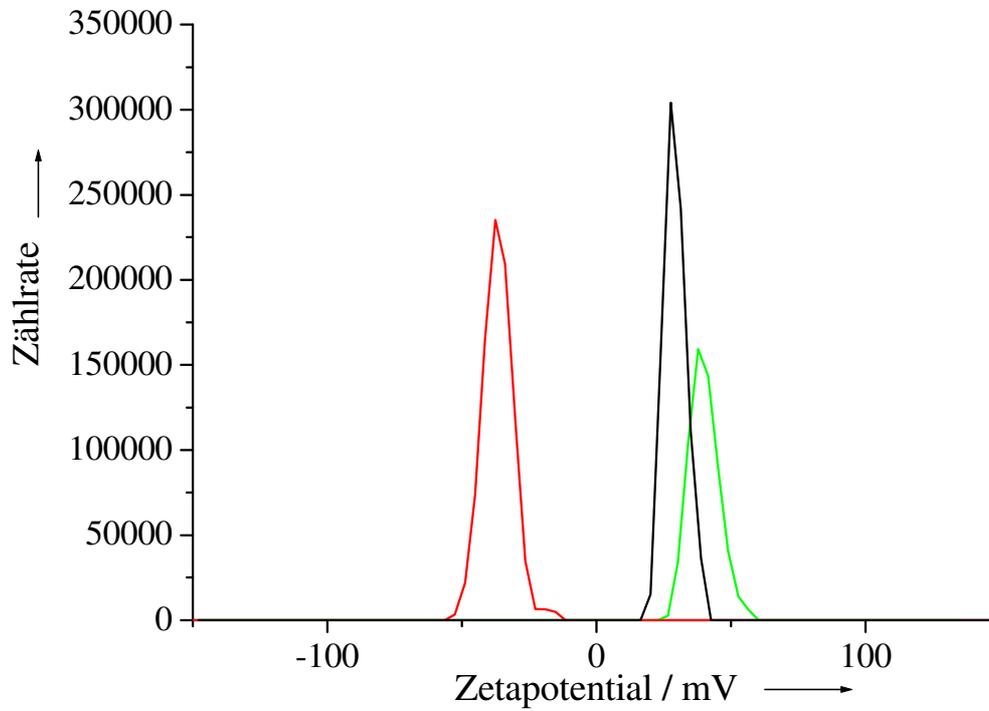


Abbildung 46: Zetapotentiale der Polyethylenimin-stabilisierten (grün), mit DNA beladenen (rot) und erneut mit Polyethylenimin umgeladenen (schwarz) Calciumphosphat-Nanostäbchen in wässriger Dispersion.

Das Zetapotential der Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen lag nach der Aufreinigung bei +40 mV (grün). Nach der Umladung mit DNA betrug das Zetapotential -36 mV (rot). Die erneute Umladung mit Polyethylenimin führte zu einem finalen Zetapotential von +29 mV (schwarz).

Die so erhaltenen kationischen Trägersysteme lieferten hervorragende Effizienzen von etwa 50 % für die EGFP-Transfektion an HeLa-Zellen und etwa 60 % für die Gen-Stummschaltungseffizienz mit siRNA (anti EGFP) an HeLa-EGFP-Zellen (Abbildung 47).

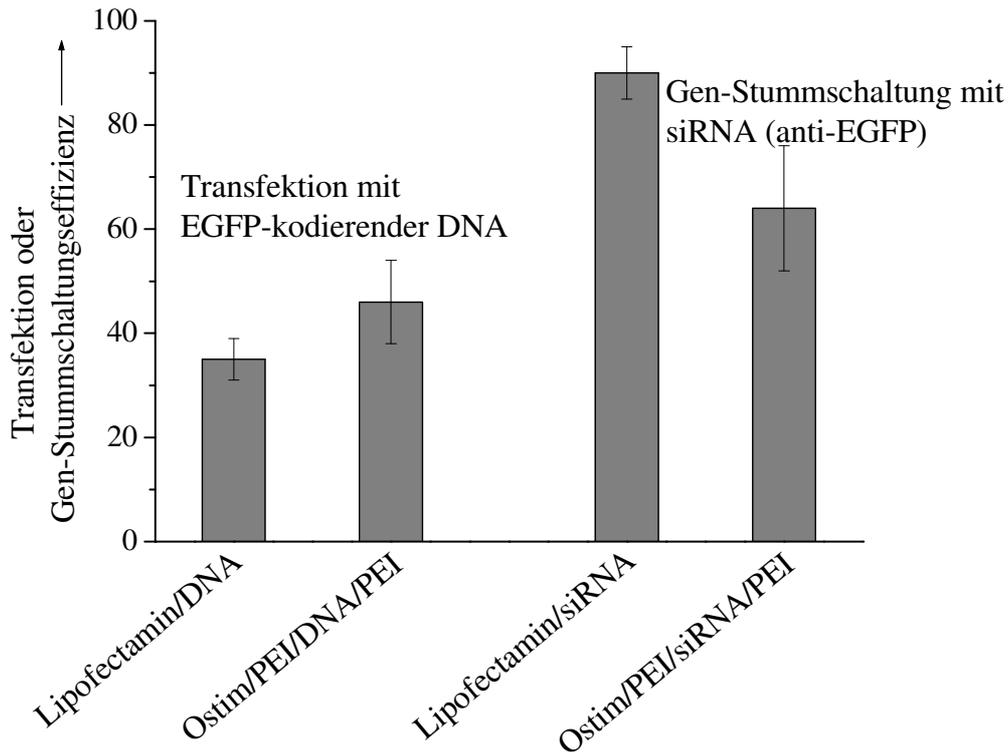


Abbildung 47: Transfektionseffizienzen (HeLa-Zellen) und Gen-Stummschaltungseffizienzen (HeLa-EGFP-Zellen) der kationischen Ostim/PEI/DNA/PEI und Ostim/PEI/siRNA/PEI-Nanostäbchen. Als Vergleich sind die Transfektionsresultate mit Lipofectamin dargestellt.

Die Resultate zeigen deutlich, wie stark die endozytotische Aufnahme von der Ladung des Trägersystems abhängt. Mit einem aus dem anionischen Bereich vergleichbaren DNA- bzw. siRNA-Anteil konnte keine vergleichbare Wirkung ohne Umladung mit Polyethylenimin erzielt werden. Diese Beobachtung ließ sich mit dem *proton-sponge*-Effekt und dem dadurch erhaltenen Schutz vor dem lysosomalen Abbau der Nukleinsäuren erklären. Zur Verdeutlichung sind die durchlicht- und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit EGFP-DNA transfizierten HeLa-Zellen (A, B) und der Gen-Stummschaltungsversuche mit siRNA (anti-EGFP) an HeLa-EGFP-Zellen (C, D) für die mehrschaligen Partikelsysteme aufgeführt (Abbildung 48).

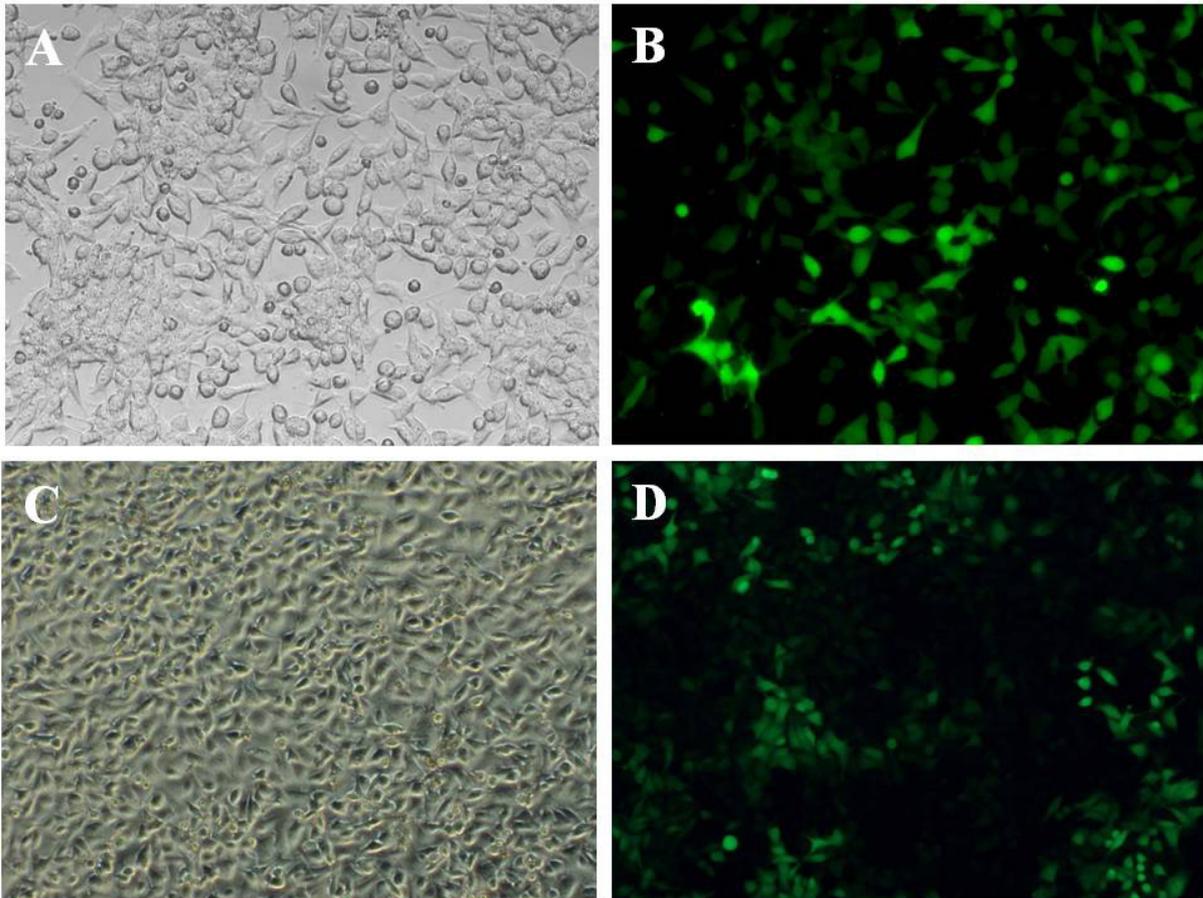


Abbildung 48: Durchlichtmikroskopische- (A, C) und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (B, D) der mehrschaligen Calciumphosphat-Nanostäbchen nach der Transfektion von HeLa-Zellen (oben) und nach der Genstummschaltung von HeLa-EGFP-Zellen (unten).

In allen Fällen konnte für das mehrschalige kationische Trägersystem eine Zellvitalität von 80 % bis 90 % beobachtet werden. Der zusätzliche Anteil an Polyethylenimin wirkte sich demnach nicht negativ auf die Zellvitalität der transfizierten Zellen aus. Ein vergleichbares Konzept wurde 2009 von Elbakry *et al.* entwickelt.^[169] Dort wurden Gold-Nanopartikel mit Polyethylenimin beschichtet. Auf der kationischen Oberfläche konnte siRNA durch eine elektrostatische Wechselwirkung komplexiert werden. Durch die erneute Auftragung von Polyethylenimin wurde die siRNA zwischen zwei Polymerschichten nach der *layer-by-layer* Technik eingebettet.^[169] Die

erhaltenen Gen-Stummschaltungseffizienzen lagen in Abhängigkeit von der eingesetzten siRNA-Menge bei 20 % bis 70 %. Die Zellvitalität lag nach erfolgter Transfektion unverändert bei 100 %. Die mehrschaligen CaP/siRNA-Nanopartikel von Sokolova *et al.* lieferten Gen-Stummschaltungseffizienzen von etwa 50 %. Trotz der negativen Ladung konnte die siRNA effizient durch die Zellmembran ins Zytoplasma geschleust werden. Die von Sokolova *et al.* eingesetzte siRNA-Menge betrug für die Zellexperimente $7,6 \mu\text{g well}^{-1}$.^[125] Damit ist die in dieser Arbeit eingesetzte siRNA-Menge geringer ($5,6 \mu\text{g well}^{-1}$) und das kationische Trägersystem demnach effizienter. Die bessere Gen-Stummschaltungseffizienz kann daher nur mit dem kationischen Charakter des hier eingesetzten Trägersystems erklärt werden.

2010 stellten Sokolova *et al.* ein Transfektionssystem basierend auf DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln vor. Zum Schutz des enzymatischen Abbaus der Nukleinsäuren wurde die eingesetzte DNA von einer weiteren Schicht aus Calciumphosphat geschützt. Zur Erhaltung der kolloidalen Stabilität wurde Polyethylenimin als elektrosterisch stabilisierendes Polymer eingesetzt. Die erhaltenen Transfektionseffizienzen lagen bei etwa 50 % und sind daher mit dem hier vorgestellten System vergleichbar. Die DNA-Menge für die Zellversuche von Sokolova *et al.* lag bei $1,2 \mu\text{g well}^{-1}$ und war damit geringer als die in dieser Arbeit eingesetzte DNA-Menge ($5,4 \mu\text{g well}^{-1}$). Damit war das System von Sokolova *et al.* bezogen auf die Transfektionseffizienz besser.

Ein wesentlicher Nachteil bei dem von Sokolova *et al.* entwickelten System lag in der niedrigen Zellvitalität (43 %) nach der Transfektion.^[152] Die zugehörige PEI-Menge lag in der Studie von Sokolova *et al.* bei $12 \mu\text{g well}^{-1}$ und war damit dreimal höher als die in dieser Arbeit vorgestellte PEI-Menge ($4 \mu\text{g well}^{-1}$).^[152] Eine geringe PEI-Menge und die damit verbesserte Zellvitalität machte das hier vorgestellte Trägersystem für eine Anwendung in der Gen-Therapie vorteilhafter. Neben der verstärkten endozytotischen Aufnahme des kationischen

Trägersystems durch die Zellen könnte die zusätzliche Bildung von PEI/siRNA- bzw. PEI/DNA-Polyplexen durch überschüssiges Polymer (PEI und siRNA bzw. DNA) für die hohe Gen-Stummschaltung bzw. Transfektion verantwortlich sein.

4.2.2 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieses Kapitels wurde die kontinuierliche Fällung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit unterschiedlichen DNA-Mengen beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln beschrieben. Hierzu wurde eine Calcium-Lösung mit einer Phosphat-Lösung in einem Schlauchreaktor zusammengeführt, um die Calciumphosphat-Keimbildung zu kontrollieren. Nachträglich erfolgte die Stabilisierung und Funktionalisierung mit dem Biopolymer Carboxymethylcellulose (90000 Da) und einer Modell-DNA (< 50 bp) in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen.

Die erhaltenen Dispersionen wurden kolloid-chemisch mittels Dynamischer Lichtstreuung charakterisiert. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine kugelförmige Morphologie der Nanopartikel mit Durchmessern von 50 nm bis 80 nm. Die Zusammensetzung der Partikel wurde mittels Thermogravimetrie und Elementaranalyse bestimmt. Die DNA-Beladung konnte durch den mittels Elementaranalyse angegebenen Stickstoffgehalt quantifiziert werden.

Weiter konnte die Langzeitstabilität der erhaltenen Dispersionen mittels Lyophilisation in Gegenwart von Kryoprotektoren erweitert werden.

Um einen zellbiologischen Effekt zu erzielen, wurden die Ergebnisse auf Carboxymethylcellulose-stabilisierte und mit siRNA (anti-EGFP) funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel übertragen. Es konnte eine signifikante Gen-Stummschaltung an HeLa-EGFP-exprimierenden Zellen gefunden werden. Dieser Effekt wurde durch die Anwesenheit von Trehalose als Kryoprotektor weiter gesteigert.

Ergebnisse und Diskussion

Im zweiten Teil wurde die Darstellung eines kationischen Trägersystems, basierend auf Calciumphosphat-Nanostäbchen (Ostim[®]), für die Transfektion von Zellen mit unterschiedlichen Nukleinsäuren diskutiert. Die kolloidchemische Charakterisierung mittels Dynamischer Lichtstreuung zeigte einen monodispersen Charakter. Das Zetapotential war stark positiv. Die Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen konnten in Gegenwart von Trehalose ohne Verlust des kolloidalen Charakters lyophilisiert werden. Vor dem Gebrauch wurden die Nanopartikel mit DNA für die Transfektion oder siRNA für die Gen-Stummschaltung beladen. Die resultierenden Transfektionseffizienzen waren vergleichbar mit den Transfektionseffizienzen von Liposomen oder anderen kationischen Transfektionssystemen. In Gegensatz zu liposomalen Transfektionssystemen lag die Zellvitalität nach der Transfektion bei 80 % bis 90 %. Demnach zeigte das hier vorgestellte Trägersystem ein potentielles Anwendungsfeld für die Gen-Therapie.

4.3 Polymer-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel als Trägersysteme für die Photodynamische Therapie

4.3.1 Photodynamische Therapie

Bei der Photodynamischen Therapie (PDT) handelt es sich um eine Methode, um entartetes, tumoröses Gewebe als auch bakterielle Biofilme zu zerstören.^[106, 170] Hierzu wird der Tumor mit einer lichtaktiven Substanz, dem sogenannten Photosensibilisator, versetzt. Dieser soll sich in erhöhter Konzentration im tumorösen Gewebe einlagern. Dies lässt sich mit Hilfe des EPR-Effektes (*enhanced permeability and retention effect*) realisieren. Dieser Effekt beschreibt die passive Aufnahme partikulärer Systeme in das tumoröse Gewebe durch die erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße, verhindert allerdings ihren Austritt aufgrund des fehlenden Lymphsystems.^[171-173]

In Abbildung 49 ist schematisch das Funktionsprinzip der Photodynamischen Therapie aufgeführt. Wird die photosensitive Spezies mit elektromagnetischer Strahlung geeigneter Wellenlänge bestrahlt, so wird diese unter Aufnahme eines diskreten Energiepaketes vom Singulett-Grundzustand (S_0) in den ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustand (S_1) überführt.^[174, 175] Der Photosensibilisator kann nun unter Quantenemission erneut den Grundzustand erreichen, wobei dies im Allgemeinen als Fluoreszenz bezeichnet wird.^[176] Überschneiden sich jedoch die Potentialkurven des ersten angeregten Singulett-Zustandes und des ersten angeregten Triplett-Zustandes, so kann es zu einem sogenannten *Intersystem Crossing* (ISC) kommen.^[170, 177] Der vorliegende angeregte Triplett-Zustand (T_1) ist ein metastabiles System, da aufgrund des Spinverbotes kein direkter Übergang in den Singulett-Grundzustand möglich ist. Mit dem in den Zellen vorliegenden molekularen Sauerstoff kann der Photosensibilisator jedoch durch direkten Energietransfer diesen Grundzustand erreichen.^[178, 179] Da das Sauerstoffmolekül im Grundzustand als Triplettssystem (3O_2) existiert, kann durch direkten Kontakt beider Triplettspezies und den

darauf folgenden Energietransfer *in situ* erzeugter Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2 = ^1\Delta_g$) gebildet werden. Dies gelingt unter Beibehaltung des Gesamtspins und der darauf folgenden Rückgewinnung der photosensitiven Spezies im Singulett-Grundzustand.

Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff liegt in biologischen Systemen unter $0,04 \mu\text{s}$. Daher besitzt Singulett-Sauerstoff einen Aktionsradius unter $0,02 \mu\text{m}$.^[170, 180, 181] Singulett-Sauerstoff zersetzt sowohl die Biomembran als auch Biomoleküle wie Nukleinsäuren und Peptide durch seine oxidierende Wirkung, was zur Apoptose führt.^[182-184] Hierbei fungiert der Photosensibilisator lediglich als katalytisch aktive Spezies, welche erneut zur Aktivierung des umliegenden Triplett-Sauerstoffs dienen kann.^[170, 178]

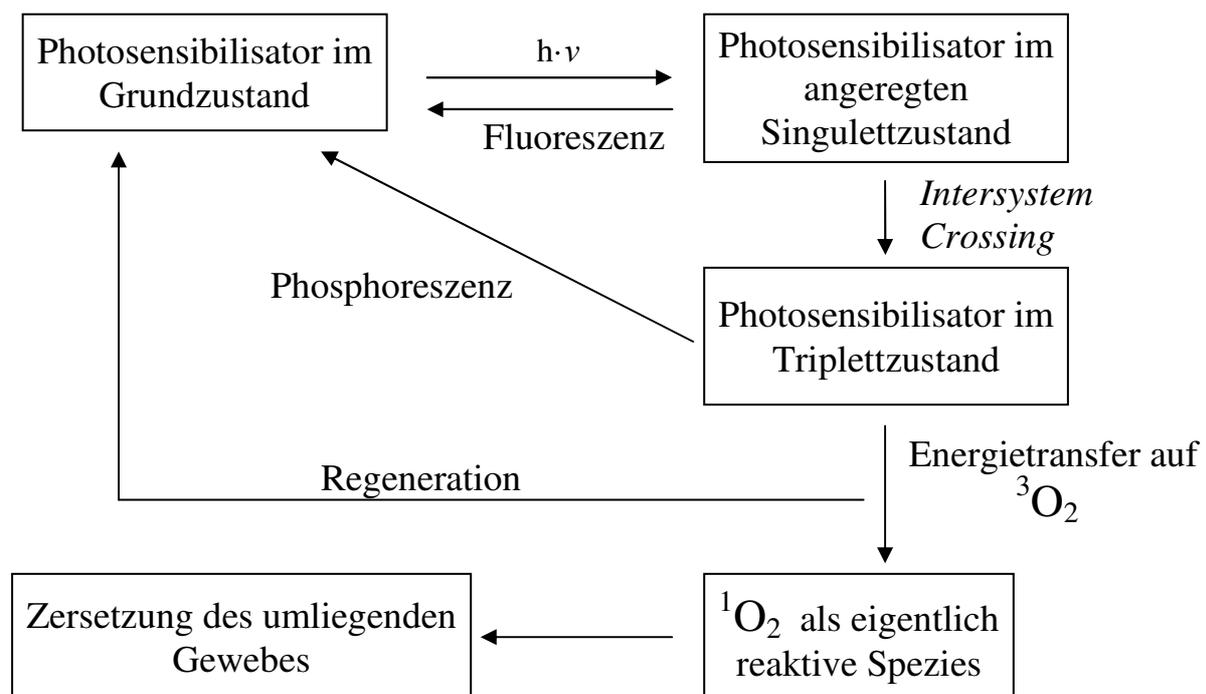


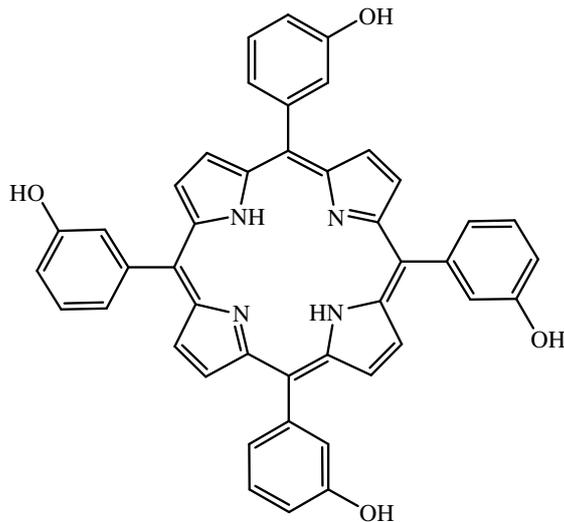
Abbildung 49: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Photodynamischen Therapie.

Eigenschaften eines Photosensibilisators sollten eine einfache Herstellung, eine hohe Quantenausbeute (Bildung von viel Singulett-Sauerstoff) und eine hohe Akkumulationsselektivität im entarteten Gewebe sein. Zudem sollte seine

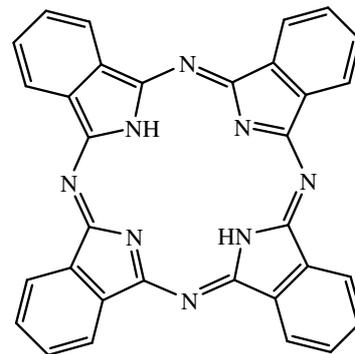
Ergebnisse und Diskussion

Lichtabsorption im roten Wellenlängenbereich liegen, da längerwellige Strahlung eine größere Eindringtiefe in das Gewebe zeigt.^[185, 186]

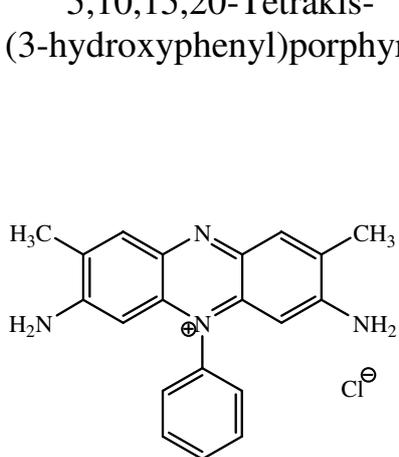
Zurzeit sind einige photoaktive Substanzen bekannt, die diese Eigenschaften erfüllen.^[187-189] Dabei müssen keine strukturellen Ähnlichkeiten der Photosensibilisatoren vorhanden sein. Eine kleine Übersicht unterschiedlicher Photosensibilisatoren ist in Abbildung 50 aufgeführt.



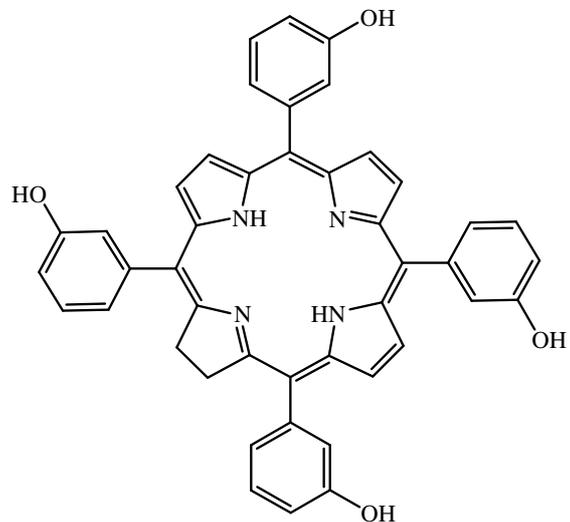
5,10,15,20-Tetrakis-(3-hydroxyphenyl)porphyrin



Phthalocyanin



Safranin



5,10,15,20-Tetrakis-(3-hydroxyphenyl)chlorin

Abbildung 50: Unterschiedliche Photosensibilisatoren, die als photoaktive Farbstoffe in der Photodynamischen Therapie eingesetzt werden.

4.3.2 Nanopartikel als Trägersysteme in der Photodynamischen Therapie

Da die einzelnen Photosensibilisatoren hydrophoben Charakter und daher nur eine sehr geringe Wasserlöslichkeit besitzen,^[190] ist es von großem Interesse, Wirkstoffträger-Systeme zu entwickeln, die eine hohe Penetrationsselektivität gegenüber entartetem Gewebe zeigen, eine große Photosensibilisatoraufnahme-Kapazität besitzen und eine Anwendung im wässrigen Medium ermöglichen.^[191] Diese Eigenschaft ist notwendig, da Gewebe zu einem großen Anteil aus Wasser besteht. Zusätzlich sollte eine günstige und leichte Synthese der Wirkstoffträger-Systeme für den erfolgreichen Einsatz in der Medizin erreicht werden. Heute sind zahlreiche Wirkstoffträger-Systeme für die Photodynamische Therapie bekannt. Die am weitesten verbreiteten Wirkstoffträger-Systeme sind Mizellen, Liposome, Lipoproteine, Polymermizellen und hydrophile Wirkstoff-Polymer-Komplexe.^[190]

Die mizellaren Systeme zeigen eine hohe Aufnahmekapazität bezüglich der photosensitiven Spezies und eine hohe Penetrationsrate ins Zielgewebe. Dennoch neigen solche emulsionsbildenden Substanzen zur Auslösung von Überempfindlichkeitsreaktionen und daher zu möglichen Nebenwirkungen für den Patienten.^[190, 192] Liposome bestehen aus Phospholipiden, die konzentrisch angeordnete Doppelschichten ausbilden und hydrophile sowie hydrophobe Bereiche aufweisen.^[193] Damit können Wirkstoffe transportiert werden, unabhängig davon, ob sie lipophilen oder lipophoben Charakter besitzen. Die Aufnahme der Liposome in tumoröses Gewebe ist recht hoch, was für ein erfolgreiches Wirkstoffträger-System spricht. Der Nachteil an diesem System ist jedoch die geringe Aufnahmekapazität für photosensitive Stoffe.^[190] Ein weiterer Nachteil liegt in der Aggregation des photosensitiven Farbstoffes in den hydrophoben Bereichen, wodurch ein Freisetzen im umgebenden Medium erschwert wird.^[194]

Die polymerbasierten Mizellen als potentielle Wirkstoffträger-Systeme zeigen gute Toxizitätsergebnisse *in vitro*, jedoch eine sehr geringe Toxizität bei *in vivo*-Studien an lebenden Organismen.^[190, 195] Ein weiterer Schwachpunkt liegt in der zusätzlichen Akkumulation des Wirkstoffträger-Systems im gesunden Gewebe. Selbst einen Monat nach erfolgter Applikation kann es zur Anreicherung der photosensitiven Spezies im gesunden Gewebe kommen und dieses nachträglich schädigen.^[190, 195]

Ein möglicher Ausweg, um die Nachteile der zuvor diskutierten Methoden zu umgehen, liegt in der Verwendung von anorganischen Nanopartikeln als Trägersubstanzen. Die Synthese keramischer Siliciumoxid-Nanopartikel ist unkompliziert und die dazu benötigten Chemikalien sind preiswert. Es ist leicht, die Größe und die Porosität der Partikel zu variieren sowie deren Oberfläche zu funktionalisieren.^[196-198] Darüber hinaus sind keramische Systeme gegenüber mikrobiellem Angriff beständig.^[190] Unter den keramischen Trägersubstanzen für die Photodynamische Therapie zeichnen sich Calciumphosphat-Nanopartikel durch ihre hohe Biokompatibilität aus. Calciumphosphat ist ein fundamentaler Bestandteil von Knochen und Zähnen^[61, 63] und hat daher keine toxische Wirkung auf den Organismus. Calciumphosphat-Nanopartikel können im wässrigen Medium durch Polymere in kolloidaler Form stabilisiert^[168] und als geeignete Wirkstoffträger-Systeme in der Photodynamischen Therapie eingesetzt werden.^[12, 106, 199]

4.3.3 Einführung in die Thematik

Die Herstellung Polymer-funktionalisierter und 5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)porphyrin (*m*THPP)-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel ist aus der Literatur bekannt.^[106, 199] Die Parameter zur Darstellung wurden von Schwiertz *et al.* optimiert.

Das Ziel des vorliegenden Kapitels war die Übertragung der Resultate auf einen weiteren Photosensibilisator mit dem Namen Temoporfin. Hierbei handelt es sich um den in Abbildung 50 dargestellten Photowirkstoff 5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin (*m*THPC). Dieser Farbstoff ist Bestandteil des Arzneimittels Foscan[®] und bereits in der EU zugelassen.^[200] Foscan[®] zeichnet sich durch eine hohe photodynamische Wirksamkeit aus und ist aus aktueller Sicht einer der vielversprechendsten Kandidaten für einen gezielten Einsatz in der Photodynamischen Therapie.^[201] Besonders in der Bekämpfung von tumorösem Gewebe im Kopf-Hals-Bereich zeichnet sich *m*THPC mit Remissionsraten von bis zu 50 % gegenüber Plattenepithelkarzinomen aus.^[202] Eine Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit dem Photowirkstoff *m*THPC wäre eine ausgezeichnete Ergänzung zu den bereits bestehenden Ergebnissen von Schwiertz *et al.* und ein weiterer Schritt in Richtung der praktischen Anwendung.

Der Unterschied zwischen *m*THPP und *m*THPC liegt in der zusätzlichen Hydrierung des Porphyringerüsts an der 2,3-Position (Abbildung 51, roter Pfeil), weshalb Chlorinderivate auch als Dihydroporphyrine bezeichnet werden.^[203] Die Hückel-Aromatizität bleibt trotz dieser Veränderung im Grundgerüst erhalten.^[204]

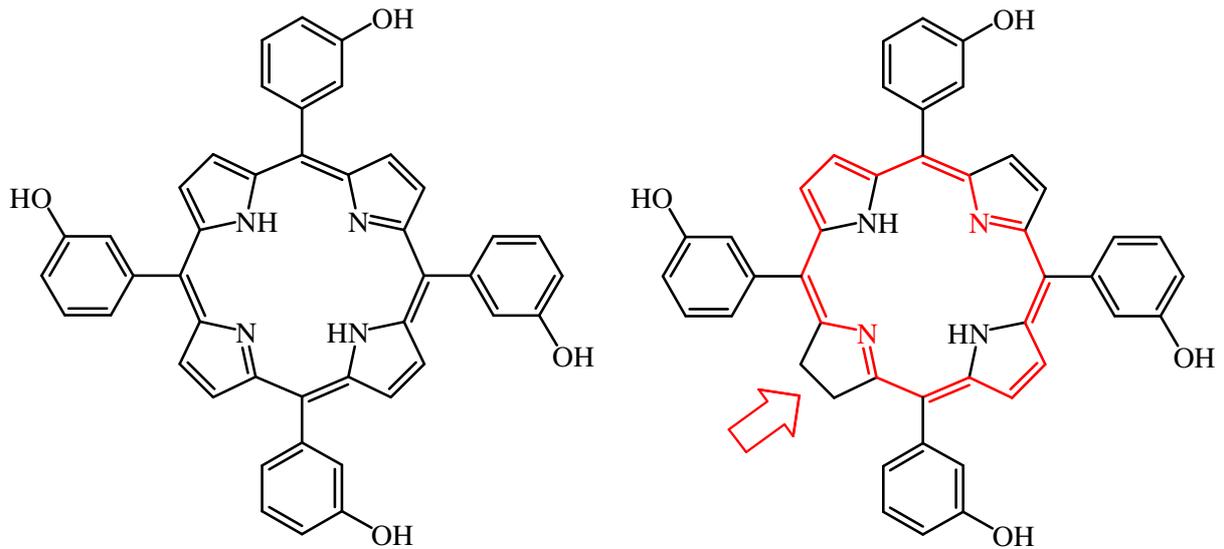


Abbildung 51: Gegenüberstellung von 5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)porphyrin (*mTHPP*) und 5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin (*mTHPC*).

Die Hydrierung an dieser Position führt zu einer erhöhten Absorption bei einer Wellenlänge von 652 nm. Daraus resultiert eine höhere Quantenausbeute, die für eine Generierung von Singulett-Sauerstoff essentiell ist.^[205] So kann auch in tiefer liegendem Gewebe eine signifikante photodynamische Wirkung erzielt werden.

4.3.3.1 Herstellung und Untersuchung der phototoxischen Wirkung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln

4.3.3.1.1 Herstellung und Charakterisierung

Dai *et al.* stellten 2001 eine Methode zur Einlagerung hydrophober Substanzen in Polyelektrolytschichten vor.^[206, 207] Diese Vorgehensweise wurde später von Schwiertz *et al.* auf Polymer-stabilisierte Calciumphosphat-Nanopartikel und Photosensibilisatoren übertragen.^[106, 208] Die Triebkraft der Farbstoffadsorption wurde unter anderem mit dem hydrophoben Effekt erklärt.^[209] So führt die Einlagerung des hydrophoben Farbstoffes in die stabilisierenden Polymerschleifen zu einer Entropieerhöhung des Lösungsmittels.^[209]

Die Herstellung Carboxymethylcellulose-stabilsierter und *m*THPC-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel erfolgte gemäß der Synthese nach Schwiertz *et al.* Hierzu wurde 1 mL des in 2-Propanol gelösten Farbstoffs mit einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ zu 5 mL der Phosphat-Lösung gegeben. Die Zugabe der *m*THPC-Phosphat-Mischung erfolgte über eine Spritze parallel zu der Zugabe der Calcium- sowie der Polymerlösung in eine Wasservorlage (Abbildung 52).

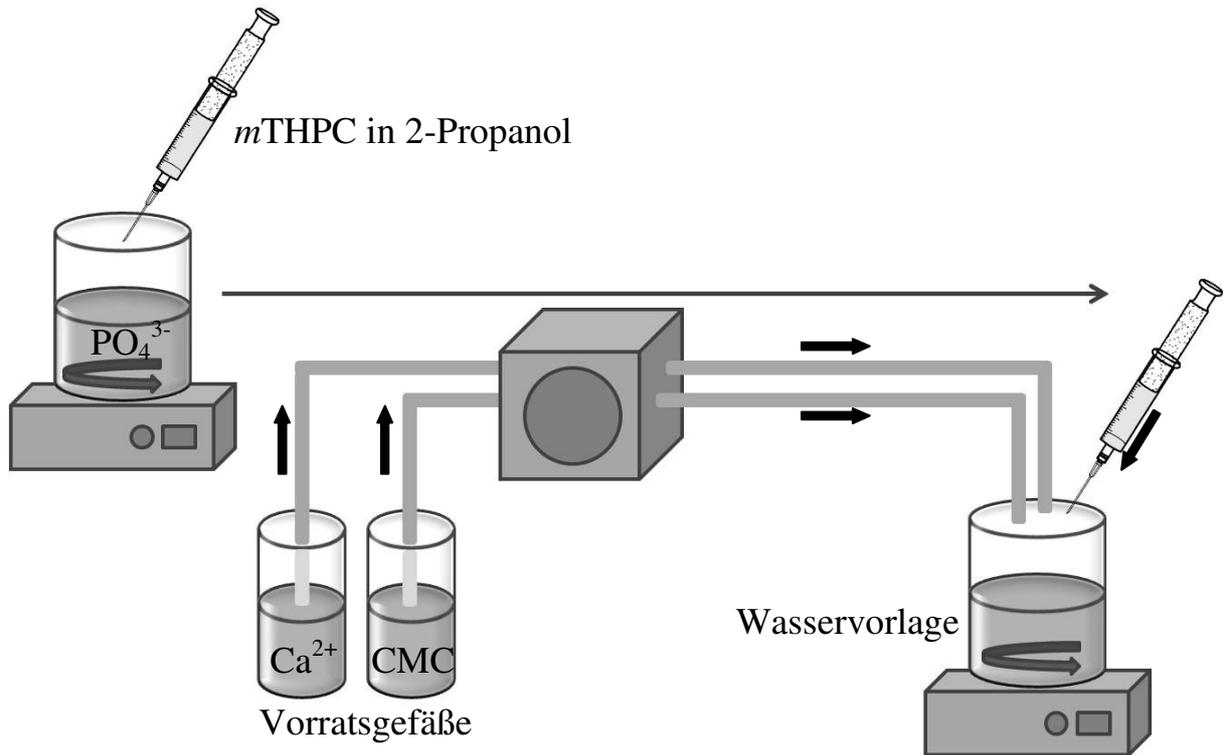


Abbildung 52: Schematischer Aufbau der Fällungsapparatur zur Darstellung von CMC-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Die Bildung eines mit Carboxymethylcellulose stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikels ist in Abbildung 53 dargestellt. Der adsorbierte Farbstoff befindet sich in den stabilisierenden Polymerschleifen, die das Partikel umgeben.

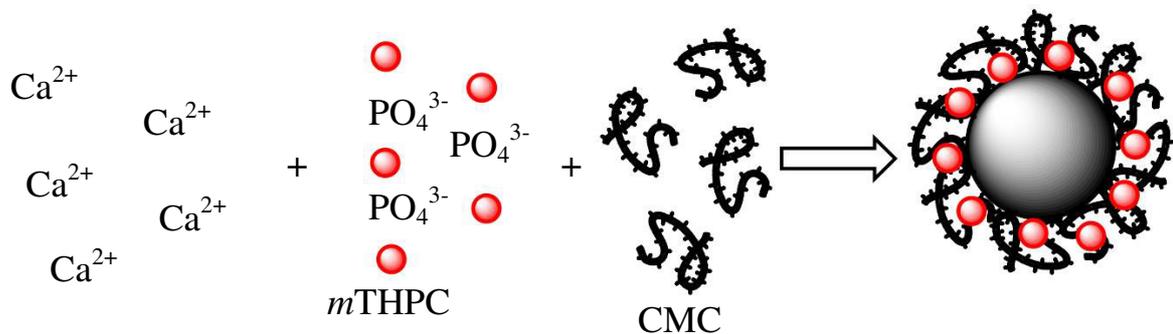


Abbildung 53: Schematische Darstellung des mit CMC stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikels.

Ergebnisse und Diskussion

Die Entfernung der überschüssigen Polymer- und Farbstoffkomponente sowie der vorliegenden Gegenionen erfolgte mittels Ultrazentrifugation und anschließendem Redispersieren.

Die mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilung nach zweimaliger Aufreinigung ist in Abbildung 54 dargestellt. Zum Vergleich ist die Überlagerung der Größenverteilung für die in Gegenwart von Lactose lyophilisierte Dispersion nach erfolgter Wasseraufnahme dargestellt.

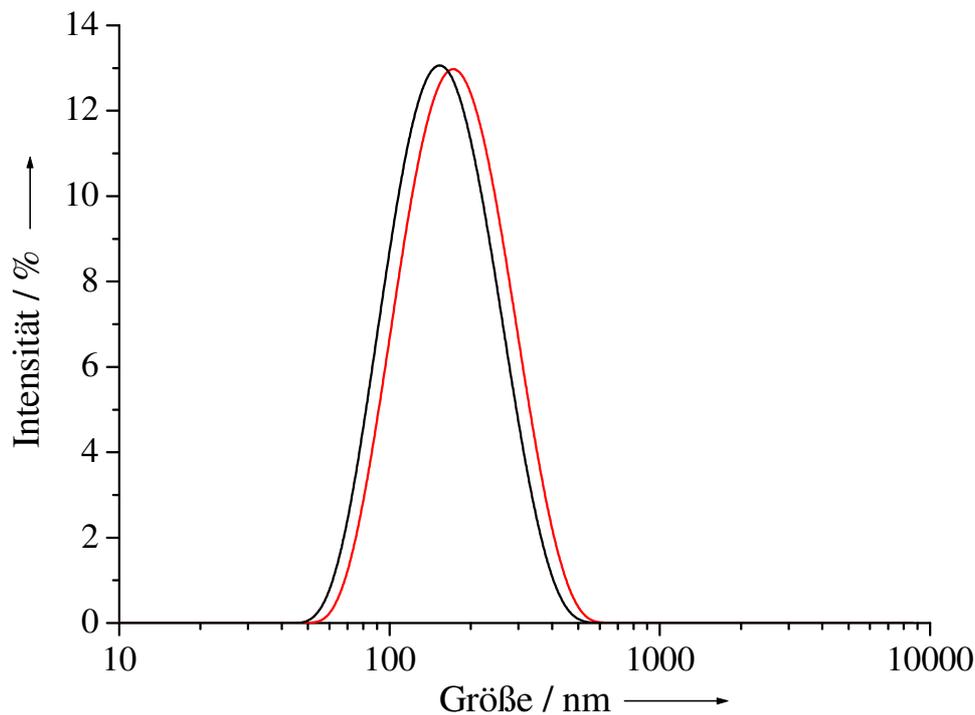


Abbildung 54: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilung der CMC-funktionalisierten und *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach zweimaliger Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation und anschließendem Redispersieren (schwarz). Zum Vergleich ist die in Gegenwart von Lactose lyophilisierte Dispersion nach der Wasseraufnahme dargestellt (rot).

Ergebnisse und Diskussion

Die in Abbildung 54 dargestellte Größenverteilung der aufgereinigten Dispersion (schwarz) besaß ein Maximum bei 140 nm. Es zeigte sich ein monodisperser Charakter ohne Agglomerate. Dies wurde durch einen Polydispersitätsindex von 0,176 bestätigt. Das Zetapotential betrug -25 mV. Dieser Wert bestätigte das Vorliegen eines elektrosterisch stabilisierten Systems. Zur Erhaltung der kolloidalen Stabilität wurde die Dispersion mit Wasser im Verhältnis 1:4 verdünnt.^[208] Die in Gegenwart von Lactose lyophilisierte und durch Wasseraufnahme regenerierte Dispersion zeigte eine leichte Größenzunahme des hydrodynamischen Durchmessers. Dieser Effekt war gering und ließ sich mit dem Zusatz von Lactose und der daraus erhöhten Viskosität des Lösungsmittels erklären. Weiter war ein leichtes Verkleben der Nanopartikel durch den Lyophilisationsprozess denkbar.

Zur näheren Charakterisierung wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 55).

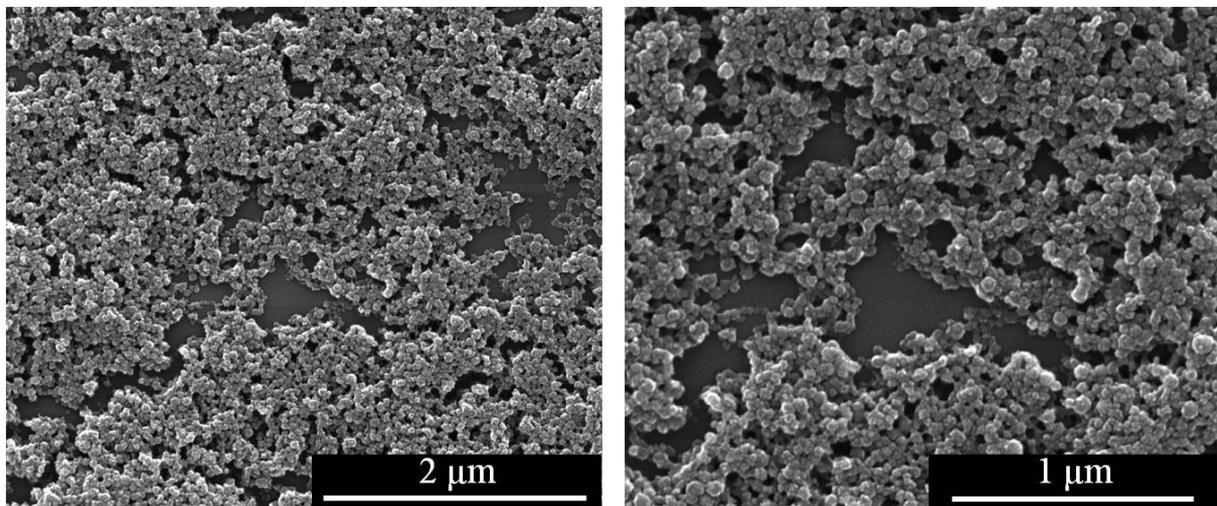


Abbildung 55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der CMC-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Aufreinigung.

Die in Abbildung 55 dargestellten Partikel zeigten einen kugelförmigen Charakter mit einer einheitlichen Größenverteilung zwischen 50 nm und 80 nm. Der Unterschied zwischen der Größenangabe der Dynamischen Lichtstreuung und der Rasterelektronenmikroskopie resultierte aus dem hydrodynamischen Radius. In der Dynamischen Lichtstreuung wurde das im wässrigen Medium aufgequollene Polymer mit berücksichtigt. Im Rasterelektronenmikroskop wurde lediglich der Calciumphosphat-Kern dargestellt. Hier fiel die stabilisierende Polymerschicht auf den Partikeln im Hochvakuum in sich zusammen.

Die Quantifizierung des Farbstoffgehaltes erfolgte UV-Vis-spektroskopisch. Dazu wurde eine Kalibrationsgerade mit bekannter Farbstoffkonzentration an *m*THPC in Gegenwart von Carboxymethylcellulose angefertigt. Mittels linearer Regression und der resultierenden Ausgleichsgeraden konnte dann bei einem bekannten Absorptionsmaximum ($\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$) der vorliegende Farbstoffgehalt berechnet werden. Das Absorptionsspektrum der CMC-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Aufreinigung und anschließender Verdünnung ist in Abbildung 56 dargestellt.

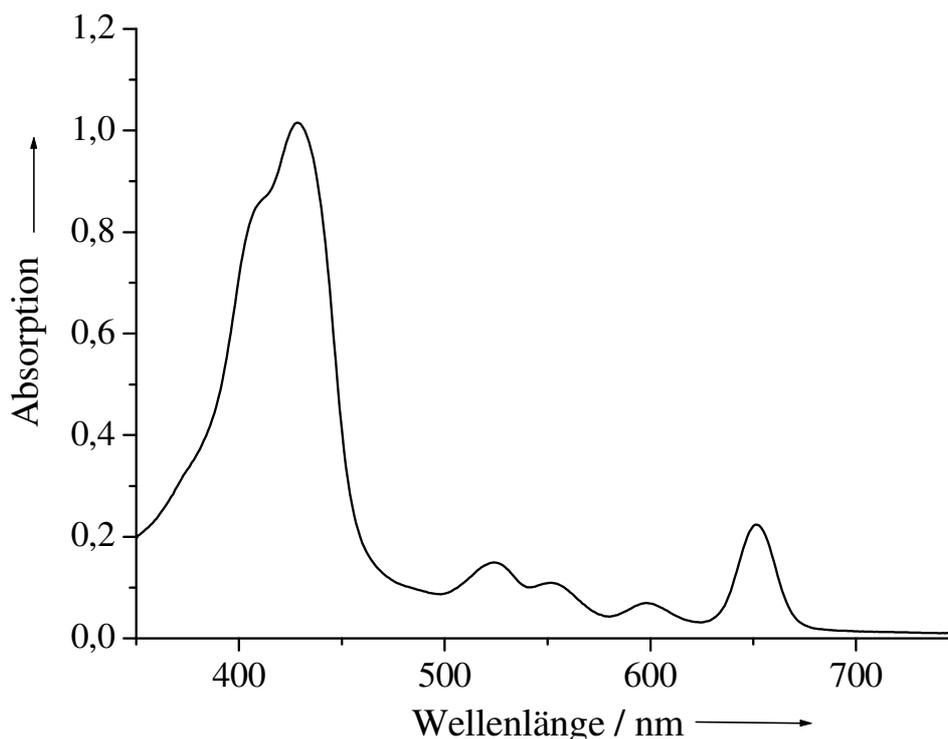


Abbildung 56: UV-Vis-Spektrum der CMC-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Aufreinigung und anschließender Verdünnung (1:4).

Die *m*THPC-Konzentration der synthetisierten Calciumphosphat-Nanopartikel lag nach erfolgter Verdünnung bei $8,7 \mu\text{M}$. Im Wellenlängenbereich zwischen 500 nm und 700 nm zeigten sich die einzelnen Q-Banden. Die breite B-Absorptionsbande bei einem Maximum von 425 nm wurde für die Bestimmung des Farbstoffgehaltes genutzt und deutete durch den relativ breiten Charakter auf eine Agglomeration des Chlorin-Gerüsts in den Polymerschleifen der stabilisierenden Carboxymethylcellulose hin.

Um weitere Analysen von den aufgereinigten Partikeln anzufertigen, wurden diese erneut abzentrifugiert (30 min, 66000 g), der Überstand mit einer Spritze entfernt und die erhaltenen Pellets für zwei Tage an Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Die erhaltenen Feststoffe wurden in einen Korund-Tiegel überführt und unter Sauerstoffatmosphäre thermisch zersetzt. Die erhaltenen

Ergebnisse und Diskussion

Thermogramme für die Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne Farbstoffbeladung sind in Abbildung 57 dargestellt. Die eingewogene Menge betrug 27,3 mg für die Carboxymethylcellulose-stabilisierten und 30,1 mg für die Carboxymethylcellulose-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Partikel.

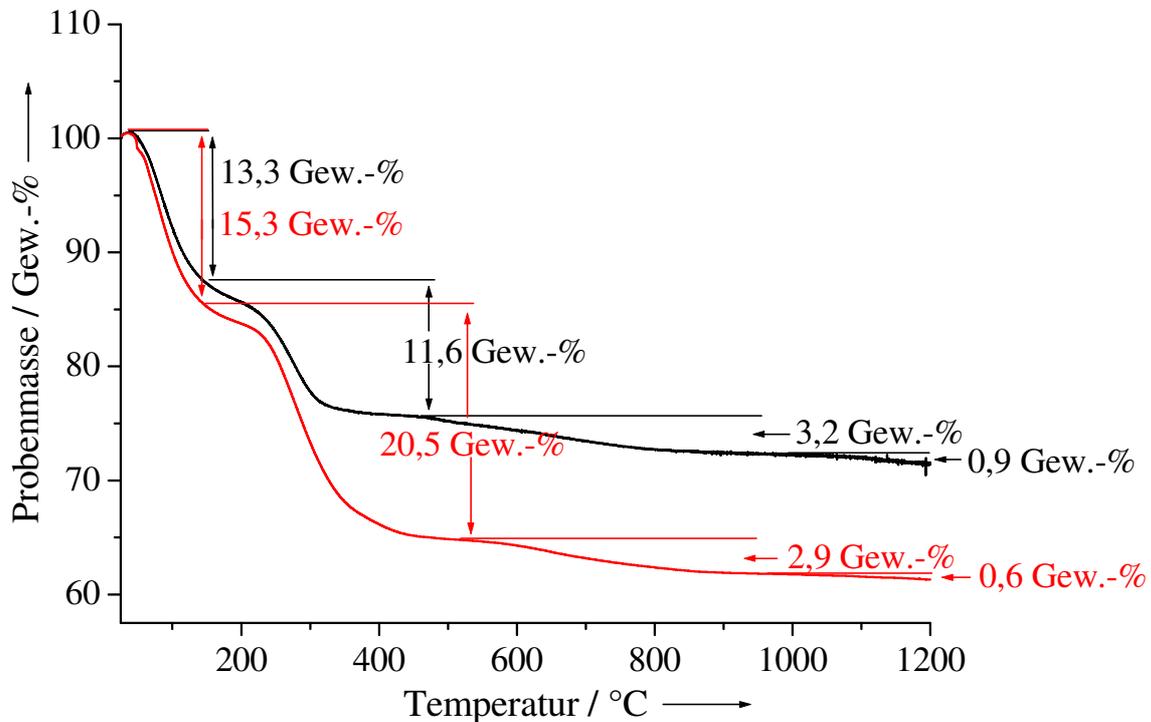


Abbildung 57: Thermogramme für die CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit (rot) und ohne (schwarz) *m*THPC-Beladung. Durchgeführt unter Sauerstoffatmosphäre (50 mL min^{-1}) und mit einer Heizrate von 1 K min^{-1} .

Im Thermogramm lässt sich im Temperaturbereich um 100 °C die thermische Desorption von Wasser erkennen. Hier besaßen die mit Farbstoff beladenen Partikel mit $15,3 \text{ Gew.-%}$ einen geringfügig höheren Wasseranteil als diejenigen ohne Farbstoffbeladung ($13,3 \text{ Gew.-%}$). Im Temperaturbereich zwischen 200 °C und 1000 °C kam es zur Oxidation der organischen Bestandteile (CMC und *m*THPC). In diesem Temperaturbereich konnten die Massenverluste in zwei Stufen eingeteilt werden. Die erste Stufe lag im Temperaturbereich von 200 °C bis 450 °C , die zweite im Bereich zwischen 450 °C und 1000 °C . Für die mit

Ergebnisse und Diskussion

*m*THPC beladenen Partikel lag der Massenverlust in den einzelnen Stufen bei 20,5 Gew.-% und 2,9 Gew.-%, während dieser Wert für die unbeladenen Partikel bei 11,6 Gew.-% und 3,2 Gew.-% lag. Da der Massenverlust im Temperaturbereich zwischen 450 °C und 1000 °C für die unbeladenen Partikel nur unwesentlich größer ausfiel, konnte diese Stufe nicht dem Abbrand des Photosensibilisators zugeordnet werden. Erwartungsgemäß zeigten die mit Farbstoff beladenen Partikel mit 23,4 Gew.-% einen um 8,6 Gew.-% höheren Massenverlust durch Verbrennung als die unmodifizierten Partikel (14,8 Gew.-%). Diese Differenz resultierte aus dem adsorbierten Farbstoffanteil. Durch den mittels Elementaranalyse bestimmten Stickstoffwert ließ sich der Anteil der adsorbierten Farbstoffkomponente berechnen. Der berechnete Anteil lag hier bei 8,5 Gew.-% und stimmte mit dem aus dem Thermogramm ermittelten Differenzwert überein (Gleichung 16). Im Temperaturbereich von 1000 °C bis 1200 °C kam es zur thermischen Abspaltung von Kohlenstoffdioxid aus dem carbonathaltigen Calciumphosphat-Gitter. Für die nicht mit Farbstoff beladenen Partikel lag der resultierende Carbonatanteil bei 1,2 Gew.-%, während der Wert für die mit Farbstoff beladenen Partikel bei 0,8 Gew.-% lag.

$$\frac{N_{m\text{THPC, ad}}}{N_{m\text{THPC, rein}}} \cdot 100 \text{ Gew.-%} = X_{m\text{THPC, ad}} \quad (16)$$

$N_{m\text{THPC, ad}}$: Stickstoffanteil auf den Partikeln

$N_{m\text{THPC, rein}}$: Stickstoffanteil des reinen Farbstoffes

$X_{m\text{THPC, ad}}$: Prozentual adsorbierter *m*THPC-Anteil an den Partikel

$$\frac{0,695}{8,226} \cdot 100 \text{ Gew.-%} = 8,45 \text{ Gew.-%}$$

Die Bestimmung des auf den Partikeln adsorbierten *m*THPC-Gehalts ließ sich ebenfalls über die mittels UV-Vis-Spektroskopie ermittelte

Ergebnisse und Diskussion

Farbstoffkonzentration und die gravimetrisch bestimmte Ausbeute berechnen. Die Ausbeute an CMC-stabilisierten und mit m THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln ($m_{\text{CaP/CMC}/m\text{THPC}}$) lag nach erfolgter Verdünnung bei 62 mg L^{-1} (siehe 3.1.13). Die molare Masse von m THPC ($M_{m\text{THPC}}$) beträgt $680,75 \text{ g mol}^{-1}$. Die mittels UV-Vis-Spektroskopie ermittelte Farbstoffkonzentration betrug $c_{m\text{THPC}} = 8,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Die adsorbierte m THPC-Menge ($m_{m\text{THPC}}$) an den Partikeln betrug damit:

$$n_{m\text{THPC}} \cdot M_{m\text{THPC}} = m_{m\text{THPC}} \quad (17)$$

$$8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot 680,75 \text{ g mol}^{-1} = 5,92 \cdot 10^{-3} \text{ g}$$

Damit waren $5,92 \text{ mg}$ m THPC in einem Volumen von 1 L auf den Partikeln adsorbiert. Der prozentual adsorbierte m THPC-Anteil auf den Partikeln war demnach:

$$\frac{m_{m\text{THPC}}}{m_{\text{CaP/CMC}/m\text{THPC}}} = \frac{5,92 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{62,00 \cdot 10^{-3} \text{ g}} \cdot 100 \text{ Gew.-%} = 9,6 \text{ Gew.-%} \quad (18)$$

Der mittels UV-Vis-Spektroskopie ermittelte m THPC-Anteil an den Partikeln lag demnach bei $9,6 \text{ Gew.-%}$.

Der so bestimmte m THPC-Gehalt lässt sich sehr gut mit den Ergebnissen der Thermogravimetrie und der Elementaranalyse vergleichen. Die Abweichung von etwa 1 Gew.-% liegt im Bereich des Messfehlers, kann aber auch durch die gravimetrisch bestimmte Ausbeute und dem zugehörigen Fehler erklärt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 10: Zusammenfassung der mittels Elementaranalyse und Thermogravimetrie erhaltenen Daten für die CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne *m*THPC-Beladung.

Komponente	CaP/CMC	CaP/CMC/<i>m</i>THPC
Ca ²⁺ (AAS) / Gew.-%	25,95	25,08
PO ₄ ³⁻ (UV) / Gew.-%	36,4	33,45
C / Gew.-%	6,25	12,49
H / Gew.-%	3,26	3,05
N / Gew.-%	-	0,70
Mineralgehalt / Gew.-% (TG)	71,9	61,3
Molares Ca/P-Verhältnis	1,69	1,78
Organischer Anteil / Gew.-% (TG)	14,8	23,4
Carbonatgehalt / Gew.-% (TG)	1,2	0,8
Wassergehalt / Gew.-% (TG)	13,3	15,3
<i>m</i> THPC-Gehalt (UV) / Gew.-%	-	9,6

Zur Bestimmung des kristallinen Charakters wurden Röntgenpulverdiffraktogramme der abzentrifugierten und getrockneten Calciumphosphat-Nanopartikel angefertigt. In Abbildung 58 sind die erhaltenen Diffraktogramme dargestellt.

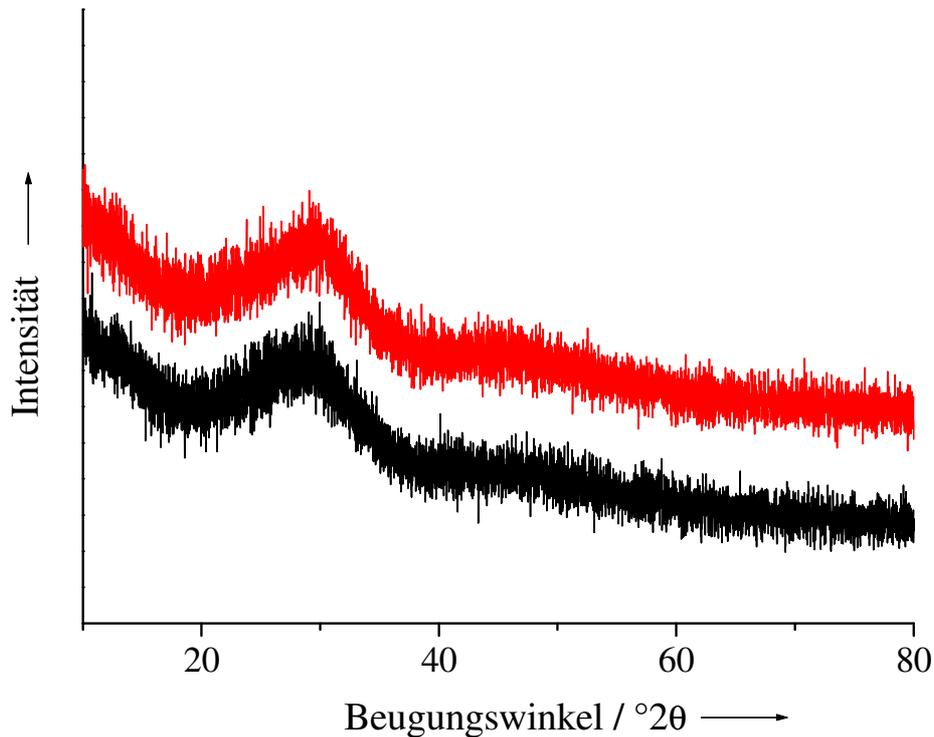


Abbildung 58: Röntgenpulverdiffraktogramme der CMC-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel (rot). Zum Vergleich ist das unbeladene System dargestellt (schwarz).

Die in Abbildung 58 aufgeführten Diffraktogramme zeigen einen ausschließlich röntgenamorphen Charakter. Eine Zuordnung bestimmter Reflexlagen war nicht möglich.

4.3.3.1.2 Diskussion der Zelltests

Um die Zellvitalität vor und nach der Laserbehandlung zu bestimmen, wurde der XTT-Test herangezogen. Hierbei wurden die zu untersuchenden Zellen mit einem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz inkubiert. Nach erfolgter Aufnahme kam es nur innerhalb lebender Zellen zur Reduktion des Tetrazoliumsalzes durch intrazelluläre Enzyme zu einem Formazan-Derivat. Der resultierende Farbumschlag von gelb zu orange konnte spektroskopisch erfasst und die Vitalität durch ein Kontrollexperiment mit unbehandelten Zellen bestimmt werden.^[210] Für die zellbiologischen Untersuchungen wurden die Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel an biolitec in Jena übergeben. Es wurden ausschließlich die in Gegenwart von Lactose lyophilisierten Systeme (nGF, nach Gefriertrocknung) ausgewählt und an den folgenden Zelllinien getestet:

HIG-82: Synoviozytenzellen vom Kaninchen aus der Synovia (Gelenkflüssigkeit)

HT29: Kolonkarzinomzellen (Darmtumor) vom Menschen

J774A.1: Makrophagen (Fresszellen) von der Maus

Zum Vergleich wurden die Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne Farbstoffbeladung sowie der in Ethanol gelöste Farbstoff bei gleicher Konzentration untersucht. Alle Systeme wurden mit DMEM auf eine Endkonzentration von 2 μ M eingestellt. Dabei konnte die Wirkung von Ethanol auf die Zellen nach erfolgter Verdünnung vernachlässigt werden. Die unbeladene Calciumphosphat-Dispersion wurde gleichermaßen verdünnt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 11: Eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart von Lactose mit und ohne *m*THPC-Beladung sowie der in Ethanol gelöste Farbstoff nach erfolgter Verdünnung mit DMEM.

Komponente	<i>m</i>THPC-Konzentration / μM	Mit DMEM eingestellte <i>m</i>THPC-Konzentration / μM
CaP/CMC nGF	0	-
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC nGF	8,74	2
<i>m</i> THPC	-	2

Die einzelnen Systeme wurden nach 24 h Inkubation mit einem Laser der Wellenlänge 652 nm (50 J cm^{-2}) bestrahlt.

Die erhaltenen Graphen zeigen die prozentuale Vitalität der jeweiligen Zellen vor und nach der Bestrahlung. Die dunkelblauen Balken stellen die Zellvitalität vor der Bestrahlung dar. Hier sollte für ein gutes Trägersystem eine geringe Toxizität zu verzeichnen sein. So ist gewährleistet, dass die eingesetzten Komponenten keine toxische Wirkung auf die Zellen haben. Im Gegensatz dazu sollte die Zellvitalität nach erfolgter Bestrahlung möglichst gering sein (hellblaue Balken).

Die photodynamische Wirksamkeit der Carboxymethylcellulose-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne Farbstoffbeladung nach der Lyophilisation in Gegenwart von Lactose sowie die Resultate des in Ethanol gelösten Farbstoffes bei einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ gegenüber HIG-82-Zellen in DMEM sind in Abbildung 59 dargestellt.

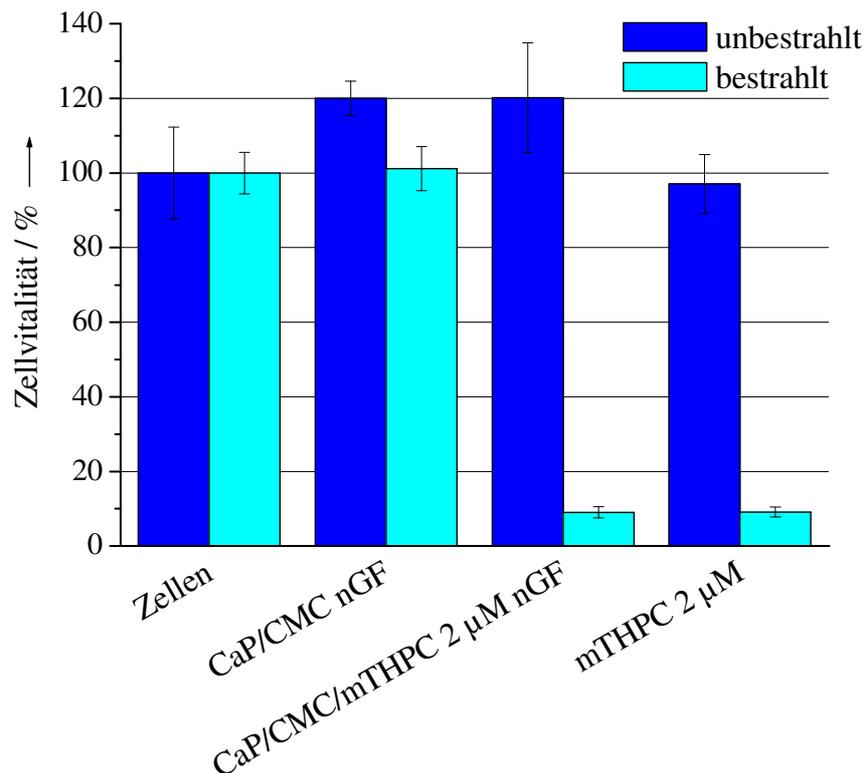


Abbildung 59: Phototoxizitätseigenschaften der CMC-stabilisierten und mit *mTHPC* funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart von Lactose und des Farbstoffes in ethanolischer Lösung an HIG-82-Zellen bei einer Farbstoffkonzentration von 2 µM. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Zellen vor und nach der Bestrahlung mit und ohne Partikelzusatz in DMEM aufgeführt.

Die unbeladenen Partikel zeigten vor und nach der Bestrahlung gegenüber der Zelllinie HIG-82 keine merkliche Toxizität. Die Zellvitalität lag vor der Bestrahlung bei 120 %. Nach erfolgter Bestrahlung lag dieser Wert bei etwa 100 %. Für die mit Farbstoff beladenen Partikel ließ sich vor der Bestrahlung ebenfalls kein toxischer Effekt feststellen. Nach erfolgter Bestrahlung sank die Zellvitalität auf 10 %. Die phototoxische Wirkung nach der Laserbehandlung lag damit bei 90 %. Dieses Resultat ließ sich mit der photodynamischen Wirksamkeit des Photosensibilisators in ethanolischer Lösung vergleichen.

Die von Schwiertz *et al.* dargestellten Partikelsysteme mit *m*THPP als photoaktive Spezies zeigten bei gleicher Farbstoffkonzentration lediglich eine Phototoxizität von 45 %.^[106, 208] In einer Erweiterung konnte im Jahr 2010 von mir an der gleichen Zelllinie eine Phototoxizität von etwa 80 % beobachtet werden.^[199] Das in dieser Arbeit eingesetzte *m*THPC besaß demnach eine erhöhte photodynamische Wirkung gegenüber HIG-82-Zellen. Dieser Effekt könnte mit der stärkeren Absorption von *m*THPC bei einer Wellenlänge von 652 nm erklärt werden. Die dadurch gesteigerte Ausbeute an Singulett-Sauerstoff zeigte somit eine höhere Toxizität nach der Laserbehandlung. Zudem könnte eine Wechselwirkung von Lactose mit der Zellmembran und die damit verbundene Akkumulation der *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel für die hohe Phototoxizität verantwortlich sein.

Die Ergebnisse aller untersuchten Systeme lagen mit Fehlerbalken zwischen 5 % und 15 % in für Zellexperimente typischen Bereichen.

Weiter wurden die Partikelsysteme an HT29-Zellen getestet. Die in Gegenwart von Lactose lyophilisierte Dispersion wurde mit DMEM auf eine Farbstoffkonzentration von 2 μ M verdünnt. Zum Vergleich wurden das unbeladene Partikelsystem und der Farbstoff in ethanolischer Lösung bei gleicher Konzentration getestet (Tabelle 12).

Die in Tabelle 12 dargestellten Vitalitätswerte zeigten für die unbeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel vor und nach der Bestrahlung mit Licht keine merkliche Toxizität. Somit hatte das Trägersystem keinen Einfluss auf die Zellviabilität vor und nach der Bestrahlung (95 % bis 98 %). Die Dunkeltoxizität der *m*THPC-beladenen Nanopartikel war bei einer Farbstoffkonzentration von 2 μ M vor der Bestrahlung mit 3 % vergleichsweise gering und lag damit im optimalen Rahmen. Die Phototoxizität nach der Laserbehandlung lieferte ein unbefriedigendes Resultat. Die photodynamische

Wirkung lag hier bei etwa 10 %. Die *m*THPC-haltigen Partikel zeigten demnach keine hohe Penetration in die Zellen der verwendeten Zelllinie.

Dieses Resultat war vergleichbar mit dem Partikelsystem von Schwiertz *et al.* Das dort eingesetzte *m*THPP zeigte selbst bei höheren Partikeldosierungen und Farbstoffkonzentrationen von bis zu 3,95 μ M keine photodynamische Wirkung.^[106, 208] Mit zunehmender Farbstoffbeladung konnte von mir keine weitere Steigerung der phototoxischen Wirkung erzielt werden.^[199]

Löw *et al.* publizierten 2011 den Einsatz von anionischen Poly(lactid-*co*-glycolid)-Nanopartikeln als Trägermaterial für *m*THPC. Mit diesen Trägern konnte eine Phototoxizität von bis zu 70 % an HT29-Zellen erzielt werden.^[191]

Der in Ethanol gelöste Farbstoff zeigte bei einer Konzentration von 2 μ M ebenfalls keine phototoxische Wirkung. Vor der Laserbehandlung lag die Zellvitalität bei etwa 100 %. Nach erfolgter Bestrahlung wurde eine photodynamische Wirkung von etwa 5 % beobachtet.

Weiter wurden die Partikelsysteme an J774A.1-Zellen getestet. Die in Gegenwart von Lactose lyophilisierte Dispersion wurde mit DMEM auf eine Konzentration von 2 μ M verdünnt. Zum Vergleich wurden das unbeladene Partikelsystem und der Farbstoff in ethanolischer Lösung bei gleicher Konzentration getestet.

Die Ergebnisse vor und nach der Laserbehandlung sind in Abbildung 60 dargestellt.

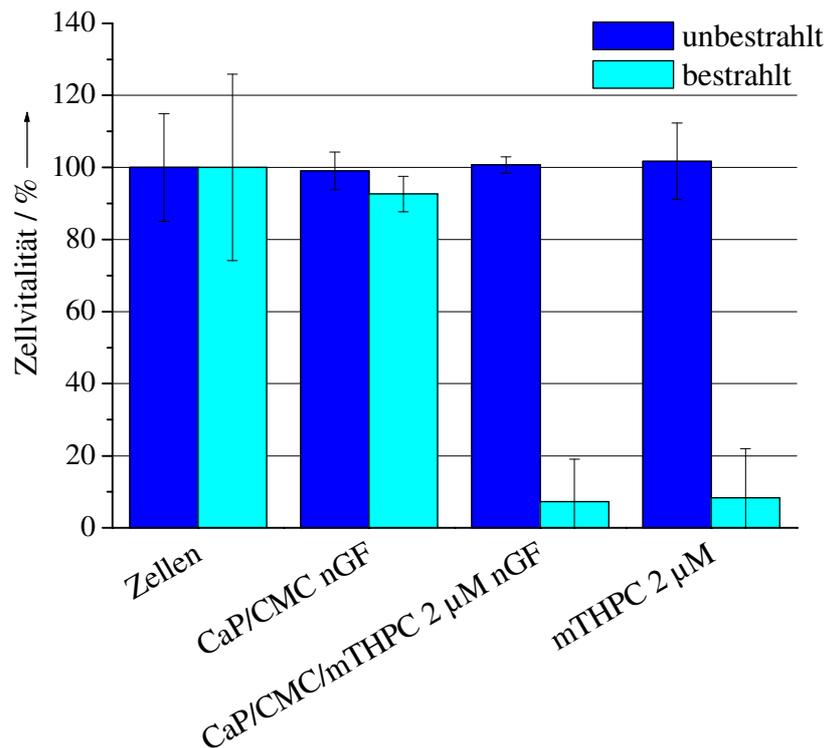


Abbildung 60: Phototoxizitätseigenschaften der CMC-stabilisierten und mit *m*THPC funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart von Lactose und des Farbstoffes in ethanolischer Lösung an J774A.1-Zellen. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Zellen vor und nach der Bestrahlung (50 J cm^{-2}) mit und ohne Partikelzusatz in DMEM aufgeführt.

Die mit Carboxymethylcellulose stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel ohne Farbstoffbeladung zeigten in der eingesetzten Verdünnung keine Photoaktivität. Somit konnte das reine Trägersystem als nicht toxisch angesehen werden. Für die mit *m*THPC beladene und auf eine Farbstoffkonzentration von $2 \mu\text{M}$ eingestellte Partikeldispersion ließ sich ebenfalls keine dunkeltoxische Wirkung erkennen. Demnach besaßen das reine Trägersystem und auch die *m*THPC-haltige Dispersion ohne Laseraktivierung keine merkliche Toxizität gegenüber der verwendeten Zelllinie. Im Gegensatz dazu sank die Zellvitalität nach erfolgter Bestrahlung auf 8 %. Die resultierende Phototoxizität betrug

Ergebnisse und Diskussion

damit 92 %. Das in ethanolischer Lösung eingesetzte *m*THPC besaß bei einer Konzentration von 2 µM ebenfalls eine geringe Dunkeltoxizität. Auch die photodynamische Wirkung war mit derjenigen der beladenen Partikel bei gleicher Farbstoffkonzentration vergleichbar. Dieses Resultat war nicht mit den von Schwiertz *et al.* gefundenen Ergebnissen vergleichbar. In der Arbeit von Schwiertz *et al.* wurde von Dunkeltoxizitäten zwischen 40 % und 60 % berichtet. Die resultierende Zellvitalität nach erfolgter Bestrahlung lag stets über 30 %. Dieses Resultat wurde mit der hohen endozytotischen Aufnahme der Partikel durch die Zellen erklärt. Der dadurch entstandene starke Anstieg der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration wurde als Hauptgrund für die hohe Toxizität des Trägersystems genannt.^[106, 208]

Alle Ergebnisse zur phototoxischen Wirkung der CMC-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel gegen HIG-82-, HT29- und J774A.1-Zellen sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Zusammenstellung der in DMEM durchgeführten Zelltests für die CMC-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel für HIG-82-, HT29- und J774A.1-Zellen. Es sind die Zellvitalitäten vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser) aufgeführt.

*Entsprechende Verdünnung des unbeladenen Systems.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / µM	Zellvitalität		Zellvitalität		Zellvitalität	
		HIG-82 / % DT	Laser	HT29 / % DT	Laser	J774A.1 / % DT	Laser
CaP/CMC nGF	0 (2)*	120 ± 5	101 ± 6	98 ± 13	96 ± 11	99 ± 5	93 ± 5
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC nGF	2	120 ± 15	9 ± 2	98 ± 8	87 ± 4	101 ± 2	7 ± 12
<i>m</i> THPC	2	97 ± 8	9 ± 1	100 ± 6	94 ± 10	102 ± 11	8 ± 14

4.3.3.1.3 Diskussion der Bakterientests

Um die photodynamische Wirkung der Partikelsysteme auf eine antibakterielle Anwendung hin zu testen, wurden der Gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* und der Gram-negative Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Prinzipiell unterscheiden sich Gram-positive und Gram-negative Bakterienstämme im Aufbau ihrer Zellmembran (Abbildung 61).

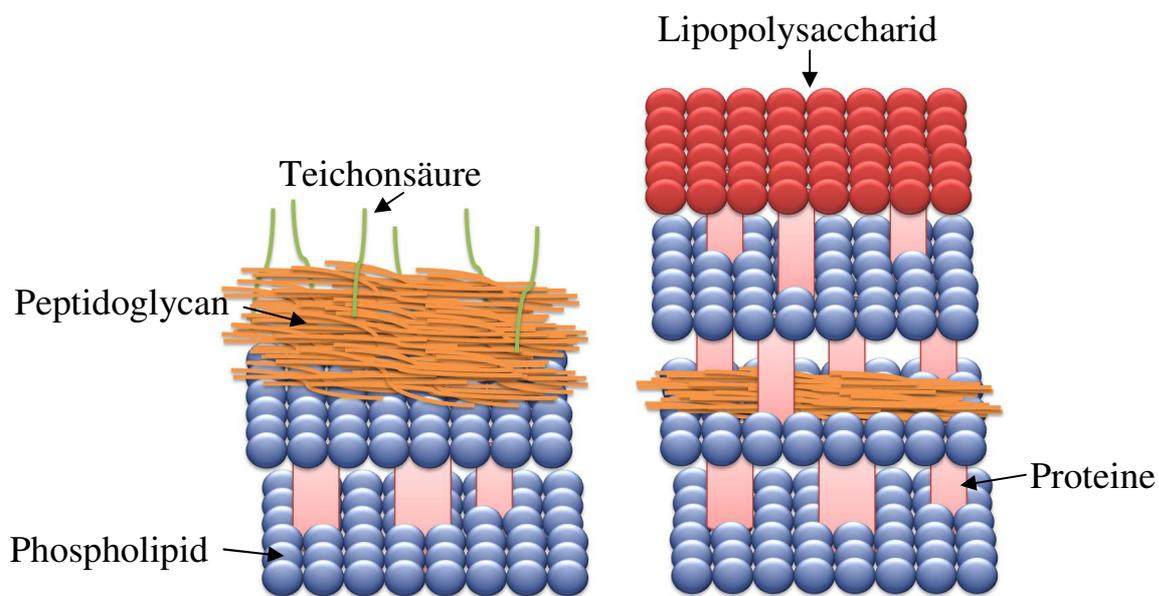


Abbildung 61: Schematischer Aufbau einer Gram-positiven (links) und einer Gram-negativen Bakterienmembran (rechts).

Der in Abbildung 61 dargestellte Vergleich zwischen Gram-positiver (links) und Gram-negativer (rechts) Bakterienmembran lässt den Unterschied deutlich werden. Gram-negative Bakterienstämme weisen eine robustere Struktur und einen wesentlich komplexeren Aufbau der Membran auf. Durch die unterschiedliche Abfolge der Membranschichten weisen solche Bakterienstämme eine hohe Resistenz gegenüber Farbstoffen und auch Photosensibilisatoren auf. Aus diesem Grund ist die Entwicklung geeigneter Vehikel für den Transport von Wirkstoffen durch die Membran von besonderem Interesse. Da die Bakterienmembran durch die Phospholipidschicht eine

Ergebnisse und Diskussion

negative Ladung aufweist, können kationische Trägersysteme die Zellmembran besser durchdringen. Durch diese Vektoren können selbst Wirkstoffe mit anionischem Charakter erfolgreich in Bakterien eingeschleust werden.

Zur Bestimmung der photodynamischen Wirkung der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurden die Dispersion und das in Gegenwart von Lactose lyophilisierte System in PBS untersucht. Zum Vergleich wurde das unbeladene System vor und nach der Lyophilisation bei gleicher Verdünnung untersucht. Die Ergebnisse an dem Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* nach 30-minütiger Inkubation und anschließender Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 652 nm ist in Abbildung 62 dargestellt. Die nach erfolgter Verdünnung eingestellte Farbstoffkonzentration betrug 0,438 μM .

Tabelle 13: Eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der CMC-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne *m*THPC-Beladung vor (Dispersion) und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Lactose (nGF) in PBS. Zur Kontrolle wurde der in Ethanol gelöste Farbstoff untersucht.

Komponente	<i>m</i> THPC-Konzentration / μM	Mit PBS eingestellte <i>m</i> THPC- Konzentrationen / μM
CaP/CMC Dispersion	0	-
CaP/CMC nGF	0	-
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC Dispersion	8,74	0,438
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC nGF	8,74	0,438
<i>m</i> THPC	-	0,530

Die Abbildungen zeigen die logarithmische Darstellung der Kolonie-bildenden Einheiten (*CFU*, *colony forming units*) vor und nach der Bestrahlung. Die

Ergebnisse und Diskussion

dunkelblauen Balken stellen die jeweiligen Werte vor der Bestrahlung dar. Hier sollte für ein gutes Trägersystem eine geringe Toxizität zu verzeichnen sein. So ist gewährleistet, dass die eingesetzten Komponenten keine toxische Wirkung auf die Bakterien haben. Im Gegensatz dazu sollten die logarithmischen Werte der Kolonie-bildenden Einheiten nach erfolgter Bestrahlung möglichst gering sein (hellblaue Balken).

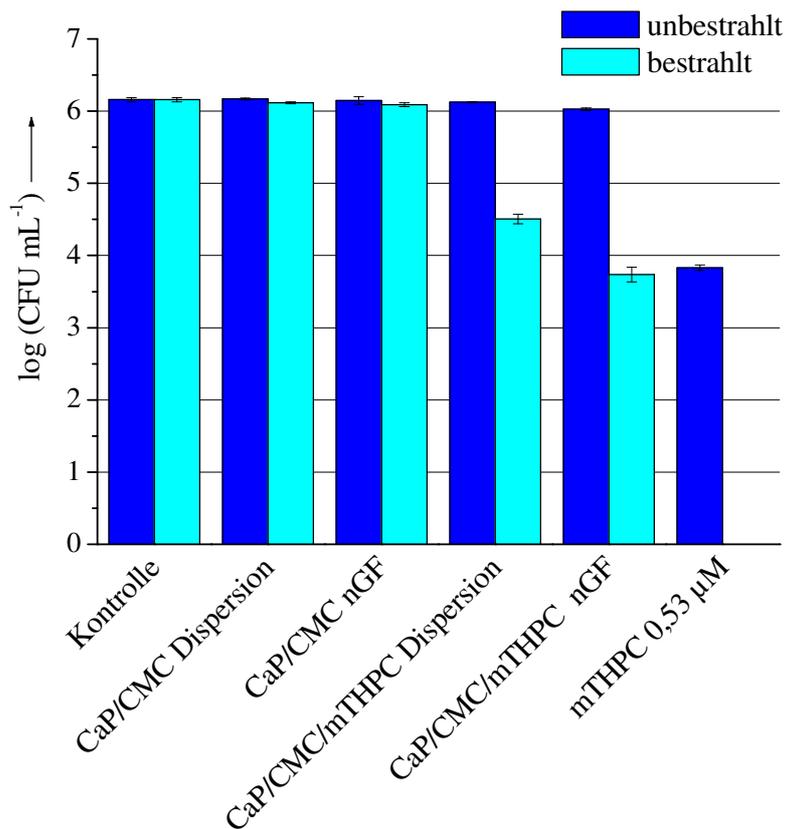


Abbildung 62: Phototoxizitätseigenschaften der CMC-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Lactose bei einer Farbstoffkonzentration von 0,438 µM am Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* in PBS nach 30-minütiger Inkubation. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Bakterien vor und nach der Bestrahlung mit und ohne Partikelzusatz sowie für das in Ethanol gelöste *m*THPC bei einer Konzentration von 0,53 µM aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Das hier eingesetzte Trägersystem ohne Farbstoffbeladung war nicht toxisch. Sowohl die Dispersion als auch das in Gegenwart von Lactose lyophilisierte System zeigten vor und nach der Bestrahlung keinen Effekt auf die Vitalität. Ein dunkeltoxischer Effekt war ebenfalls für die *mTHPC*-beladenen Systeme vor und nach der Lyophilisation auszuschließen. Für die *mTHPC*-beladene Dispersion zeigte sich nach der Laserbehandlung eine Reduktion der Koloniebildenden Einheiten um 1,6 Größenordnungen (von 6,1 nach 4,5). Die daraus resultierende Vitalität lag damit bei etwa 2,2 %. Das Trägersystem war damit sehr effektiv. Für das in Gegenwart von Lactose lyophilisierte System ließ sich ein noch stärkerer Effekt beobachten. Die Reduktion lag in diesem Experiment bei 2,4 Größenordnungen (von 6,1 nach 3,7). Die daraus resultierende Vitalität nach der Bestrahlung lag damit bei 0,4 %. Der Zusatz von Lactose zum Trägersystem beeinflusste damit die Anlagerung des Photosensibilisatorhaltigen Trägersystems auf der Oberfläche der Bakterienmembran. So war eine gesteigerte Diffusion von Singulett-Sauerstoff durch die Membran gewährleistet, was zu einer erhöhten Photoaktivität nach erfolgter Bestrahlung führte. Der in Ethanol gelöste Farbstoff zeigte bei einer Konzentration von 0,53 μM eine ausgeprägte Dunkeltoxizität um 2 Größenordnungen. Nach erfolgter Bestrahlung wurde eine vollständige Bakterienreduktion erzielt. Demnach konnte sich der gelöste Farbstoff in molekularer Form besser an der Bakterienmembran anlagern und somit eine höhere photodynamische Wirkung als der auf den Nanopartikeln immobilisierte Farbstoff erzielen. Schwiertz *et al.* konnten beim gleichen Partikelsystem und vergleichbarer Farbstoffkonzentration mit *mTHPP* als Photosensibilisator lediglich eine phototoxische Wirkung von 70 % in PBS beobachten.^[106, 208]

Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die photodynamische Wirksamkeit der *mTHPC*-haltigen Dispersionen zu untersuchen, wurde das gleiche Experiment mit 90-minütiger Inkubation wiederholt (Tabelle 14).

Ergebnisse und Diskussion

Aus Tabelle 14 geht hervor, dass das hier eingesetzte Trägersystem ohne Farbstoffbeladung nach 90 min Inkubation keine toxische Wirkung auf den Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* vor und nach der Bestrahlung hatte. Für die *m*THPC-haltige Dispersion ließ sich ebenfalls kein dunkeltoxischer Effekt beobachten. Nach erfolgter Bestrahlung war eine starke Bakterienreduktion um etwa 3 Größenordnungen (von 6,2 auf 3,1) zu erkennen. Die resultierende Vitalität nach erfolgter Bestrahlung lag damit bei 0,08 % und fiel damit wesentlich stärker aus als nach einer Inkubationszeit von 30 min. Für das in Gegenwart von Lactose lyophilisierte farbstoffhaltige System wurde dieser Effekt weiter verstärkt. Hier war eine vollständige Bakterienreduktion in PBS zu verzeichnen. Dieser starke Effekt wurde aus experimenteller Sicht durch die relativ hohe Dunkeltoxizität von 95 % (von 6,2 auf 4,9) gemindert. Möglicherweise führte die Anwesenheit von Lactose zu einer erhöhten Akkumulation des Farbstoffes auf und innerhalb der Bakterien wodurch es in einer Folge zu einer erhöhten Dunkeltoxizität kam. Zusammenfassend ließ sich ein stark stimulierender Einfluss der Inkubationszeit auf die photodynamische Wirksamkeit für das Carboxymethylcellulose-stabilisierte und mit *m*THPC beladene Calciumphosphat-Trägersystem feststellen. Die Anwesenheit von Lactose verstärkte diesen Effekt weiter. Der in Ethanol gelöste Farbstoff zeigte bei einer Konzentration von 0,53 μ M ebenfalls eine starke Dunkeltoxizität. Der dunkeltoxische Effekt war mit dem in Gegenwart von Lactose lyophilisierten System vergleichbar. Nach erfolgter Bestrahlung wurde auch für den gelösten Farbstoff eine vollständige Bakterienreduktion erzielt. Diese Wirkung war mit dem auf nanopartikulärer Basis vorgestellten System nach 90-minütiger Inkubation vergleichbar.

Für die Phototoxizitätsstudien am Gram-negativen Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* wurde das hier eingesetzte System bei gleicher

Farbstoffkonzentration (0,438 μM) in PBS untersucht. Auch hier wurde die Inkubationszeit von 30 und 90 Minuten variiert.

Aus Tabelle 14 lässt sich keine signifikante Toxizität nach 90 Minuten ablesen. Selbst das in Gegenwart von Lactose lyophilisierte System, welches gegenüber dem Gram-positiven Stamm eine quantitative Bakterienreduktion verzeichnete, zeigte hier keine Wirkung. Dieser Effekt wurde von Schwiertz *et al.* ebenfalls beobachtet. Mit einem vergleichbaren Partikelsystem konnte mit *mTHPP* keine photodynamische Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa* erzielt werden.^[106, 208] Ein Grund dafür lag wie in Abbildung 61 schon beschrieben im wesentlich komplexeren und robusteren Aufbau der Bakterienmembran von Gram-negativen Spezies. Somit lieferte das hier eingesetzte System keine sinnvolle Ergänzung, um Gram-negative Bakterienstämme abzutöten. Bei einer Farbstoffkonzentration von 0,53 μM zeigte der in Ethanol gelöste Farbstoff ebenfalls keine photodynamische Wirkung. In allen antibakteriellen Untersuchungen führte der Zusatz von 10%igem Pferdeserum zu einer vollständigen Reduktion der phototoxischen Wirkung. Der Zusatz des Pferdeserums führte möglicherweise durch die Anwesenheit unterschiedlicher Elektrolyte und Proteine zur Agglomeration der Partikel und zum Verlust der phototoxischen Wirkung.^[106]

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 14: Zusammenstellung der in PBS durchgeführten Bakterientests für die CMC-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel für *S. aureus* und *P. aeruginosa*. Es ist jeweils die logarithmierte Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser) für unterschiedliche Inkubationszeiten (*t*) aufgeführt.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / μM	<i>t</i> / min	$\log(\text{CFU mL}^{-1})$ <i>S. aureus</i>		$\log(\text{CFU mL}^{-1})$ <i>P. aeruginosa</i>	
			DT	Laser	DT	Laser
Kontrolle	-	30	6,16 ± 0,03	-	6,07 ± 0,02	-
	-	90	6,18 ± 0,01	-	6,04 ± 0,04	-
CaP/CMC Dispersion	0	30	6,17 ± 0,01	6,11 ± 0,01	6,09 ± 0,04	6,11 ± 0,01
	0	90	6,17 ± 0,01	6,13 ± 0,05	6,03 ± 0,01	6,01 ± 0,01
CaP/CMC nGF	0	30	6,14 ± 0,05	6,09 ± 0,02	6,07 ± 0,03	6,06 ± 0,01
	0	90	6,14 ± 0,05	6,13 ± 0,01	6,08 ± 0,04	6,06 ± 0,02
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC Dispersion	0,438	30	6,12 ± 0,01	4,50 ± 0,07	6,04 ± 0,01	5,77 ± 0,02
	0,438	90	6,14 ± 0,03	3,08 ± 0,07	5,99 ± 0,02	5,95 ± 0,02
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC nGF	0,438	30	6,03 ± 0,02	3,74 ± 0,10	6,05 ± 0,01	5,94 ± 0,03
	0,438	90	4,86 ± 0,67	0 ± 0	6,07 ± 0,01	5,88 ± 0,01
<i>m</i> THPC	0,530	30	3,83 ± 0,04	0 ± 0	6,13 ± 0,02	6,06 ± 0,01
	0,530	90	4,39 ± 0,48	0 ± 0	6,16 ± 0,02	6,06 ± 0,01

4.3.3.2 Herstellung und Untersuchung der phototoxischen Wirkung von Carboxymethylcellulose-funktionalisierten, mit *m*THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln

4.3.3.2.1 Herstellung und Charakterisierung

In der Literatur wird der Einsatz von Polyethylenimin als Transfektionssystem beschrieben.^[211] Durch den kationischen Charakter werden anionische Wirkstoffe wie Nukleinsäuren oder Photosensibilisatoren komplexiert. Durch den sogenannten *proton-sponge*-Effekt können solche Wirkstoffe mit hoher Effizienz durch Biomembranen geschleust werden. Weiter kann dieses kationische Polymer zur Umladung negativ geladener Partikel dienen. So ist die Umladung von Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPP beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln nach dem *layer-by-layer*-Verfahren etabliert.^[106, 208] Zur Umladung der in Kapitel 4.3.3.1.1 diskutierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden 20 mL der verdünnten Stammdispersion mit 2,5 mL einer Polyethylenimin-Lösung versetzt und für 30 min schwach gerührt. Die Entfernung des überschüssigen Polymers erfolgte mittels Ultrazentrifugation für 30 min bei 66000 g und anschließendem Redispergieren. Das Schema zur Umladung der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel mit Polyethylenimin ist in Abbildung 63 dargestellt.

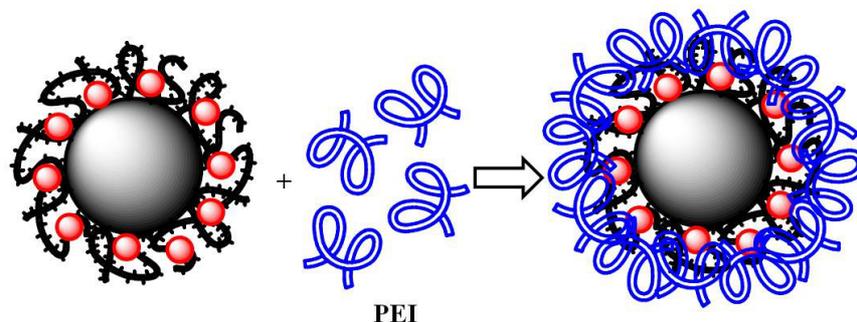


Abbildung 63: Schematische Darstellung der Umladung von CMC-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln mit PEI (blaue Schleifen).

Bei einer erfolgreichen Umladung der Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel mit Polyethylenimin muss das Zetapotential vom negativen in den positiven Bereich wechseln. Die nach der Umladung mit Polyethylenimin ermittelte Größenverteilung ist in Abbildung 64 dargestellt. Als Vergleich ist die Größenverteilung nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose und anschließender Wasseraufnahme dargestellt.

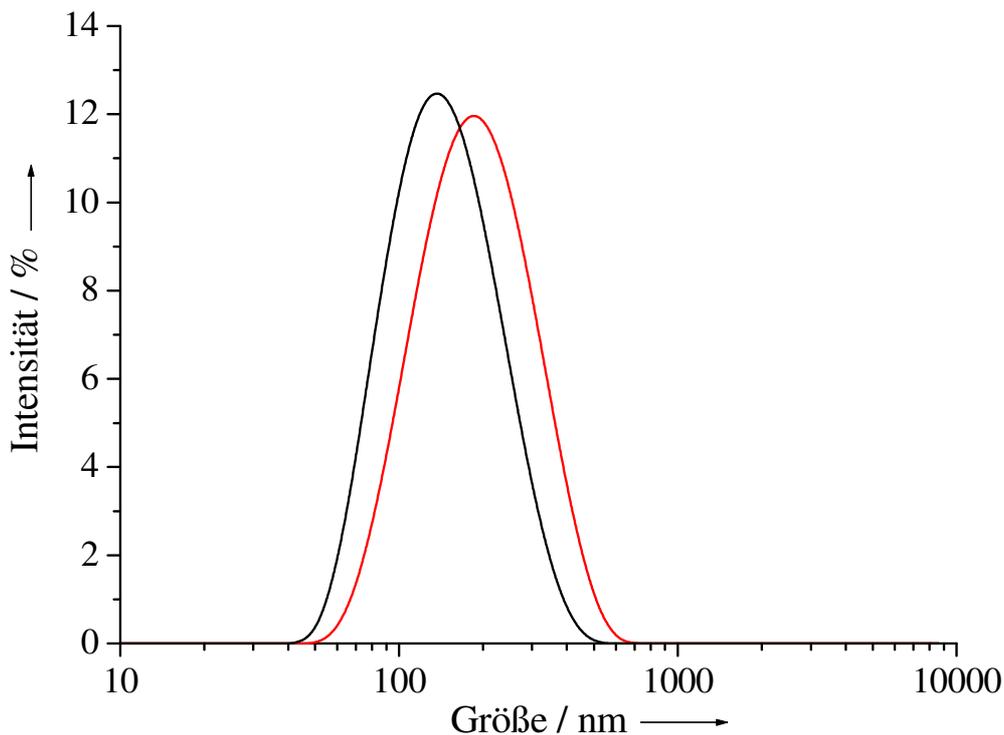


Abbildung 64: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilung der CMC-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel (schwarze Verteilung). Als Vergleich ist das Ergebnis der in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Dispersion dargestellt (rote Verteilung).

Die in Abbildung 64 dargestellten Größenverteilungen zeigten einen monodispersen Charakter ohne Agglomerate. Bei der aufgereinigten Dispersion wurde ein hydrodynamischer Radius von 131 nm erzielt. Der zugehörige

Polydispersitätsindex, der ein Maß für die Qualität der Dispersion darstellt, lag hier bei 0,165. Das Zetapotential besaß einen Wert von +23 mV und bestätigte die erfolgreiche Umladung durch Polyethylenimin nach dem *layer-by-layer*-Verfahren. Durch den zusätzlich sterischen Anspruch des Polyethylenimins waren die Partikel ausreichend stabilisiert. Das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte System lieferte einen hydrodynamischen Durchmesser von 160 nm und war damit um etwa 30 nm größer. Dieser Größenzuwachs könnte durch die Ausbildung der Zuckermatrix erklärt werden, in welcher die Nanopartikel eingebettet vorlagen. Durch die im Lyophilisationsprozess eintretende Vernetzung könnte ein Verkleben der Nanopartikel in der sich ausbildenden Matrix vorkommen. Der daraus resultierende Verlust an kolloidaler Stabilität spiegelt sich daher in einer Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers wieder.

Zur weiteren Charakterisierung wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 65 dargestellt.

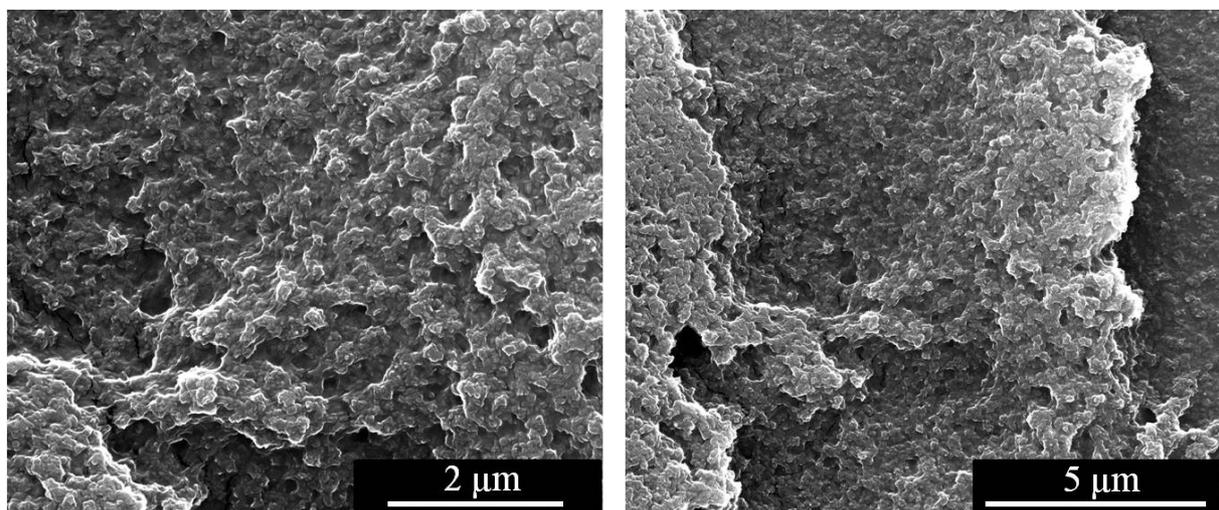


Abbildung 65: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der CMC-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die in Abbildung 65 dargestellten rasterelektronenmikroskopischen Bilder der aufgereinigten Dispersion vor der Lyophilisation zeigen Partikel, die in einem Polymerfilm verklebt vorliegen. Das hier eingesetzte Polymer lag somit trotz der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation im Überschuss vor. Der adsorbierte Farbstoffanteil an den Partikeln wurde UV-Vis-spektroskopisch quantifiziert. Das Absorptionsspektrum der Carboxymethylcellulose-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel ist in Abbildung 66 dargestellt.

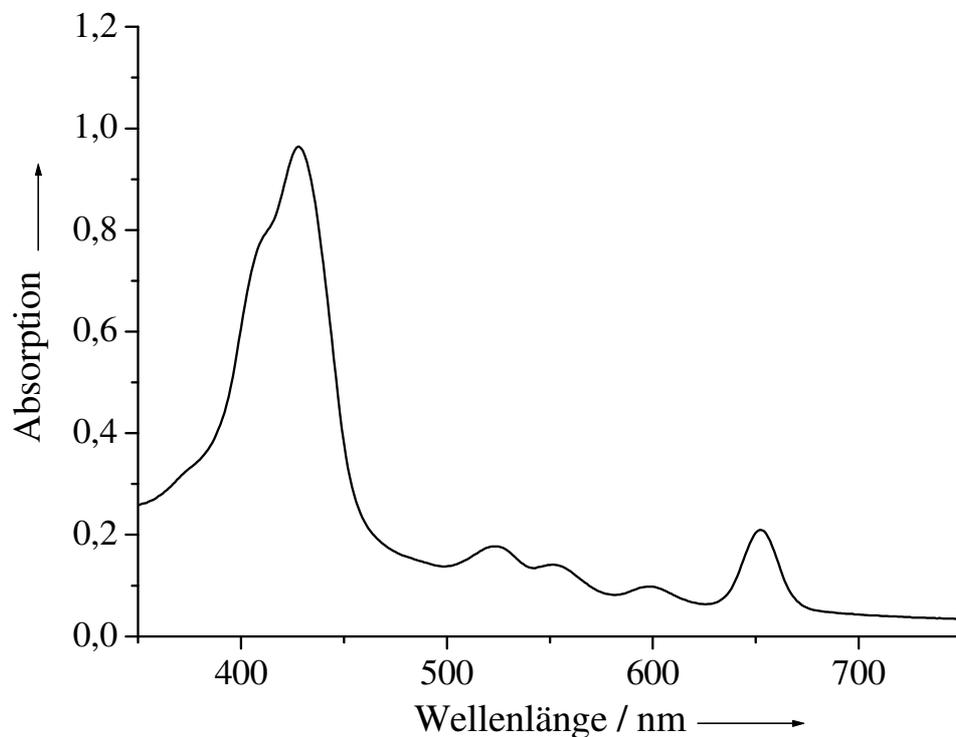


Abbildung 66: UV-Vis-Spektrum der CMC-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die aus Abbildung 66 ermittelte Farbstoffkonzentration der Dispersion lag bei 8,26 μM . Auch hier ließ sich die Verbreiterung der B-Bande auf ein erhöhtes Agglomerationsverhalten des Farbstoffes in den Polymerschleifen zurückführen.^[170]

Ergebnisse und Diskussion

Zur weiteren Charakterisierung wurde vom abzentrifugierten und getrockneten Feststoff eine thermogravimetrische Analyse angefertigt.

Die erhaltenen Thermogramme für die Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne Farbstoffbeladung sind in Abbildung 67 dargestellt. Die eingewogene Menge der jeweiligen Systeme betrug 20,7 mg für die Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit Polyethylenimin umgeladenen Partikel und 17,1 mg für die Carboxymethylcellulose-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Partikel.

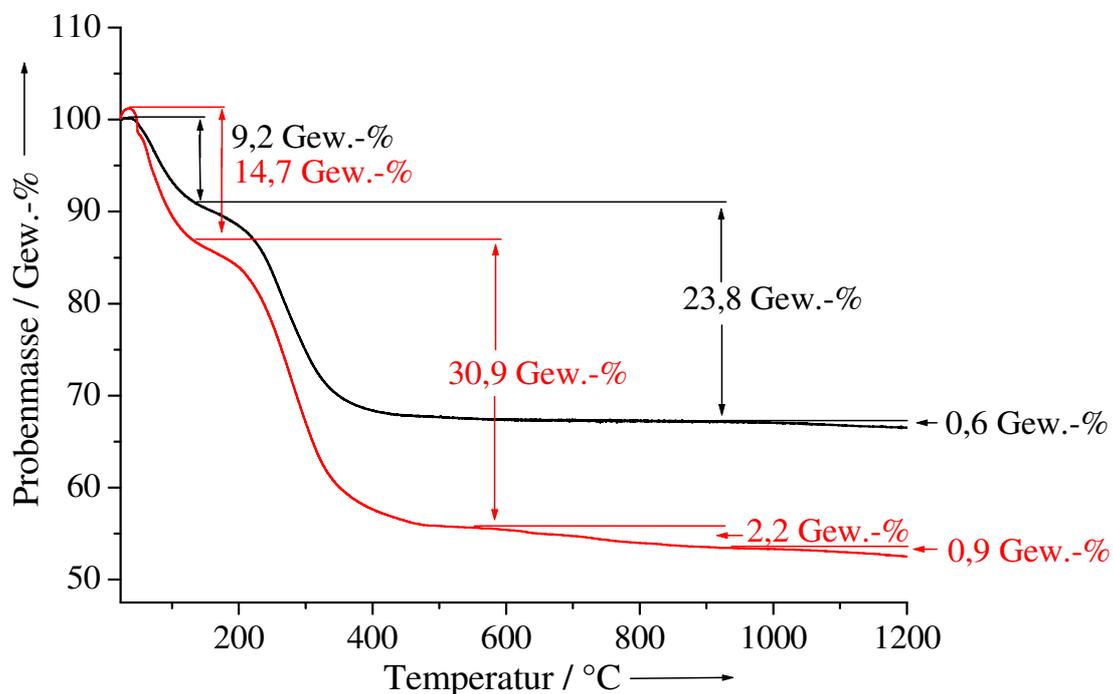


Abbildung 67: Thermogramme der CMC-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel (rot). Als Vergleich ist das Partikelsystem ohne Farbstoffbeladung dargestellt (schwarz). Durchgeführt unter Sauerstoffatmosphäre (50 mL min^{-1}) mit einer Heizrate von 1 K min^{-1} .

Im Thermogramm lässt sich im Temperaturbereich um 100 °C die thermische Desorption von Wasser erkennen. Hier besaßen die mit Farbstoff beladenen Partikel mit $14,7 \text{ Gew.-%}$ einen höheren Wasseranteil als die Partikel ohne

Farbstoffbeladung (9,2 Gew.-%). Im Temperaturbereich von 200 °C bis 1000 °C kam es zur Oxidation der organischen Bestandteile (Carboxymethylcellulose, Polyethylenimin und *m*THPC). Bei den unbeladenen Partikeln erfolgte die Verbrennung in einer Stufe (23,8 Gew.-%). Die mit *m*THPC beladenen Partikel zeigten zwei Zersetzungsstufen. Die erste Stufe lag im Temperaturbereich von 200 °C bis 500 °C (30,9 Gew.-%) und die zweite von 500 °C bis 900 °C (2,2 Gew.-%). Erwartungsgemäß zeigten die mit Farbstoff beladenen Partikel mit 33,1 Gew.-% einen um 9,3 Gew.-% höheren Massenverlust durch Verbrennung als die unmodifizierten Partikel (23,8 Gew.-%). Diese Differenz resultierte aus dem adsorbierten Farbstoffanteil. Die Differenz der durch die Elementaranalyse ermittelten Stickstoffanteile für das unbeladene und für das mit *m*THPC beladene System lieferte einen Wert von 0,56 Gew.-%. Der daraus berechnete Anteil an *m*THPC lag nach Gleichung (16) bei einem Wert von etwa 6,8 Gew.-%. Die Differenz zu dem mittels Thermogravimetrie ermittelten organischen Anteil (9,3 Gew.-%) lag damit bei 2,5 Gew.-%. Für den mittels Gravimetrie und UV-Vis-Spektroskopie bestimmten *m*THPC-Gehalt ließ sich nach Gleichung (17) und (18) ein Wert von 16,5 Gew.-% berechnen. Dieser Wert war weitaus größer als diejenigen die mittels Thermogravimetrie und Elementaranalyse bestimmt wurden. Diese Abweichung lag im Bereich des Messfehlers und könnte durch die gravimetrisch bestimmte Ausbeute erklärt werden.

Im Temperaturbereich von 1000 °C bis 1200 °C kam es zur thermischen Abspaltung von Kohlenstoffdioxid aus dem carbonathaltigen Calciumphosphat-Gitter. Für die unbeladenen Partikel lag dieser Anteil bei 0,6 Gew.-%, während für die mit *m*THPC beladenen Partikel Werte von 0,9 Gew.-% ermittelt wurden. Die Ergebnisse der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Elementaranalytische und thermogravimetrische Daten für die CMC-stabilisierten und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne *m*THPC-Beladung.

Komponente	CaP/CMC/PEI	CaP/CMC/<i>m</i>THPC/PEI
Ca ²⁺ (AAS) / Gew.-%	24,28	21,06
PO ₄ ³⁻ (UV) / Gew.-%	31,05	29,35
C / Gew.-%	12,17	16,51
H / Gew.-%	3,90	3,78
N / Gew.-%	3,35	3,91
Mineralgehalt / Gew.-% (TG)	67,0	52,2
Molares Ca/P-Verhältnis	1,86	1,70
Organischer Anteil / Gew.-% (TG)	23,8	33,1
Carbonatgehalt / Gew.-% (TG)	0,8	1,2
Wassergehalt /Gew.-% (TG)	9,2	14,7
<i>m</i> THPC-Gehalt (UV) / Gew.-%	-	16,5

4.3.3.2.2 Diskussion der Zelltests

Für die Zelltests wurde ausschließlich das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material verwendet. Neben den in Kapitel 4.3.3.1.2 aufgeführten HT29- wurden auch L929-Zellen untersucht. Zum Vergleich wurden die Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne *m*THPC-Beladung sowie der in Ethanol gelöste Farbstoff bei gleicher Konzentration untersucht. Alle Systeme wurden mit DMEM auf eine Endkonzentration von 2 μM und 4 μM eingestellt. Die unbeladene Calciumphosphat-Dispersion wurde entsprechend verdünnt.

Tabelle 16: Eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der CMC-stabilisierten und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose mit und ohne *m*THPC-Beladung sowie der in Ethanol gelöste Farbstoff nach erfolgter Verdünnung mit DMEM.

Komponente	<i>m</i>THPC-Konzentration / μM	Mit DMEM eingestellte <i>m</i>THPC-Konzentrationen / μM
CaP/CMC/PEI nGF	0	-
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC/PEI nGF	8,26	2; 4
<i>m</i> THPC	-	2; 4

Die Systeme wurden nach 24 h Inkubation mit einem Laser der Wellenlänge von 652 nm (50 J cm^{-2}) bestrahlt. Die Ergebnisse für die HT29- und die L929-Zellen sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 17: Zusammenstellung der in DMEM durchgeführten Zelltests für die CMC-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel für HT29- und L929-Zellen. Zum Vergleich sind die Ergebnisse des Farbstoffes in ethanolischer Lösung dargestellt. Es sind die Zellvitalitäten vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser, 50 J cm⁻²) aufgeführt. *Entsprechende Verdünnung des unbeladenen Systems.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / μM	Zellvitalität HT29 / %		Zellvitalität L929 / %	
		DT	Laser	DT	Laser
CaP/CMC/PEI nGF	0 (2)*	39 ± 17	33 ± 13	15 ± 16	17 ± 16
	0 (4)*	13 ± 10	10 ± 10	15 ± 9	16 ± 10
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC/PEI nGF	2	35 ± 11	11 ± 14	13 ± 4	12 ± 7
	4	12 ± 20	9 ± 9	13 ± 10	13 ± 9
<i>m</i> THPC	2	100 ± 6	94 ± 10	97 ± 4	14 ± 11
	4	102 ± 8	54 ± 10	18 ± 18	10 ± 16

Die in Tabelle 17 dargestellten Werte lieferten ein unbefriedigendes Ergebnis. Sowohl das unbeladene als auch das mit *m*THPC beladene Partikelsystem besaßen gegenüber den HT29-Zellen eine sehr große Dunkeltoxizität. Für das verdünnte Partikelsystem mit und ohne Farbstoffbeladung (2 μM) fiel der dunkeltoxische Effekt mit 60 % bis 70 % etwas schwächer aus als für das auf eine *m*THPC-Konzentration von 4 μM eingestellte System (90 %). Dieses Resultat konnte durch die höhere Verdünnung der Stammdispersion und dem daraus geringeren Anteil des Polyethylenimins erklärt werden. Einerseits führte das eingesetzte Polyethylenimin ab einer gewissen Konzentration für Zellen zu einem toxischen Effekt.^[211] Andererseits erklärten Schwiertz *et al.* die erhöhte Zelltoxizität mit der verbesserten Penetration der Calciumphosphat-Nanopartikel in die Zellen aufgrund der positiven Ladung.^[106] Durch die erhöhte

endozytotische Aufnahme kam es innerhalb der Zellen zu einem drastischen Calcium-Ionen-Anstieg und somit zum Zelltod.^[212, 213] Der aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen aus Abbildung 65 ersichtliche trotz Ultrazentrifugation vorhandene Polymerüberschuss festigte die Annahme, dass das Polyethylenimin die Ursache für die hohe Dunkeltoxizität war.

Der in Ethanol gelöste Farbstoff zeigte eine geringe Dunkeltoxizität und erst ab einer Konzentration von 4 μM eine photodynamische Wirkung von etwa 50 % gegenüber den HT29-Zellen. Damit war die photodynamische Wirkung des gelösten Farbstoffes wesentlich höher.

Ein ähnliches Bild zeigte sich für die L929-Zellen. Hier war der dunkeltoxische Charakter des Trägersystems noch stärker ausgeprägt. Die Dunkeltoxizität lag hier zwischen 80 % und 90 % und war unabhängig von der eingestellten Konzentration (2 μM und 4 μM). Dieser Zelltyp reagierte wesentlich empfindlicher auf die hier eingesetzten Partikelsysteme. Auch dies könnte mit dem Einsatz des Polyethylenimins zur Umladung der Partikel erklärt werden. Der hohe Anteil an Polyethylenimin und der daraus resultierende toxische Effekt führten zum Zelltod. Im Gegensatz dazu lieferte der gelöste Farbstoff bei einer Konzentration von 2 μM bei minimaler Dunkeltoxizität eine photodynamische Wirkung von 86 %. Damit zeigte der in Ethanol gelöste Farbstoff eine wesentlich stärkere Photoaktivität gegenüber den L929-Zellen.

4.3.3.2.3 Diskussion der Bakterientests

Die phototoxische Wirkung der mit Carboxymethylcellulose stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurde an *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* getestet. Für die Tests wurden die Dispersion und das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material getestet. Damit konnte ein Einfluss des Zuckerzusatzes auf die photodynamische Wirkung besser herausgearbeitet werden. Die finale Farbstoffkonzentration in der eingesetzten Dispersion war 0,413 μM . Zur Kontrolle wurden die unbeladenen Systeme bei gleicher Verdünnung in PBS untersucht.

Tabelle 18: Eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der CMC-stabilisierten und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne *m*THPC-Beladung in PBS vor (Dispersion) und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose (nGF).

Komponente	<i>m</i> THPC-Konzentration / μM	Mit PBS eingestellte <i>m</i> THPC-Konzentration / μM
CaP/CMC/PEI Dispersion	0	-
CaP/CMC/PEI nGF	0	-
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC/PEI Dispersion	8,26	0,413
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC/PEI nGF	8,26	0,413

Ergebnisse und Diskussion

Die in Abbildung 68 dargestellten Werte in PBS zeigen für das eingesetzte Trägersystem nach 30-minütiger Inkubation in keinem Fall eine dunkeltoxische Wirkung gegenüber dem Bakterienstamm *Staphylococcus aureus*. Weder die unbeladenen Systeme noch das mit *m*THPC beladene Material zeigten in PBS einen dunkeltoxischen Effekt.

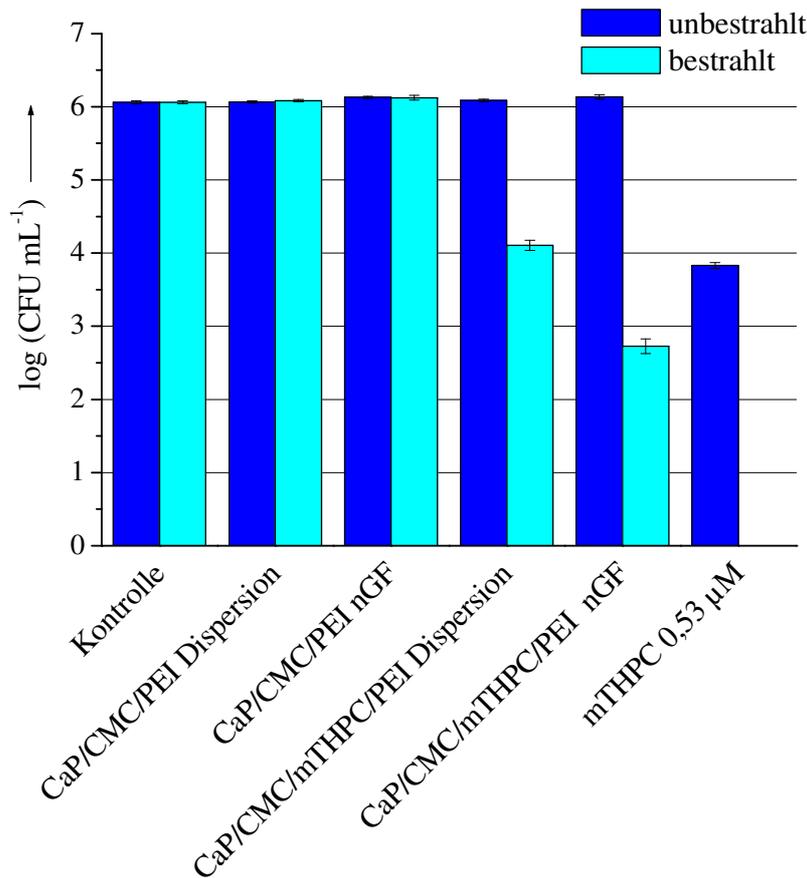


Abbildung 68: Phototoxizitätseigenschaften der CMC-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose bei einer Farbstoffkonzentration von 0,413 µM am Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* in PBS nach 30-minütiger Inkubation. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Bakterien vor und nach der Bestrahlung mit und ohne Partikelzusatz sowie für den in Ethanol gelösten Farbstoff bei einer Konzentration von 0,53 µM aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Nach der Laserbehandlung zeigte sich für die reine Dispersion nach 30-minütiger Inkubation eine Bakterienreduktion um 2 Größenordnungen (von 6,1 nach 4,1). Die Vitalität lag demnach bei etwa 1 % und die photodynamische Wirkung konnte als sehr effektiv betrachtet werden. Eine Steigerung der Phototoxizität wurde für das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material beobachtet. Hier war nach 30-minütiger Inkubation und anschließender Bestrahlung eine Vitalität von 0,05 % (von 6,1 nach 2,7) zu beobachten. So ließ sich auch hier durch den Zusatz eines Kryoprotektors die photodynamische Wirksamkeit des eingesetzten Trägers in PBS erhöhen. Dieser Effekt konnte wie bereits für Lactose beschrieben, mit einer erhöhten Akkumulation des Trägersystems auf der Membran erklärt werden. Somit war eine gesteigerte Diffusion von Singulett-Sauerstoff durch die Membran gewährleistet, was nach erfolgter Bestrahlung zu einer erhöhten Photoaktivität führte.

Schwartz *et al.* untersuchten die antibakterielle Wirksamkeit eines vergleichbaren Partikelsystems mit *mTHPP* als Photosensibilisator. Für das Partikelsystem konnte ebenfalls eine fast quantitative Bakterienreduktion an *Staphylococcus aureus* in PBS beobachtet werden. Dieser Effekt wurde allerdings durch den Zusatz von 10%igem Pferdeserum aufgehoben.^[106, 208]

Nach 90-minütiger Inkubation zeigte das unbeladene Trägersystem wie zuvor keinen dunkeltoxischen Effekt gegenüber dem Bakterienstamm *Staphylococcus aureus*. Für die *mTHPC*-haltige Dispersion ließ sich nach 90-minütiger Inkubation eine phototoxische Wirkung feststellen. Diese photodynamische Wirkung fiel mit einer Vitalität von 12,3 % (von 6,1 nach 5,2) geringer aus als nach 30-minütiger Inkubationszeit. Im Gegensatz dazu lieferte das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte System in PBS eine vollständige Bakterienreduktion nach Bestrahlung. Der hier eingesetzte Kryoprotektor Trehalose sorgte nach der Lyophilisation nicht nur für die Erhaltung des kolloidalen Charakters der Dispersion, sondern steigerte zudem die

Akkumulation des *m*THPC-haltigen Trägersystems auf der Membran, was zu einer erhöhten Photoaktivität führte. Der in Ethanol gelöste Farbstoff zeigte bei einer Konzentration von 0,53 μM sowohl nach 30- als auch nach 90-minütiger Inkubation eine hohe Dunkeltoxizität. Nach erfolgter Bestrahlung wurde eine vollständige Bakterienreduktion beobachtet. Damit besaß das hier vorgestellte Partikelsystem nach 90-minütiger Inkubation eine wesentlich bessere photodynamische Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* als der in Ethanol gelöste Farbstoff.

Im Jahr 2009 untersuchten Engelhardt *et al.* die photodynamische Wirkung einer liposomalen Formulierung mit *m*THPC (Fospeg[®]) auf *Staphylococcus aureus*. In Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer konnte eine Bakterienreduktion um 3 bis 4 Größenordnungen beobachtet werden.^[214] Damit stellt das hier entwickelte System eine Verbesserung gegenüber der Fospeg[®]-Formulierung dar.

Für die Phototoxizitätsstudien am Gram-negativen Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* wurde das hier eingesetzte System in PBS bei gleicher Farbstoffkonzentration (0,413 μM) untersucht. Der in Ethanol gelöste Farbstoff zeigte in PBS bei einer Konzentration von 0,53 μM weder nach 30- noch nach 90-minütiger Inkubation eine photodynamische Wirkung gegenüber *Pseudomonas aeruginosa*. Im Vergleich zur Photoaktivität der anionischen Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel war eine Steigerung der photodynamischen Wirksamkeit durch die Umladung mit Polyethylenimin nach 90-minütiger Inkubation zu erkennen (Abbildung 69).

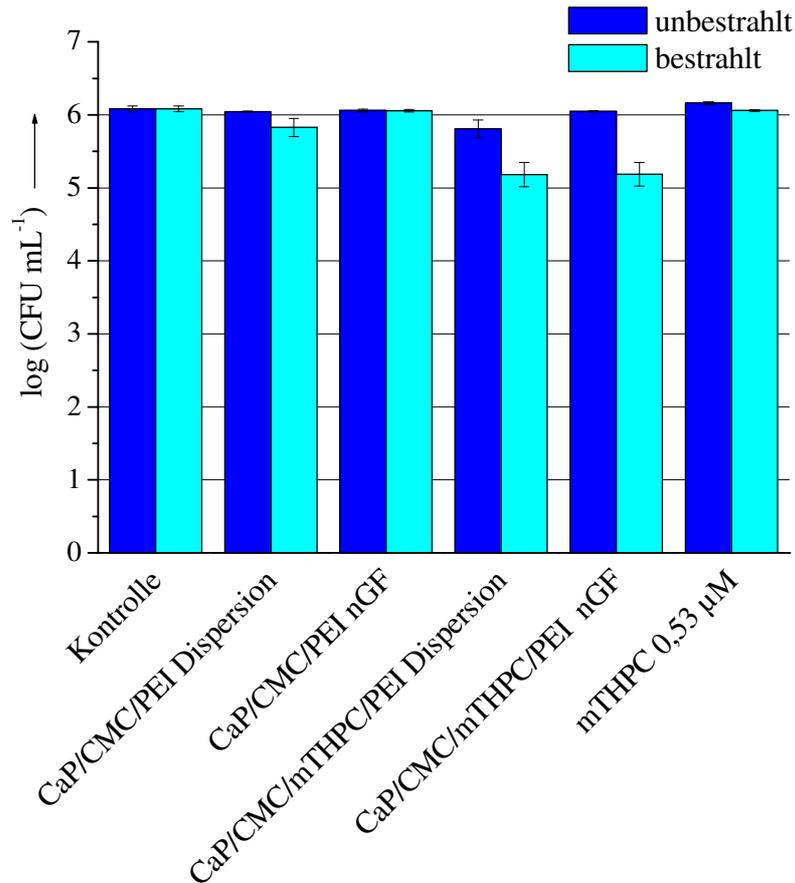


Abbildung 69: Phototoxizitätseigenschaften der CMC-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose bei einer Farbstoffkonzentration von $0,413 \mu\text{M}$ am Gram-negativen Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* in PBS nach 90-minütiger Inkubation. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Bakterien vor und nach der Bestrahlung mit und ohne Partikelzusatz sowie für den in Ethanol gelösten Farbstoff bei einer Konzentration von $0,53 \mu\text{M}$ aufgeführt.

Diese Phototoxizität galt sowohl für die *m*THPC-haltigen Calciumphosphat-Nanopartikel als auch für die in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Nanopartikel-Dispersion. In beiden Fällen war nach der Laserbehandlung eine Vitalität von 12,6 % zu verzeichnen. Diese Wirkung war effektiver als diejenige ohne Umladung. Dieses Resultat konnte nur mit der Anwendung von

Polyethylenimin und des damit einhergehenden kationischen Charakters des Trägersystems erklärt werden. Die positive Ladung führte aus elektrostatischer Sicht zu einer erhöhten Akkumulation auf der Oberfläche der negativ geladenen Bakterienmembran. Daraus folgte eine erhöhte Diffusion des Singulett-Sauerstoffs durch die Membran, was schließlich zu einer gesteigerten Photoaktivität führte.

Dieser Effekt wurde auch von Schwiertz *et al.* beschrieben. In der Arbeit konnte ebenfalls eine quantitative Bakterienreduktion von *Pseudomonas aeruginosa* in PBS beobachtet werden. Sogar nach dem Zusatz von 10%igem Pferdeserum konnte in der Arbeit von Schwiertz *et al.* nach 90-minütiger Inkubation eine Phototoxizität von etwa 30 % erzielt werden.^[106, 208] Dieses Ergebnis konnte mit dem hier vorgestellten System nicht erreicht werden. Der Zusatz von 10%igem Pferdeserum führte bei allen Versuchen zum vollständigen Verlust der photodynamischen Wirkung.

Im Jahr 2007 untersuchten Garcez *et al.* die antibakterielle Wirkung eines Photosensibilisators auf Porphyrin-Basis, welcher kovalent an Polyethylenimin gebunden wurde. In Abhängigkeit der Laserintensität wurde eine Bakterienreduktion von 1-3 Größenordnungen an *Pseudomonas aeruginosa* in PBS nach erfolgter Bestrahlung erzielt.^[215]

Alle Ergebnisse für *Staphylococcus aureus* als auch für *Pseudomonas aeruginosa* nach 30- und 90-minütiger Inkubation und anschließender Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 652 nm sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 19: Zusammenstellung der Bakterientests für die CMC-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit PEI umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel für *S. aureus* und *P. aeruginosa*. Es ist jeweils die logarithmierte Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU mL⁻¹) vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser) für unterschiedliche Inkubationszeiten (*t*) in PBS aufgeführt.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / μM	<i>t</i> / min	log (CFU mL ⁻¹) <i>S. aureus</i>		log (CFU mL ⁻¹) <i>P. aeruginosa</i>	
			DT	Laser	DT	Laser
Kontrolle	-	30	6,06 ± 0,02	-	6,02 ± 0,02	-
	-	90	6,09 ± 0,02	-	6,08 ± 0,04	-
CaP/CMC/PEI Dispersion	0	30	6,07 ± 0,01	6,08 ± 0,01	6,04 ± 0,02	5,30 ± 0,01
	0	90	6,06 ± 0,01	6,10 ± 0,01	6,05 ± 0,01	5,83 ± 0,12
CaP/CMC/PEI nGF	0	30	6,13 ± 0,02	6,12 ± 0,03	6,07 ± 0,02	6,06 ± 0,01
	0	90	6,11 ± 0,01	6,14 ± 0,02	6,06 ± 0,02	6,06 ± 0,02
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC/ PEI Dispersion	0,413	30	6,09 ± 0,02	4,11 ± 0,07	5,21 ± 0,26	4,60 ± 0,30
	0,413	90	6,10 ± 0,03	5,18 ± 0,02	5,81 ± 0,12	5,18 ± 0,17
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC/ PEI nGF	0,413	30	6,13 ± 0,03	2,73 ± 0,10	6,05 ± 0,02	6,05 ± 0,01
	0,413	90	6,12 ± 0,01	0 ± 0	6,05 ± 0,01	5,18 ± 0,16
<i>m</i> THPC	0,530	30	3,83 ± 0,04	0 ± 0	6,13 ± 0,02	6,06 ± 0,01
	0,530	90	4,39 ± 0,48	0 ± 0	6,16 ± 0,02	6,06 ± 0,01

4.3.3.3 Herstellung und Untersuchung der phototoxischen Wirkung von Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln

4.3.3.3.1 Herstellung und Charakterisierung

Shkilnyy *et al.* nutzten 2008 Polyethylenimin als Templat zur Darstellung von Calciumphosphat-Nanopartikeln. Ein Einsatz der erhaltenen Partikel für *in vivo*-Versuche wurde aufgrund des toxischen Charakters von Polyethylenimin allerdings ausgeschlossen.^[216] Die Herstellung Polyethylenimin-stabiler Calciumphosphat-Nanopartikel durch einen kontinuierlichen Fällungsprozess wurde bereits von Urch und Schwiertz beschrieben.^[208, 217, 218] Ein Einsatz der erhaltenen Partikel als Trägersystem für die Photodynamische Therapie wurde in der Arbeit von Schwiertz *et al.* nicht diskutiert.

Damit stellt diese Art von Trägersystem eine ausgezeichnete Ergänzung der bereits bestehenden Ergebnisse dar. Für die nasschemische Fällung wurden eine Calcium- (18 mM) und eine Phosphat-Lösung (10,8 mM) für eine Minute mit einer Pumpgeschwindigkeit von jeweils 5 mL min⁻¹ in eine Wasservorlage von 20 mL gepumpt. Parallel dazu erfolgte die Zudosierung einer Polyethylenimin-Lösung (2 g L⁻¹). Im Falle der Farbstoffbeladung wurde 1 min nach der Fällung 1 mL der *m*THPC-Lösung zugegeben und die Dispersion 15 min schwach gerührt (Abbildung 70).

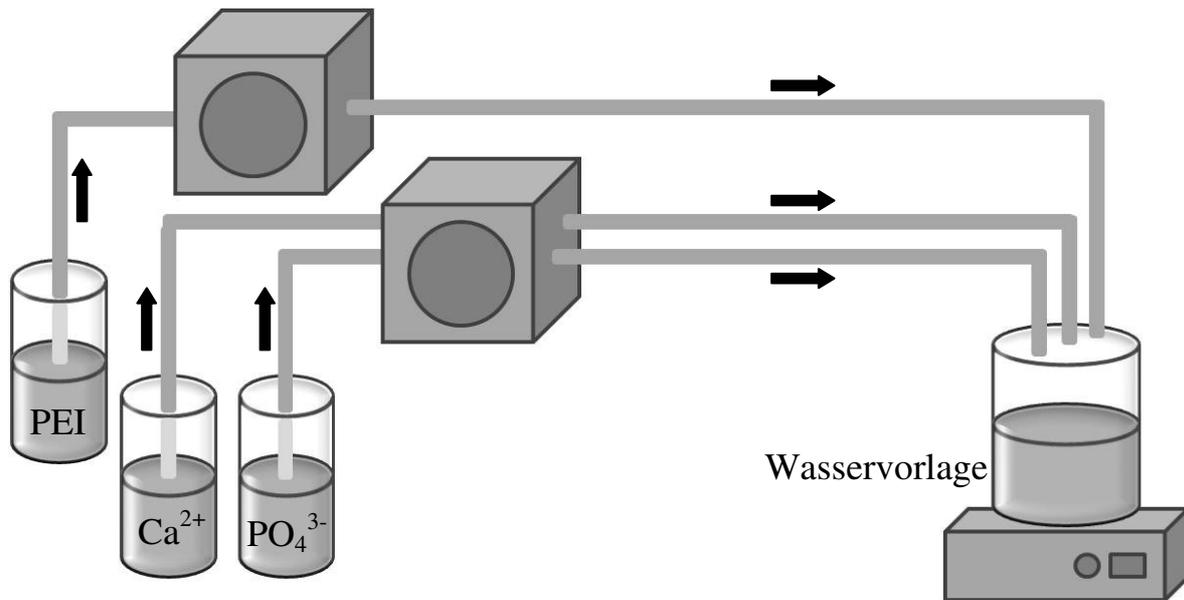


Abbildung 70: Schematischer Aufbau der Fällungsapparatur zur Darstellung PEI-stabiler Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die erhaltene gelbrote Dispersion wurde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert. Nach zwei Tagen erfolgte die Aufreinigung zur Entfernung der überschüssigen Polymerkomponenten und der Gegenionen sowie des nicht adsorbierten Farbstoffanteils mittels Ultrazentrifugation und anschließendem Redispergieren. Die erhaltene Dispersion konnte auf die in Kapitel 4.1.4.2 beschriebene Weise in Gegenwart von Trehalose lyophilisiert werden.

Der hydrodynamische Durchmesser der Dispersion sowie des in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Systems nach erfolgter Redispergierung ist in Abbildung 71 dargestellt.

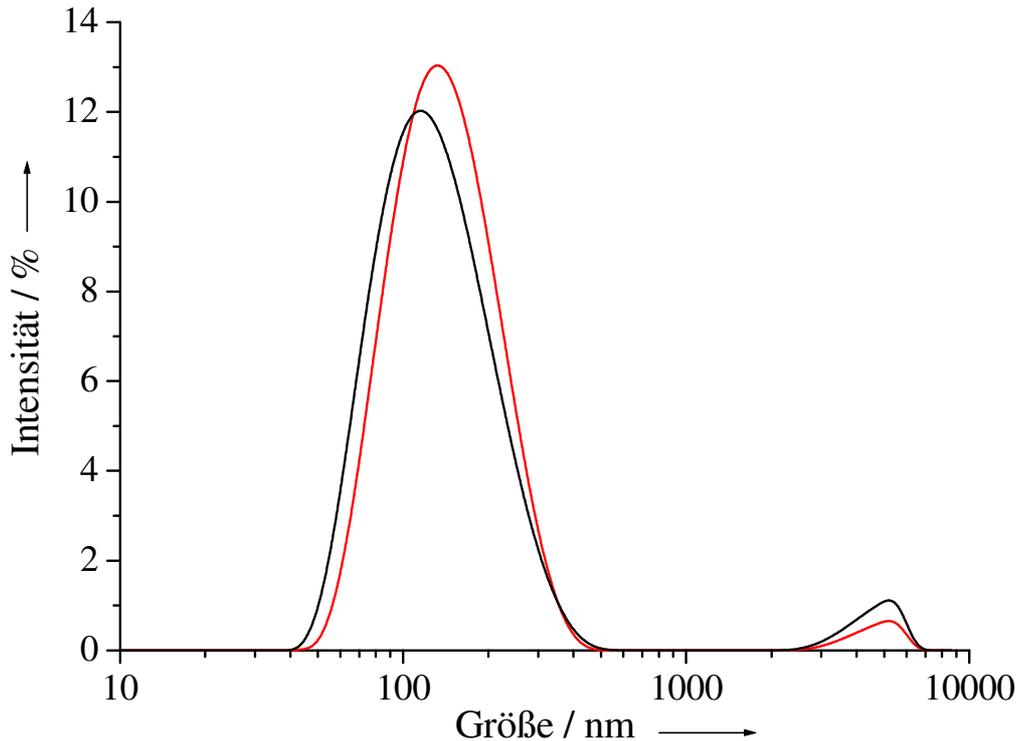


Abbildung 71: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilung der PEI-funktionalisierten und *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation und anschließendem Redispergieren (schwarz). Zum Vergleich ist das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte System nach der Redispersion dargestellt (rot).

Die in Abbildung 71 dargestellte Größenverteilung für die Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel zeigte nach der Aufreinigung einen hydrodynamischen Durchmesser von 138 nm. Der Polydispersitätsindex von 0,235 bestätigte das Vorliegen eines monodispersen Systems. Bei den zusätzlichen Peaks um 5 μm handelte es sich möglicherweise um Agglomerate der Nanopartikel, die durch den Einsatz des Ultraschallprozessors nicht weiter dispergiert werden konnten. Das Zetapotential der aufgereinigten Dispersion besaß einen Wert von +29 mV. Damit war die Dispersion ausreichend elektrostatisch stabilisiert. Eine zusätzlich sterische Stabilisierung wurde durch die voluminösen Polymerschleifen des

Ergebnisse und Diskussion

Polyethylenimins gewährleistet. Für die in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte und wieder redispersierte Probe ließ sich ein leichter Größenzuwachs verzeichnen. Das Maximum des hydrodynamischen Durchmessers lag bei 148 nm und war um 10 nm größer. Der Polydispersitätsindex bestätigte mit einem Wert von 0,197 den monodispersen Charakter der Dispersion. Wie in der Stammdispersion ließ sich auch hier ein Agglomerat bei 5 μm identifizieren. Das Zetapotential lag mit einem Wert von +30 mV im elektrostatisch stabilen Bereich. Zusätzlich sorgte der sterische Anspruch des Polyethylenimins für eine elektrosterisch stabilisierte Dispersion. Zur weiteren Charakterisierung wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel angefertigt (Abbildung 72).

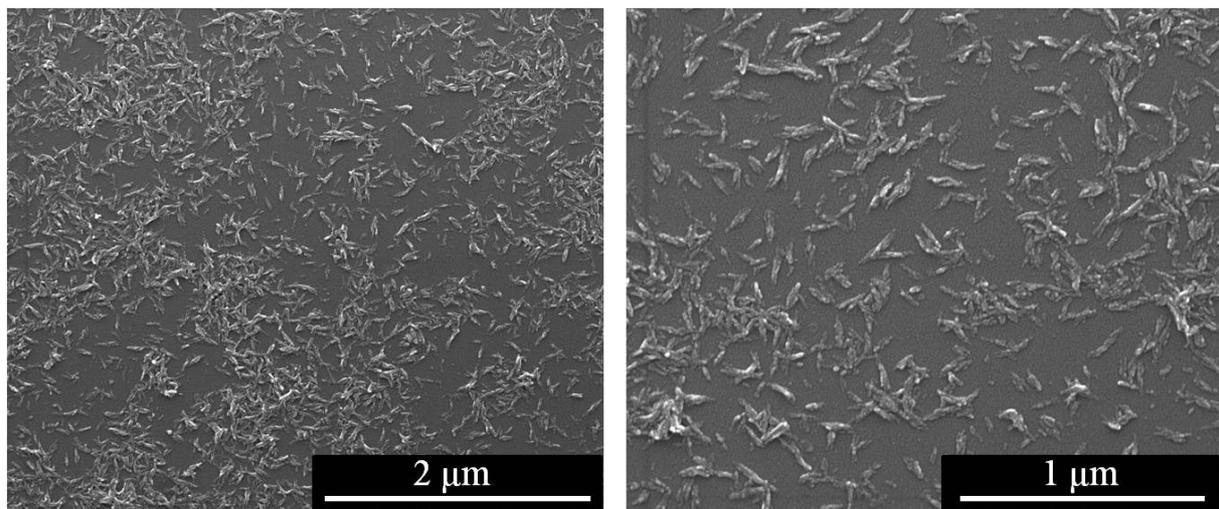


Abbildung 72: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten eine stäbchenförmige Morphologie mit einer Länge von etwa 80 nm bis 100 nm. Dieses Resultat deckte sich sehr gut mit den Ergebnissen aus der Dynamischen Lichtstreuung. Die Breite der

Stäbchen lag bei etwa 10 nm. Für nanokristallinen Hydroxylapatit ist eine solche stäbchenförmige Morphologie bekannt.^[219-223] In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ließ sich keine Vernetzung der Nanopartikel durch überschüssiges Polymer wie in Abbildung 65 für die Carboxymethylcellulose-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel erkennen.

Die Farbstoffquantifizierung erfolgte UV-Vis-spektroskopisch. Das erhaltene Absorptionsspektrum ist in Abbildung 73 dargestellt.

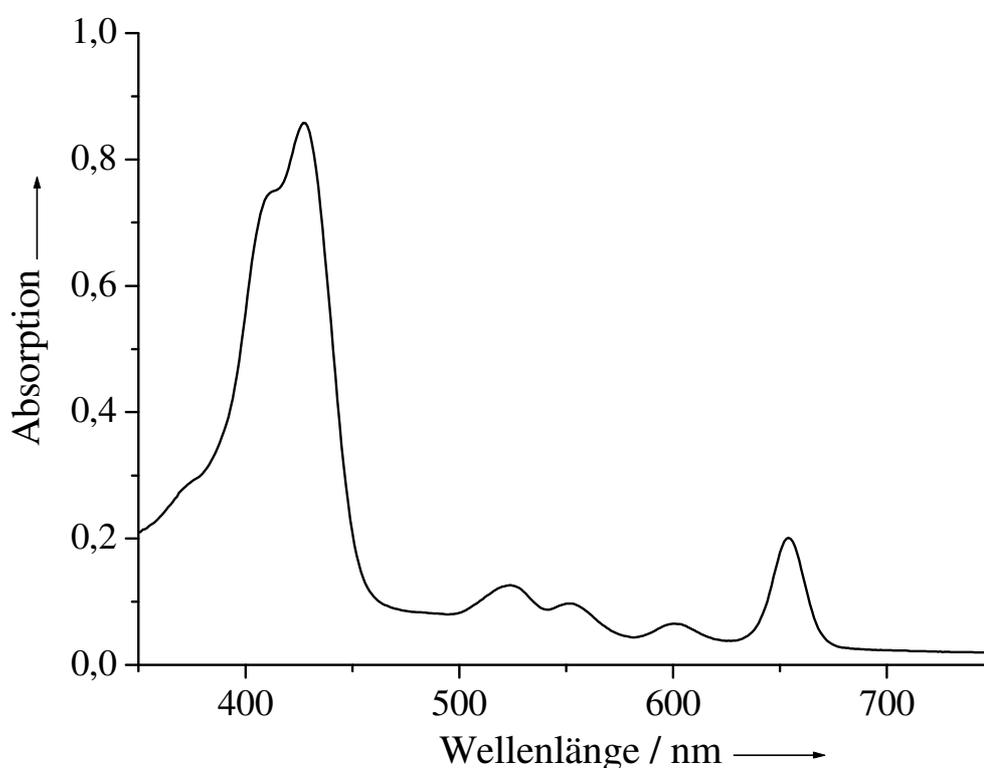


Abbildung 73: UV-Vis-Spektrum der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die aus dem in Abbildung 73 dargestellten Absorptionsspektrum berechnete Farbstoffkonzentration lag bei 7,14 μM . Die Verbreiterung der B-Bande im Vergleich zum freien Farbstoff ließ sich mit der Agglomeration von *m*THPC in den stabilisierenden Polymerschleifen des Polyethylenimins erklären.

Weiter wurden thermogravimetrische Analysen der getrockneten Feststoffe mit und ohne Farbstoffbeladung durchgeführt.

Die eingewogene Menge der jeweiligen Systeme betrug 24,3 mg für die Polyethylenimin-stabilisierten und 17,1 mg für die Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Partikel.

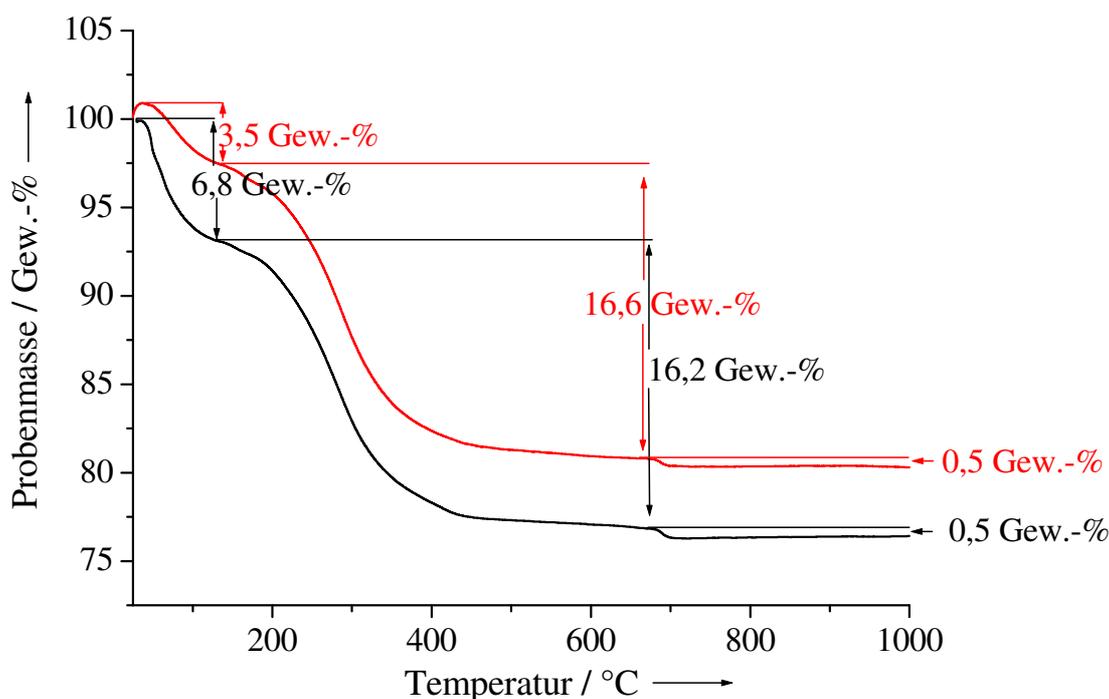


Abbildung 74: Thermogramme der PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit (rot) und ohne (schwarz) *m*THPC-Beladung, durchgeführt unter Sauerstoffatmosphäre (50 mL min^{-1}) und mit einer Heizrate von 1 K min^{-1} .

Die in Abbildung 74 dargestellten Thermogramme zeigen im Temperaturbereich um 100 °C die thermische Desorption von Wasser. Hier besaßen die unbeladenen Calciumphosphat-Nanopartikel mit $6,8 \text{ Gew.-%}$ einen doppelt so großen Wasseranteil wie die mit Farbstoff-beladenen Partikel ($3,5 \text{ Gew.-%}$). Im Temperaturbereich von 200 °C bis 600 °C kam es zum Abbrand der organischen Komponenten (Polyethylenimin und *m*THPC). Hier besaßen die mit Farbstoff beladenen Partikel mit $16,6 \text{ Gew.-%}$ einen um $0,4 \text{ Gew.-%}$ höheren organischen

Anteil als die unbeladenen Partikel. Diese Differenz resultierte aus dem zusätzlich adsorbierten Farbstoffanteil.

Der mittels Gravimetrie und UV-Vis-Spektroskopie bestimmte *m*THPC-Gehalt lag nach Gleichung (17) und (18) für die PEI-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel bei 2,2 Gew.-%. Dieser Wert war weitaus größer und realistischer als derjenige der mittels Thermogravimetrie ermittelt wurde. Demnach lieferte die UV-Vis-spektroskopische Bestimmung des *m*THPC-Gehalts trotz des gravimetrisch erhaltenen Fehlers einen aussagekräftigen Wert.

Im Temperaturbereich zwischen 700 °C und 1000 °C kam es zur thermischen Abspaltung von Kohlenstoffdioxid aus dem carbonathaltigen Calciumphosphat-Gitter (0,5 Gew.-%). Die Ergebnisse der Elementaranalyse und Thermogravimetrie für die Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne Farbstoffbeladung sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 20: Zusammenfassung der mittels Elementaranalyse und Thermogravimetrie erhaltenen Daten für die PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne *m*THPC-Beladung.

Komponente	CaP/PEI	CaP/PEI/ <i>m</i> THPC
Ca ²⁺ (AAS) / Gew.-%	29,39	28,03
PO ₄ ³⁻ (UV) / Gew.-%	44,2	46,1
C / Gew.-%	8,05	8,37
H / Gew.-%	2,27	2,82
N / Gew.-%	4,10	3,79
Mineralgehalt / Gew.-% (TG)	77,0	79,9
Molares Ca/P-Verhältnis	1,58	1,44
Organischer Anteil / Gew.-% (TG)	16,2	16,6
Carbonatgehalt / Gew.-% (TG)	0,7	0,7
Wassergehalt / Gew.-% (TG)	6,8	3,5
<i>m</i> THPC-Gehalt (UV) / Gew.-%	-	2,2

Die Kristallinität der Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurde mittels Röntgenpulverdiffraktometrie bestimmt. Zum Vergleich wurden die Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel ohne Farbstoffbeladung untersucht (Abbildung 75).

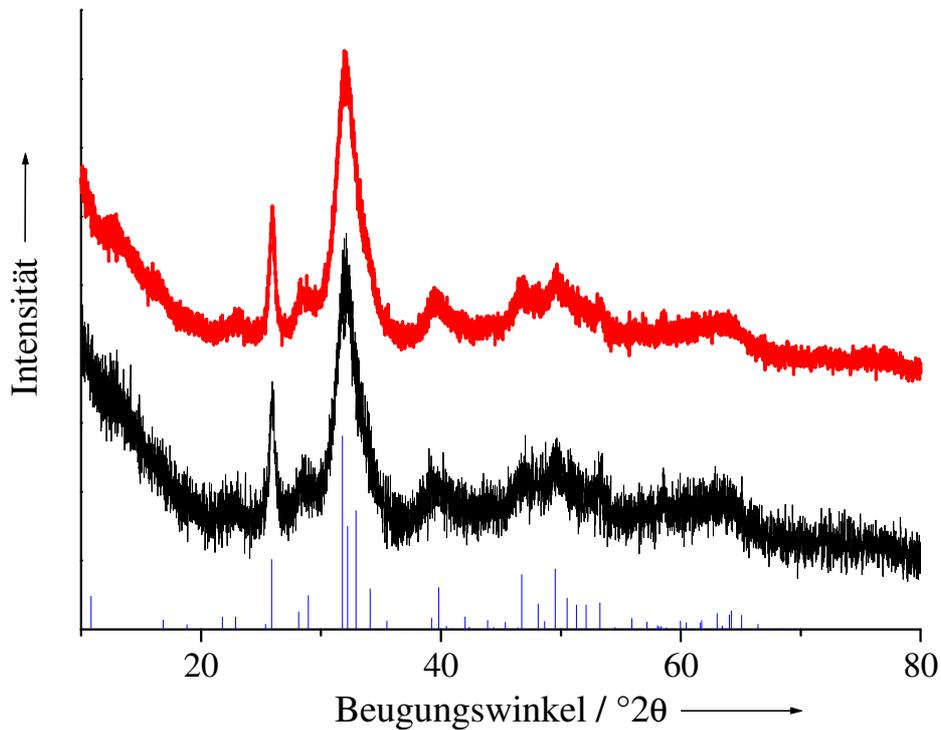


Abbildung 75: Röntgenpulverdiffraktogramme der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel (rot) sowie das unbeladene System (schwarz). Zum Vergleich sind die Literaturreflexe für Hydroxylapatit aus der ICDD-Datenbank (84-1998) aufgeführt.

Die in Abbildung 75 dargestellten Diffraktogramme zeigen stark verbreiterte Reflexe, die auf einen nanokristallinen Charakter der Hydroxylapatit-Phase schließen lassen.

4.3.3.3.2 Diskussion der Zelltests

Für die Zelltests wurde ausschließlich das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material verwendet. Neben den bereits aufgeführten HT29- und den L929-Zellen wurde weiter die Zungenkarzinom-Zelllinie Cal27 untersucht. Zum Vergleich wurden die Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne Farbstoffbeladung sowie der in Ethanol gelöste Farbstoff bei gleicher Konzentration untersucht. Alle Systeme wurden mit DMEM auf eine Endkonzentration von 0,5 μM und 2 μM eingestellt. Die unbeladene Calciumphosphat-Dispersion wurde entsprechend verdünnt.

Tabelle 21: Eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose mit und ohne *m*THPC-Beladung sowie der in Ethanol gelöste Farbstoff nach erfolgter Verdünnung mit DMEM.

Komponente	<i>m</i>THPC-Konzentration / μM	Mit DMEM eingestellte <i>m</i>THPC- Konzentrationen / μM
CaP/PEI nGF	0	-
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC nGF	7,14	0,5; 2
<i>m</i> THPC	-	0,5; 2

Die Systeme wurden nach 24 h Inkubation mit einem Laser der Wellenlänge von 652 nm (50 J cm^{-2}) bestrahlt.

Das in Abbildung 76 angegebene Toxizitätsprofil zeigte für das höher verdünnte System (0,5 μM) ohne *m*THPC-Beladung gegenüber den HT29-Zellen keinen toxischen Effekt vor oder nach der Bestrahlung.

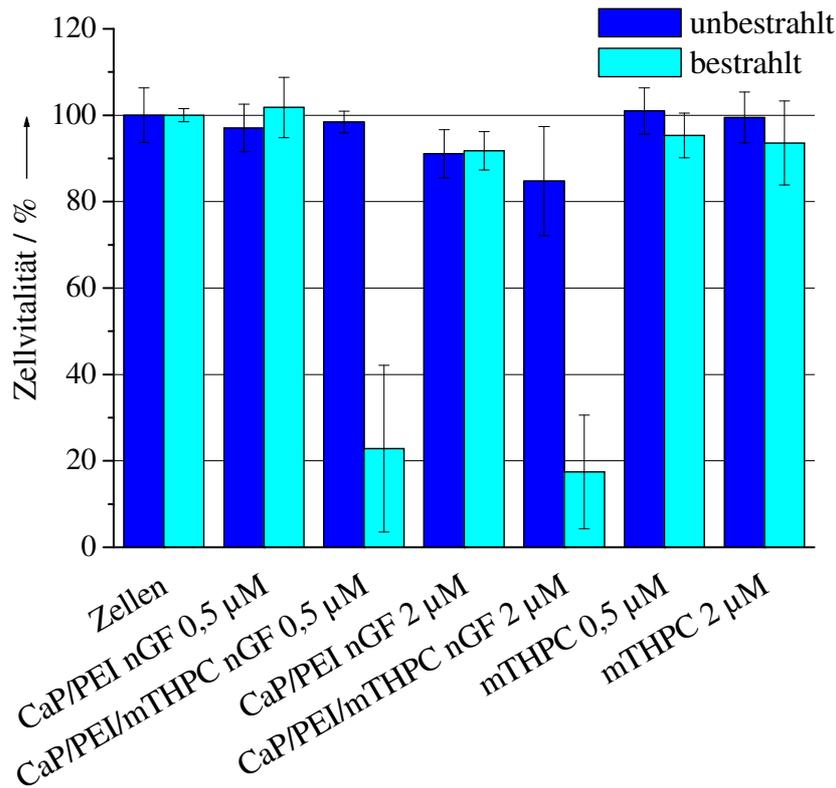


Abbildung 76: Phototoxizitätseigenschaften der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose und des Farbstoffes in ethanolischer Lösung an HT29-Zellen. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Zellen vor und nach der Bestrahlung (50 J cm^{-2}) mit und ohne Partikelzusatz in DMEM aufgeführt.

Der in Kapitel 4.3.3.2.2 diskutierte toxische Polyethylenimin-Anteil fiel für dieses System nach erfolgter Aufreinigung und anschließender Verdünnung geringer aus, wodurch die Zellvitalität nicht beeinträchtigt wurde. Für das mit *m*THPC beladene System zeigte sich ebenfalls keine Dunkeltoxizität. Nach der Laserbehandlung lag die Zellvitalität bei 23 %. Damit wurde eine photodynamische Wirkung von 77 % erzielt. Dieses Resultat war weitaus besser als die Wirkung des in Ethanol gelösten Farbstoffes bei gleicher Konzentration. Hier lag die Phototoxizität bei 6 %. Das auf eine Farbstoffkonzentration von $2 \mu\text{M}$ eingestellte System zeigte im Vergleich dazu eine signifikante

Dunkeltoxizität zwischen 10 % und 15 % gegenüber den HT29-Zellen. Dieser Effekt konnte auf das hier eingesetzte Polyethylenimin zurückgeführt werden. Für das *m*THPC-beladene System mit der eingesetzten Farbstoff-Konzentration von 2 μM zeigte sich eine Phototoxizität nach Bestrahlung von 67 %. Die Photoaktivität war damit etwas schwächer als bei dem System mit der höheren Verdünnung (0,5 μM). Trotzdem war die Effizienz um ein Vielfaches größer als die des Farbstoffes in ethanolischer Lösung bei gleicher Konzentration. Hier war bei minimaler Dunkeltoxizität eine photodynamische Wirkung von nur 6 % zu beobachten. Somit stellt dieses Trägersystem eine deutliche Verbesserung im Vergleich zum freien Farbstoff als auch im Vergleich zu den bereits diskutierten Dispersionen der vorherigen Kapitel dar. Die Kombination aus kationischem Träger, dem daraus resultierenden *proton-sponge*-Effekt der geringen Polymerkonzentration und Trehalose als membrangängiger Spezies stellte somit ein geeignetes Transportsystem für Photosensibilisatoren zur Behandlung von tumorösem Gewebe dar.

Ein vergleichbarer Effekt wurde von Shieh *et al.* gezeigt. Dort wurden mizellare Systeme als Farbstoffspeicher für *m*THPC vorgestellt. Die Mizellen hatten eine durchschnittliche Größe von 80 nm. Die Vitalität der HT29-Zellen lag nach erfolgter Bestrahlung bei etwa 20 %.^[224] Bourdon *et al.* beobachteten mit *m*THPC-haltigen Polymerkapseln eine Phototoxizität an HT29-Zellen von bis zu 70 %.^[225] Peng *et al.* zeigten in ihrer Arbeit Phototoxizitäten von bis zu 90 %, nachdem pH-sensitive Polymernanopartikel mit *m*THPC beladen wurden.^[226]

Weiterhin wurde das hier eingesetzte System an L929-Zellen getestet. Die Bestrahlung erfolgte nach 24 h Inkubation bei 5 J cm⁻² (Abbildung 77).

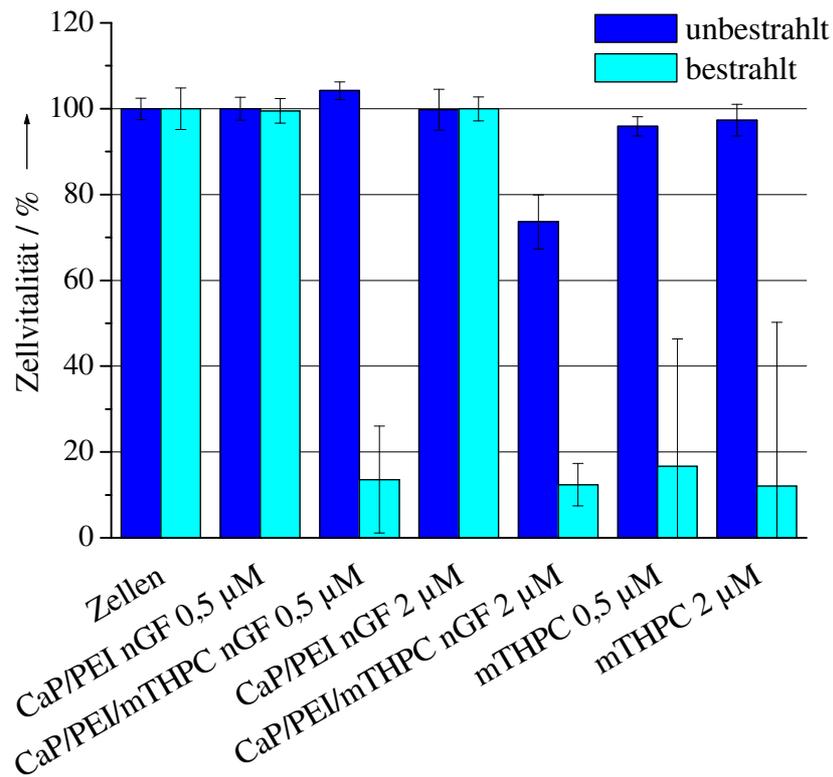


Abbildung 77: Phototoxizitätseigenschaften der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose und des Farbstoffes in ethanolischer Lösung an L929-Zellen. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Zellen vor und nach der Bestrahlung (5 J cm^{-2}) mit und ohne Partikelzusatz in DMEM aufgeführt.

Die *m*THPC-haltige Dispersion zeigte bei einer Farbstoffkonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ bei minimaler Dunkeltoxizität eine photodynamische Wirkung von 86 %. Die Zellvitalität nach erfolgter Bestrahlung lag damit bei 14 %. Somit war dieses System als sehr effektiv einzustufen. Der in Ethanol gelöste Farbstoff ergab bei geringer Dunkeltoxizität eine photodynamische Wirkung von etwa 80 %. Die unbeladene Dispersion zeigte bei gleicher Verdünnung keine toxische Wirkung vor oder nach der Laserbehandlung. Somit war das reine Trägersystem nicht toxisch. Für das höher konzentrierte System ($2 \mu\text{M}$) ohne Farbstoffbeladung zeigte sich ebenfalls vor und nach der Bestrahlung kein

toxischer Effekt. Für das Farbstoff-beladene System ließ sich bei einer *m*THPC-Konzentration von 2 μM eine signifikante Dunkeltoxizität von etwa 26 % beobachten. Dieser Effekt konnte daher nur von dem Photosensibilisator stammen. Die hohe Affinität des kationischen Trägers zu der Membran führte demnach zu einer gesteigerten Akkumulation der photoaktiven Spezies auf und innerhalb der Zellen. Das Resultat war eine Dunkeltoxizität von 26 %. Das in Ethanol gelöste *m*THPC zeigte bei gleicher Konzentration eine minimale Dunkeltoxizität und eine photodynamische Wirkung von 85 %.

Einen für die Photodynamische Therapie besonders interessanten Zelltyp stellt die Zelllinie Cal27 dar. Hierbei handelt es sich um eine Zungenkarzinom-Zelllinie, die im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert ist.^[227] Um die photodynamische Wirkung der mit Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel an der Cal27-Zelllinie zu testen, wurde die Stammdispersion mit DMEM auf eine Endkonzentration von 0,5 μM und 2 μM eingestellt. Die Bestrahlung erfolgte nach 24 h Inkubation bei 50 J cm^{-2} (Abbildung 78).

Die *m*THPC-haltige Dispersion zeigte bei einer Farbstoffkonzentration von 0,5 μM eine Phototoxizität nach Bestrahlung von etwa 89 %. Das System konnte daher als sehr effektiv angesehen werden. Der bei gleicher Konzentration in Ethanol gelöste Farbstoff ergab bei geringer Dunkeltoxizität (6 %) eine photodynamische Wirkung von etwa 84 %. Das hier eingesetzte Trägersystem lieferte im Rahmen der Fehler eine vergleichbare photodynamische Wirksamkeit. Die unbeladene Dispersion zeigte bei vergleichbarer Verdünnung keine toxischen Effekte.

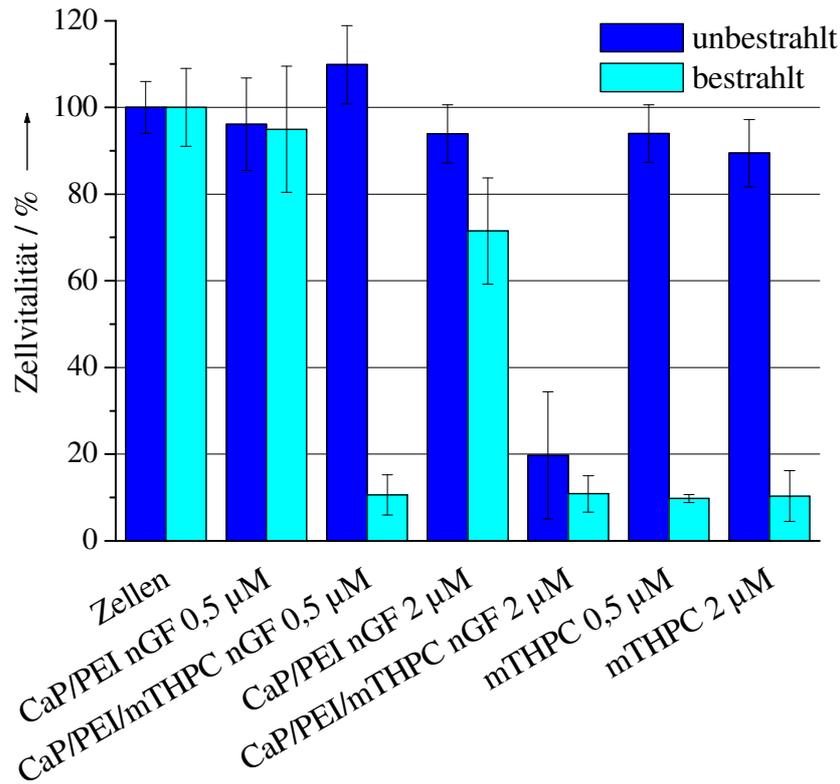


Abbildung 78: Phototoxizitätseigenschaften der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose und des Farbstoffes in ethanolischer Lösung an Cal27-Zellen. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Zellen vor und nach der Bestrahlung (50 J cm^{-2}) mit und ohne Partikelzusatz in DMEM aufgeführt.

Für die Nanopartikeldispersion mit $2 \mu\text{M}$ *m*THPC zeigte sich mit 80 % eine hohe Dunkeltoxizität. Dieses Ergebnis ließ sich nicht auf das reine Trägersystem zurückführen. Hier wurde für die unbeladene Dispersion bei gleicher Verdünnung lediglich ein Wert von 6 % erzielt. Diese hohe toxische Belastung für die Zellen konnte auf die gesteigerte Akkumulation des Photosensibilisators auf der Zellmembran und im Zellinneren zurückgeführt werden. Dieser Effekt wurde am Beispiel der L929-Zellen bereits diskutiert. Der in Ethanol gelöste Farbstoff lieferte bei einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ ein wesentlich besseres Resultat. Bei geringer Dunkeltoxizität lag die Phototoxizität bei 80 %. Es bleibt

Ergebnisse und Diskussion

festzuhalten, dass der in Ethanol gelöste Farbstoff bei einer Konzentration von 0,5 μM und 2 μM vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse an den Cal27-Zellen lieferte. Das mit *m*THPC beladene Trägersystem lieferte nur im Falle einer Farbstoffkonzentration von 0,5 μM für Dunkel- und Phototoxizität ein befriedigendes Resultat. Bei einer Farbstoffkonzentration von 2 μM führte das hier eingesetzte System möglicherweise zu einer gesteigerten Akkumulation des Farbstoffes auf und innerhalb der Zellen, sodass ein starker dunkeltoxischer Effekt zu beobachten war.

Alle Ergebnisse zur phototoxischen Wirkung der PEI-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel gegen HT29-, L929- und Cal27-Zellen sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Zusammenstellung der in DMEM durchgeführten Zelltests für die PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel für HT29-, L929- und Cal27-Zellen. Zum Vergleich sind die Ergebnisse des Farbstoffes in ethanolischer Lösung dargestellt. Es sind die Zellvitalitäten vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser) aufgeführt.

* Entsprechende Verdünnung des unbeladenen Systems.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / μM	Zellvitalität		Zellvitalität		Zellvitalität	
		HT29 / %		L929 / %		Cal27 / %	
		DT	Laser	DT	Laser	DT	Laser
CaP/PEI nGF	0 (0,5)*	97 \pm 6	102 \pm 7	100 \pm 3	100 \pm 3	96 \pm 11	95 \pm 15
	0 (2)*	91 \pm 6	92 \pm 4	100 \pm 5	100 \pm 3	94 \pm 7	72 \pm 12
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC nGF	0,5	98 \pm 3	23 \pm 19	104 \pm 2	14 \pm 13	110 \pm 9	11 \pm 5
	2	85 \pm 13	17 \pm 13	74 \pm 6	12 \pm 5	20 \pm 15	11 \pm 4
<i>m</i> THPC	0,5	101 \pm 5	95 \pm 5	96 \pm 2	17 \pm 30	94 \pm 7	10 \pm 1
	2	100 \pm 6	94 \pm 10	97 \pm 4	12 \pm 38	90 \pm 8	10 \pm 6

4.3.3.3 Diskussion der Bakterientests

Die photodynamische Wirkung der mit Polyethylenimin stabilisierten und *m*THPC-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel wurde an *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* getestet. Für die Tests wurden die Dispersion und das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material getestet. Die finale Farbstoffkonzentration der eingesetzten Dispersion wurde mit PBS auf 0,357 μM eingestellt. Als Vergleich wurden die unbeladenen Systeme bei gleicher Verdünnung untersucht.

Tabelle 23: Eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der PEI-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel mit und ohne *m*THPC-Beladung in PBS vor (Dispersion) und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose (nGF).

Komponente	<i>m</i>THPC-Konzentration / μM	Mit PBS eingestellte <i>m</i>THPC-Konzentration / μM
CaP/PEI Dispersion	0	-
CaP/PEI nGF	0	-
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC Dispersion	7,14	0,357
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC nGF	7,14	0,357

Das unbeladene Trägersystem mit und ohne Trehalose-Zusatz zeigte keine Dunkeltoxizität gegenüber *Staphylococcus aureus* vor und nach der Bestrahlung (Abbildung 79).

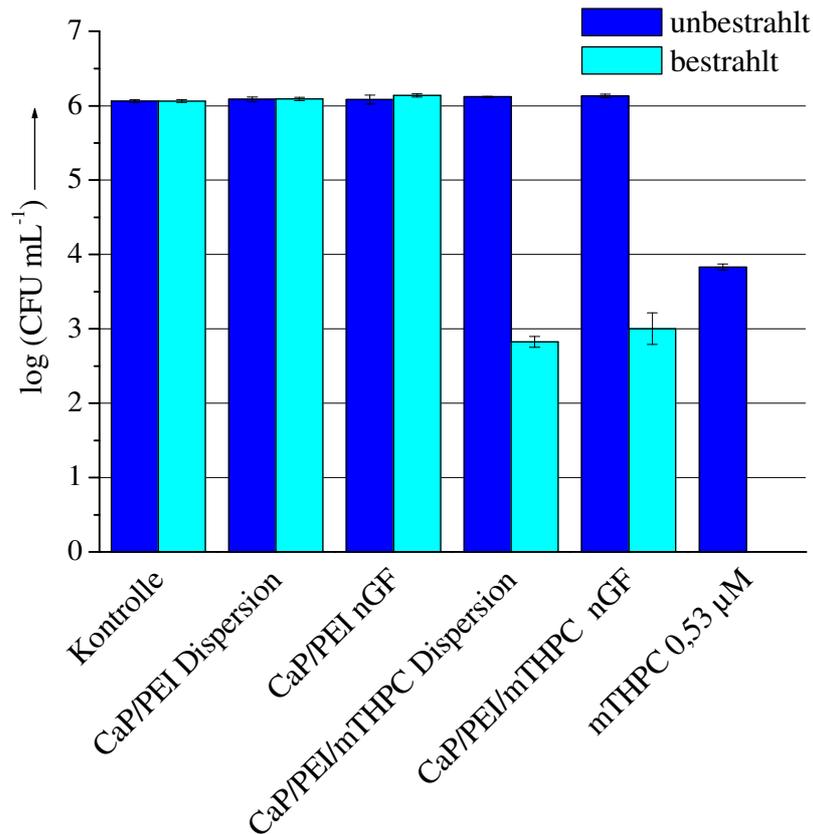


Abbildung 79: Phototoxizitätseigenschaften der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose bei einer Farbstoffkonzentration von 0,357 µM am Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* in PBS nach 30-minütiger Inkubation. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Bakterien vor und nach der Bestrahlung mit und ohne Partikelzusatz sowie für den in Ethanol gelösten Farbstoff bei einer Konzentration von 0,53 µM aufgeführt.

Für die mit *m*THPC beladene Dispersion zeigte sich ebenfalls kein dunkeltoxischer Effekt. Nach erfolgter Laserbehandlung zeigte sich eine Bakterienreduktion um etwa 99,9 % (von 6,1 nach 2,8). Dieses Resultat konnte auch für das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material erzielt werden. Die hier gezeigten Effekte waren stärker als jene, die bei dem anionischen

Ergebnisse und Diskussion

Partikelsystem, bestehend aus Carboxymethylcellulose-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln, gefunden wurden. Ein vergleichbarer phototoxischer Effekt konnte durch die Umladung mittels Polyethylenimin erzielt werden. Ein gesteigerter phototoxischer Effekt durch die Anwesenheit von Trehalose war hier nicht zu erkennen.

Die Polyethylenimin-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten nach 90-minütiger Inkubation ohne Farbstoffbeladung mit und ohne Trehalosezusatz ebenfalls keine toxischen Effekte. Die *m*THPC-haltige Dispersion ohne Trehalose zeigte nach 90-minütiger Inkubationszeit eine überraschend schwache Photoaktivität. War für das gleiche System nach 30-minütiger Inkubation ein photodynamischer Effekt von 99,9 % zu verzeichnen, so reduzierte sich dieser nach 90-minütiger Inkubationszeit auf 55 % (von 6,1 nach 5,7). Prinzipiell sollte nach längerer Inkubationszeit eine gesteigerte Akkumulation des Farbstoffes auf und in den Bakterien zu finden sein, sodass die Photoaktivität um ein Vielfaches erhöht wäre. Dieser Effekt war für das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material zu finden. Hier lag die photodynamische Wirkung nach einer 90-minütigen Inkubationszeit bei 100 %.

Der in Ethanol gelöste Farbstoff zeigte bei einer Konzentration von 0,53 μ M sowohl nach 30- als auch nach 90-minütiger Inkubation eine hohe Dunkeltoxizität (Tabelle 19). Nach erfolgter Bestrahlung wurde eine vollständige Bakterienreduktion beobachtet. Unter Berücksichtigung der Dunkeltoxizität zeigte das hier vorgestellte Partikelsystem zusammen mit Trehalose nach 90-minütiger Inkubation eine wesentlich bessere photodynamische Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* als der in Ethanol gelöste Farbstoff.

Bombelli *et al.* publizierten 2008 den Einsatz von kationischen Liposomen als Träger für *m*THPC und zeigten eine starke antibakterielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus* in PBS. Bei einer Farbstoffkonzentration von 10 μ M

konnte nach erfolgter Laserbehandlung eine Reduktion um 6 Größenordnungen beobachtet werden.^[228] Somit war der hier vorgestellte Träger mit einer Farbstoffkonzentration von 0,357 μM in Kombination mit Trehalose weitaus effizienter.

Für die Phototoxizitätsstudien am Gram-negativen Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* wurde das hier eingesetzte System in PBS bei gleicher Farbstoffkonzentration (0,357 μM) untersucht. Auch hier wurde die Inkubationszeit von 30 und 90 Minuten variiert. Der in Ethanol gelöste Farbstoff zeigte bei einer Konzentration von 0,53 μM weder nach 30- noch nach 90-minütiger Inkubation eine photodynamische Wirkung gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* (Tabelle 19).

Die photodynamische Wirkung des *m*THPC-beladenen Trägersystems gegen den Gram-negativen Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* war nach 90-minütiger Inkubation sehr gering. Lediglich das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte System zeigte eine signifikante Bakterienreduktion um 60 % (von 6,1 nach 5,7). Dieser Effekt war für die Carboxymethylcellulose-stabilisierten, mit *m*THPC beladenen und mit Polyethylenimin umgeladenen Partikel ausgeprägter.

Alle Ergebnisse für *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv) als auch für *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ) nach 30- und 90-minütiger Inkubation und anschließender Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 652 nm sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 24: Zusammenstellung der in PBS durchgeführten Bakterientests für die PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel für *S. aureus* und *P. aeruginosa*. Es ist jeweils die logarithmierte Zahl der Koloniebildenden Einheiten vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser) für unterschiedliche Inkubationszeiten (*t*) aufgeführt.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / μM	<i>t</i> / min	log (CFU mL ⁻¹) <i>S. aureus</i>		log (CFU mL ⁻¹) <i>P. aeruginosa</i>	
			DT	Laser	DT	Laser
Kontrolle	-	30	6,06 ± 0,02	-	6,02 ± 0,02	-
	-	90	6,09 ± 0,02	-	6,08 ± 0,04	-
CaP/PEI Dispersion	0	30	6,09 ± 0,03	6,09 ± 0,02	6,06 ± 0,02	6,06 ± 0,02
	0	90	6,07 ± 0,01	6,09 ± 0,01	6,06 ± 0,03	6,06 ± 0,03
CaP/PEI nGF	0	30	6,08 ± 0,06	6,14 ± 0,02	6,03 ± 0,01	6,04 ± 0,01
	0	90	6,14 ± 0,02	6,11 ± 0,02	6,02 ± 0,01	6,04 ± 0,01
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC Dispersion	0,357	30	6,12 ± 0,01	2,83 ± 0,07	6,11 ± 0,02	5,92 ± 0,02
	0,357	90	6,12 ± 0,00	5,74 ± 0,01	6,08 ± 0,04	6,03 ± 0,03
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC nGF	0,357	30	6,13 ± 0,02	3,00 ± 0,21	6,04 ± 0,01	6,07 ± 0,01
	0,357	90	6,17 ± 0,02	0 ± 0	6,04 ± 0,01	5,69 ± 0,05

4.3.3.4 Herstellung und Untersuchung der phototoxischen Wirkung von Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen

4.3.3.4.1 Herstellung und Charakterisierung

In Kapitel 4.2 wurde die Darstellung positiv geladener Calciumphosphat-Nanostäbchen basierend auf Polyethylenimin beschichtetem Ostim[®] vorgestellt. Die resultierenden kationischen Nanostäbchen wurden dort als erfolgreiche Trägersysteme für Nukleinsäuren diskutiert.^[229] Aufgrund des kationischen Charakters können diese Nanopartikel für anionische Wirkstoffe aller Art Einsatz finden. So sollte auch die Adsorption von Chlorin-Derivaten mit anionischem Charakter realisierbar sein.

In diesem Kapitel wird die Funktionalisierung dieser Nanopartikel mit *m*THPC behandelt und die photodynamische Wirkung der erhaltenen Systeme an HT29- und L929-Zellen, den Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* und den Gram-negativen Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* diskutiert.

Die Herstellung von Polyethylenimin-funktionalisiertem Ostim[®] erfolgte wie bereits in Kapitel 4.2.1.1 erläutert. Die Größenverteilung der Polyethylenimin-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanostäbchen ist in Abbildung 80 dargestellt.

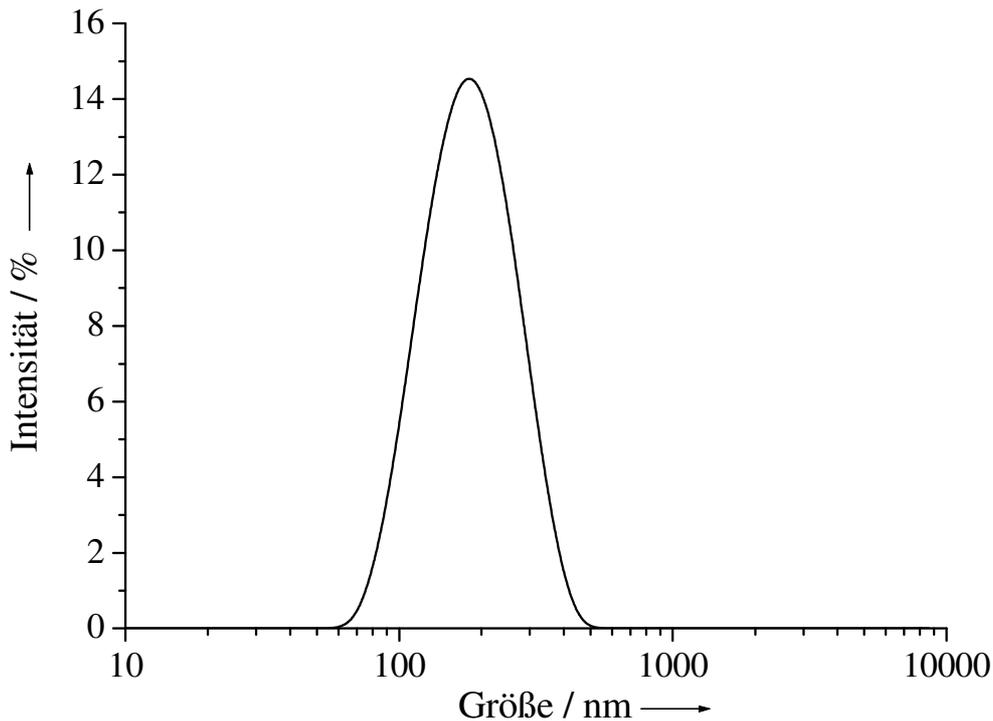


Abbildung 80: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilung der PEI-beschichteten Ostim[®]-Nanostäbchen nach der Aufreinigung.

Die mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilung zeigte ein Maximum bei 164 nm. Der Polydispersitätsindex deutete mit einem Wert von 0,129 auf ein monodisperses System hin. Das zugehörige Zetapotential bestätigte mit einem Wert von +47 mV das Vorliegen eines elektrostatisch stabilisierten Systems. Die positive Ladung der Partikel resultierte aus der Protonierung der Aminogruppen von Polyethylenimin. Eine zusätzlich sterische Stabilisierung war durch die voluminösen Polymerschleifen des Polyethylenimins gewährleistet.

Zur Funktionalisierung wurde dieses kationische Trägersystem nach erfolgter Aufreinigung mit unterschiedlichen Mengen des Photosensibilisators *m*THPC versetzt (Ostim/PEI/*m*THPC_1, 10,7 μ M; Ostim/PEI/*m*THPC_2, 36,5 μ M). Die Darstellung der Beschichtung von Ostim[®] mit Polyethylenimin und der darauf folgenden Funktionalisierung mit *m*THPC ist in Abbildung 81 gezeigt.

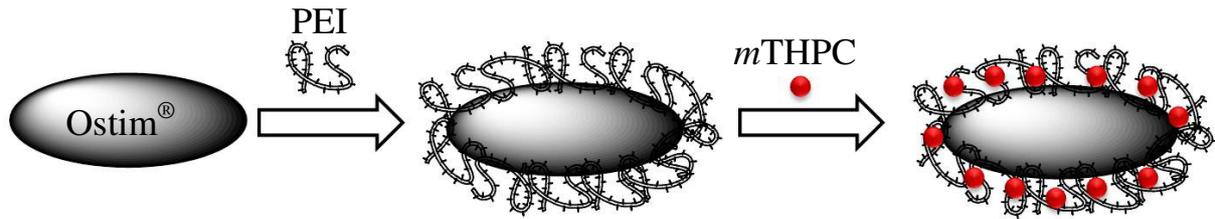


Abbildung 81: Schematische Darstellung der Beschichtung von Ostim[®] mit PEI und der nachträglichen Funktionalisierung mit *m*THPC.

Zur Entfernung des überschüssigen *m*THPC-Anteils wurde die Dispersion nach 30-minütiger Inkubation erneut für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand mit dem nicht adsorbierten *m*THPC-Anteil wurde entfernt, der durch den Photosensibilisator rot gefärbte Rückstand mit 20 mL Reinstwasser aufgenommen und für 2 min mittels Ultraschall redispersiert.

Die nach der Aufreinigung erhaltenen Größenverteilungen mittels Dynamischer Lichtstreuung sind in Abbildung 82 aufgeführt. Die hydrodynamischen Durchmesser der mit unterschiedlichen *m*THPC-Mengen behandelten Partikel zeigten nach der Aufreinigung Werte zwischen 190 nm und 210 nm. Die nur leichte Größenzunahme der Partikel nach der *m*THPC-Beladung unterstützte die Annahme, dass der Photosensibilisator erfolgreich in die stabilisierenden Polymerschleifen des Polyethylenimins eingebettet wurde. Die Polydispersitätsindizes bestätigten mit Werten von 0,196 und 0,150 das Vorliegen von monodispersen Systemen ohne Agglomerate.

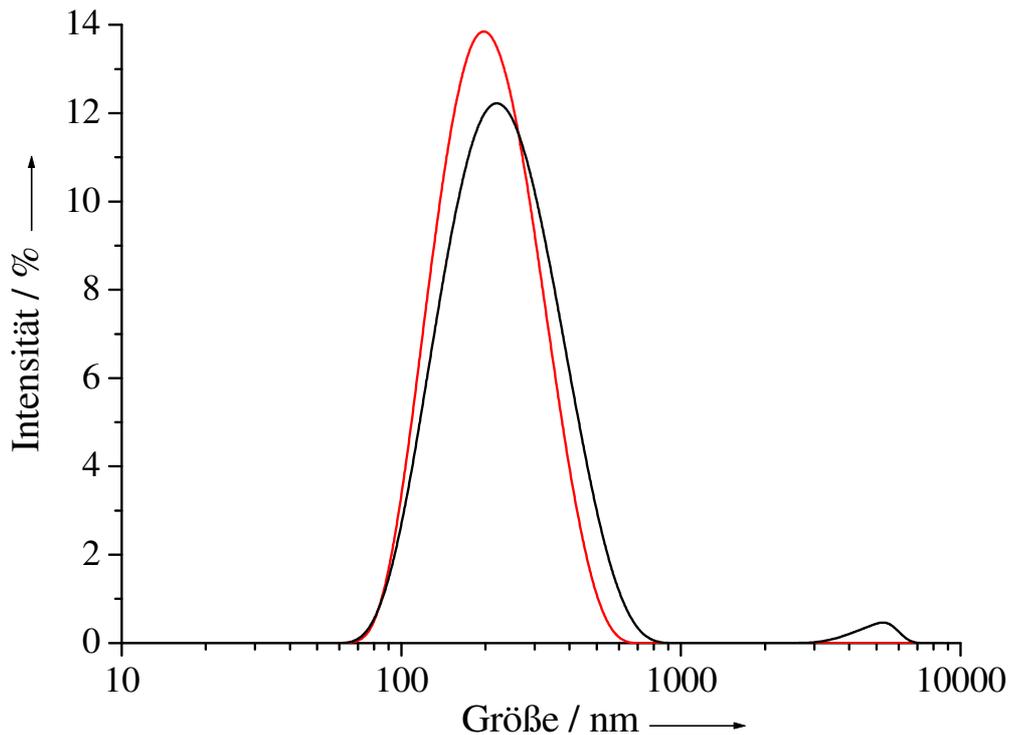


Abbildung 82: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilungen der PEI-beschichteten und mit *m*THPC funktionalisierten Ostim[®]-Nanostäbchen (Ostim/PEI/*m*THPC_1 schwarz, Ostim/PEI/*m*THPC_2 rot) nach der Aufreinigung.

Die Zetapotentiale der *m*THPC-beladenen Systeme waren stets positiv. Eine leichte Verringerung des Zetapotentials resultierte aus der negativen Ladung von *m*THPC. Die erhaltenen Dispersionen lagen trotzdem mit Werten von +32 mV und +31 mV im elektrostatisch stabilisierten Bereich. Zusätzlich wirkte das Polyethylenimin durch die Polymerschleifen sterisch stabilisierend.

Zur weiteren Charakterisierung wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die erhaltenen Dispersionen auf einen Silicium-Wafer aufgetragen und die Dispersion eingetrocknet. Dann wurden die Proben für 30 s mit Pd/Au-bedampft. Die erhaltenen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 83 dargestellt.

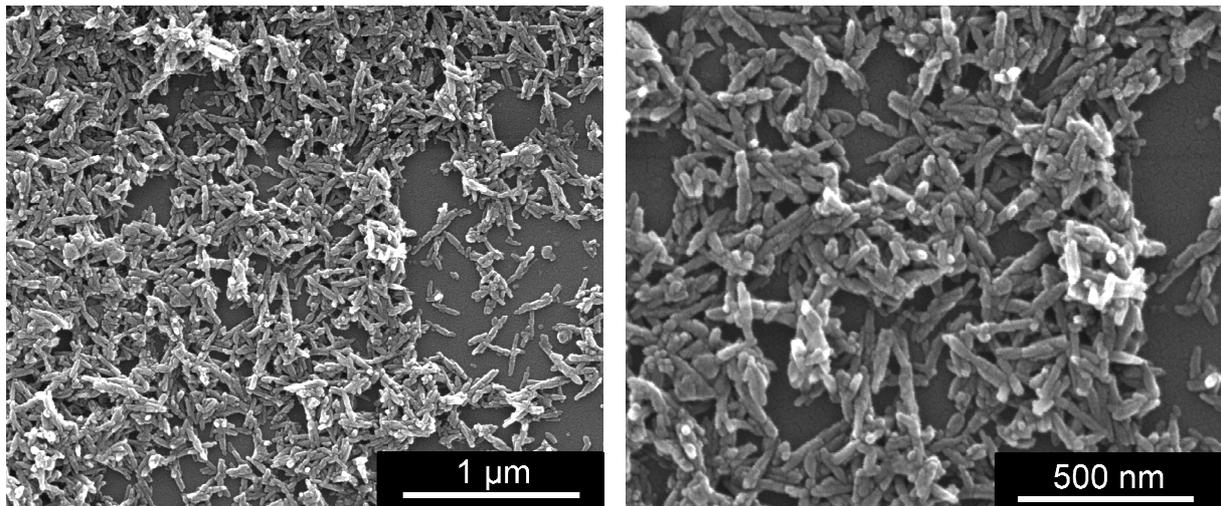


Abbildung 83: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen nach der Aufreinigung.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 83 zeigen sehr deutlich den stäbchenförmigen Charakter der Partikel. Die Länge der Ostim[®]-Nanostäbchen lag zwischen 150 nm und 200 nm. Dieses Resultat entsprach in etwa der mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltenen Größenverteilung. Die zweimalige Zentrifugation, gefolgt von der Behandlung mittels Ultraschall hatte die Morphologie der Nanostäbchen nicht verändert. Die Breite der Nanostäbchen lag bei 20 nm bis 30 nm.

Die Farbstoff-Quantifizierung der *m*THPC-beladenen Nanopartikel erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie und einer geeigneten Kalibrationsgeraden. Die erhaltenen Spektren in einer Verdünnung von 1:3 sind in Abbildung 84 aufgeführt.

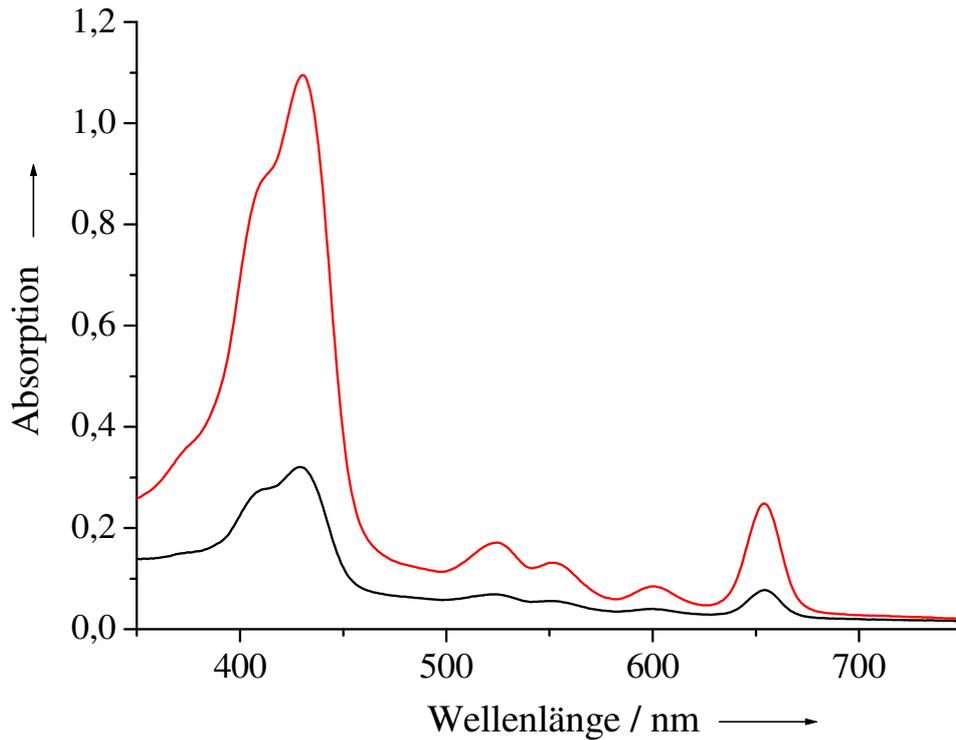


Abbildung 84: UV-Vis-Spektren der mit PEI-stabilisierten und mit unterschiedlichen Mengen an *m*THPC-funktionalisierten Ostim[®]-Nanostäbchen nach der Aufreinigung (Ostim/PEI/*m*THPC_1; 10,7 µM, schwarz; Ostim/PEI/*m*THPC_2; 36,5 µM, rot). Für die Farbstoffquantifizierung wurde ein Teil der Dispersion mit Wasser im Verhältnis 1:3 verdünnt.

Die erhaltene Farbstoffkonzentration des geringer-beladenen Systems lag bei 10,7 µM. Der prozentual adsorbierte Anteil an *m*THPC ließ sich über die folgende Beziehung berechnen:

Es wurden 0,59 µmol *m*THPC (400 µL *m*THPC in 2-Propanol, 1 mg mL⁻¹) auf 20 mL der Polyethylenimin-stabilisierten Ostim[®]-Dispersion gegeben. Die farbstoffhaltige Dispersion wurde zentrifugiert und der Rückstand in 20 mL Reinstwasser redispergiert. Damit lag die maximal mögliche Farbstoffkonzentration bei:

Ergebnisse und Diskussion

$$c_{\max} = \frac{0,59 \mu\text{mol}}{0,02 \text{ L}} = 29,5 \mu\text{M} \quad (19)$$

Die mittels UV-Vis-Spektroskopie ermittelte Farbstoffkonzentration lag bei 10,7 μM . Die adsorbierte Stoffmenge war damit:

$$10,7 \mu\text{M} \cdot 0,02 \text{ L} = 0,21 \mu\text{mol} \quad (20)$$

Der prozentual adsorbierte Farbstoffanteil lag damit bei:

$$\frac{0,21 \mu\text{mol}}{0,59 \mu\text{mol}} \cdot 100 \% = 36 \% \quad (21)$$

Das höher beladene System wies eine Farbstoffkonzentration von 36,5 μM auf. Hier lag der prozentual adsorbierte Farbstoffanteil bei 62 %. Aus dem Einsatz der doppelten Farbstoffmenge zum kationischen Trägersystem resultierte somit eine höhere Beladung durch *m*THPC.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die abzentrifugierten und an Luft getrockneten Feststoffe mittels Thermogravimetrie untersucht. Die Thermogramme für die Ostim[®]-Nanostäbchen mit unterschiedlicher Farbstoffbeladung sind in Abbildung 85 dargestellt. Die eingewogene Menge der jeweiligen Systeme betrug 22,1 mg (Ostim/PEI/*m*THPC_1) und 19,7 mg (Ostim/PEI/*m*THPC_2).

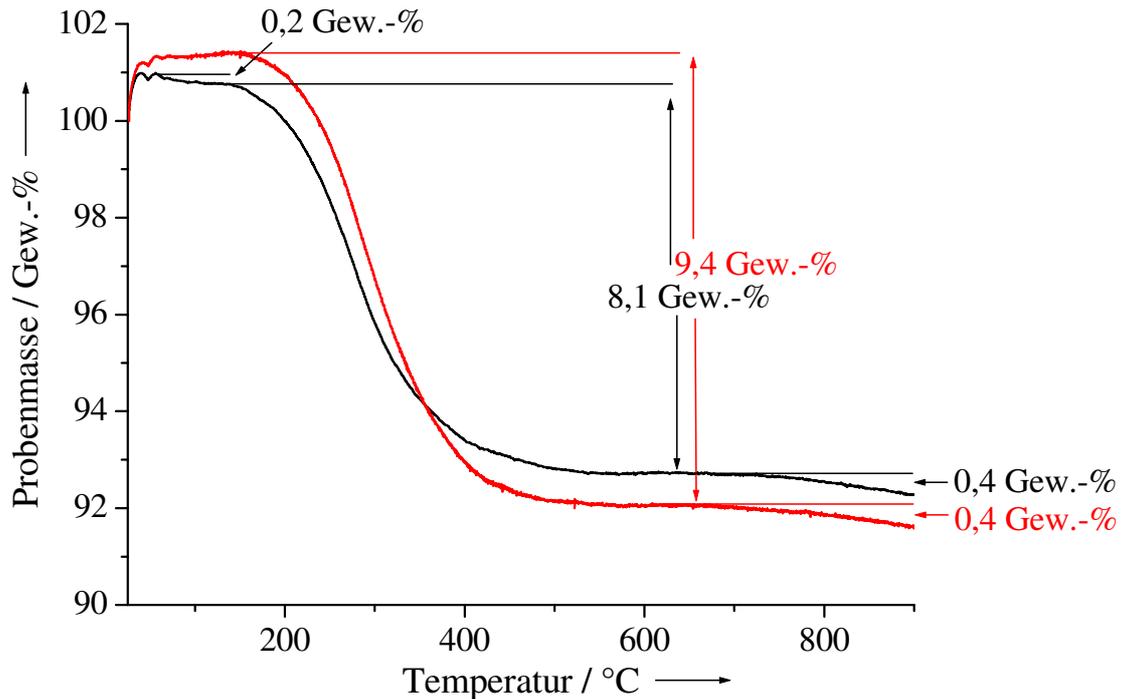


Abbildung 85: Thermogramme für die PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen mit unterschiedlichen Farbstoffbeladungen (Ostim/PEI/*m*THPC_1 schwarz; Ostim/PEI/*m*THPC_2 rot). Durchgeführt unter Sauerstoffatmosphäre (50 mL min^{-1}) und einer Heizrate von 1 K min^{-1} .

Im Temperaturbereich um 100 °C kam es zur thermischen Desorption von Wasser. Hier besaßen die Partikel mit geringerem Farbstoffanteil einen mit $0,2 \text{ Gew.-%}$ unwesentlich höheren Wasseranteil. Im Temperaturbereich von 200 °C bis 650 °C kam es zum Abbrand des organischen Materials (Polyethylenimin und *m*THPC). Wie zu erwarten, besaßen die mit höherem Farbstoffanteil beladenen Partikel (Ostim/PEI/*m*THPC_2; $36,5 \text{ µM}$) mit $9,4 \text{ Gew.-%}$ einen um $1,3 \text{ Gew.-%}$ höheren organischen Anteil als die geringer beladenen Partikel ($8,1 \text{ Gew.-%}$), der auf die zusätzlich adsorbierte Farbstoffmenge zurückgeführt werden konnte. Im Temperaturbereich von 650 °C bis 900 °C kam es zur thermischen Abspaltung von Kohlenstoffdioxid aus dem carbonathaltigen Apatitgitter. In beiden Fällen lag der Verlust bei $0,4 \text{ Gew.-%}$, was einem Carbonatanteil von $0,5 \text{ Gew.-%}$ im Apatitgitter

Ergebnisse und Diskussion

entspricht. Eine detaillierte Auflistung der mittels Elementaranalyse und Thermogravimetrie erhaltenen Daten für die unterschiedlich beladenen Systeme und für den ohne Farbstoff-beladenen Träger sind in Tabelle 25 zusammengestellt.

Tabelle 25: Tabellarische Auflistung der elementaranalytischen und der thermogravimetrischen Daten für die PEI-stabilisierten Ostim[®]-Nanostäbchen mit und ohne *m*THPC-Beladung.

Komponente	Ostim/PEI	Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC_1	Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC_2
Ca ²⁺ (AAS) / Gew.-%	37,2	36,6	35,4
PO ₄ ³⁻ (UV) / Gew.-%	51,9	-	-
C / Gew.-%	2,4	4,2	5,9
H / Gew.-%	1,0	1,0	1,1
N / Gew.-%	1,3	1,4	1,6
Mineralgehalt / Gew.-% (TG)	-	91,7	90,6
Molares Ca/P-Verhältnis	1,70	-	-
Organischer Anteil / Gew.-% (TG)	-	8,1	9,4
Carbonatgehalt / Gew.-% (TG)	-	0,5	0,5
Wassergehalt / Gew.-% (TG)	-	0,2	0
<i>m</i> THPC-Gehalt (UV) / Gew.-%	-	2,3	8,0

Aufgrund der hohen Farbstoffkonzentration und der daraus resultierenden Färbung konnte keine UV-Vis-spektroskopische Quantifizierung von Phosphat durch Ammoniummolybdat erfolgen.^[230] Der adsorbierte Polymeranteil konnte mit Gleichung 15 berechnet werden und lag für das unbeladene Trägersystem bei 4 Gew.-%. Aus der Differenz der angegebenen Stickstoffanteile für die

Systeme mit und ohne Farbstoffbeladung ließ sich nach Gleichung 16 der adsorbierte Farbstoffanteil berechnen. Für das geringer beladene System (Ostim/PEI/*m*THPC_1) lag dieser Wert bei 1,2 Gew.-%, während die höher beladene Dispersion (Ostim/PEI/*m*THPC_2) einen Farbstoffanteil von 3,6 Gew.-% aufwies.

Der mittels Gravimetrie und UV-Vis-Spektroskopie bestimmte *m*THPC-Gehalt lag nach Gleichung (17) und (18) für die PEI-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen bei 2,3 und 8,0 Gew.-%. Die Werte waren im Schnitt zweimal größer als die über den Stickstoffanteil berechneten Mengen. Diese *m*THPC-Beladungen sind jedoch trotz des gravimetrisch bestimmten Fehlers am Wahrscheinlichsten.

Um die Kristallinität der Polyethylenimin-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanostäbchen zu bestimmen, wurden Röntgenpulverdiffraktogramme angefertigt. Zum Vergleich sind die Polyethylenimin-stabilisierten Ostim[®]-Nanostäbchen ohne Farbstoffbeladung aufgeführt.

Die in Abbildung 86 dargestellten Diffraktogramme zeigen verhältnismäßig breite Reflexe, die auf ein nanokristallines Material schließen lassen. Lage und Intensität der erhaltenen Reflexe ließen sich eindeutig den Literaturreflexen für Hydroxylapatit zuordnen.

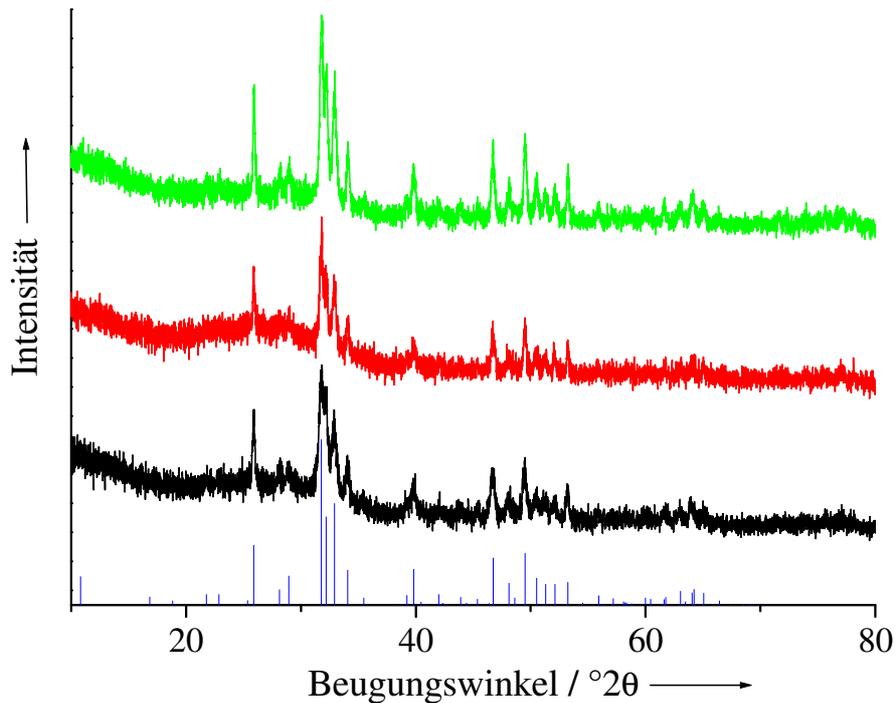


Abbildung 86: Röntgenpulverdiffraktogramme der PEI-stabilisierten und mit unterschiedlichen Mengen an *m*THPC beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen (Ostim/PEI/*m*THPC_1, rot; Ostim/PEI/*m*THPC_2, grün) sowie des unbeladenen Systems (schwarz). Zum Vergleich sind die Literaturreflexe für Hydroxylapatit aus der ICDD-Datenbank (84-1998) aufgeführt.

Um eine Langzeitlagerung der *m*THPC-haltigen Dispersionen zu gewährleisten, wurden diese in Gegenwart des Kryoprotektors Trehalose lyophilisiert. Hierbei wurden, wie bereits diskutiert, 10 mg Trehalose in 1 mL der Dispersion gelöst, in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Die in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Dispersionen konnten durch einfache Wasserzugabe ohne Verlust des kolloidalen Charakters vollständig regeneriert werden. Die mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltenen Größenverteilungen nach der Lyophilisation und anschließender Redispersion für die unterschiedlich beladenen Systeme sind in Abbildung 87 dargestellt.

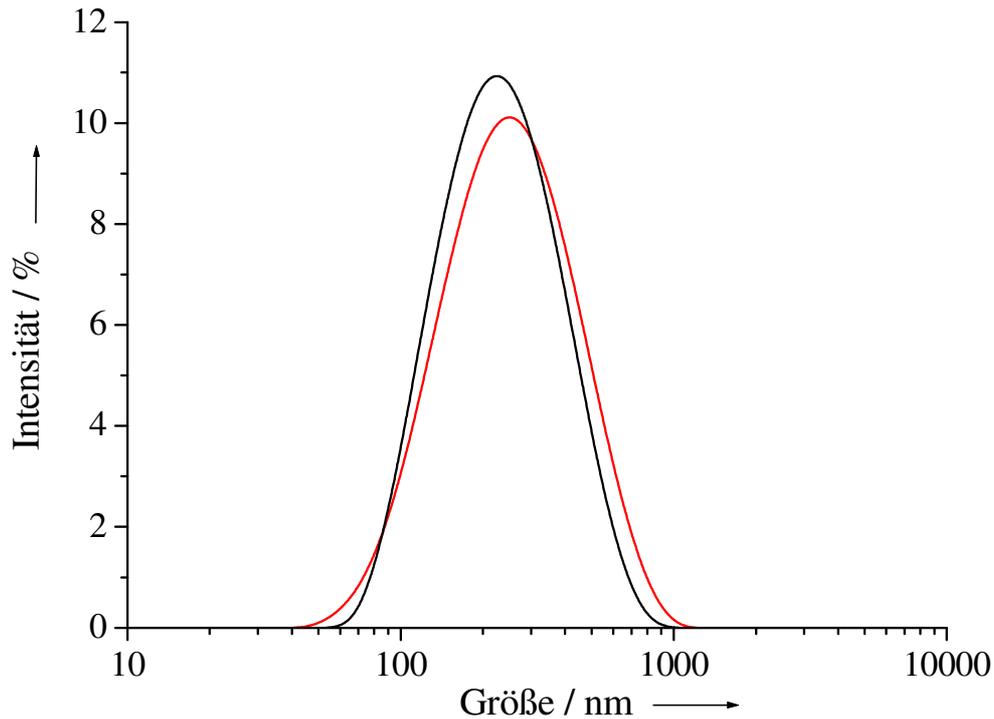


Abbildung 87: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilungen der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen ((a) Ostim/PEI/*m*THPC_1, rot; (b) Ostim/PEI/*m*THPC_2, schwarz) nach der Lyophilisation und anschließender Redispersion in Wasser.

Die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel lagen für die Dispersion Ostim/PEI/*m*THPC_1 bei 216 nm und für die Dispersion Ostim/PEI/*m*THPC_2 bei 206 nm. Die Polydispersitätsindizes von 0,213 und 0,187 bestätigten den monodispersen Charakter der regenerierten Dispersionen.

Im Vergleich zu den aufgereinigten Dispersionen war bei den in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Systemen eine Verbreiterung der hydrodynamischen Durchmesser und eine leichte Größenzunahme um 10 nm bis 20 nm zu beobachten. Diese Zunahme im hydrodynamischen Durchmesser könnte zum einen durch das Verkleben der Nanostäbchen in der Zuckermatrix während der Lyophilisation, zum anderen mit der Viskositätszunahme durch Trehalose erklärt werden. Dadurch bewegten sich die Partikel in Dispersion langsamer und die resultierende Größenverteilung wurde zu höheren Werten verschoben. Diese

Erkenntnis ließ sich ebenfalls auf die erhaltenen Zetapotentiale übertragen. Für Dispersion a) wurde ein Wert von +29 mV erhalten, für Dispersion b) +28 mV. Beide Dispersionen ließen sich demnach in Gegenwart von Trehalose lyophilisieren und ohne signifikanten Verlust des kolloid-dispersen Charakters regenerieren.

4.3.3.4.2 Diskussion der Zelltests

Die mit Polyethylenimin stabilisierten und mit unterschiedlichen Mengen an *m*THPC beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen (10,7 μ M und 36,5 μ M) sowie das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material wurden zur Bestimmung der phototoxischen Wirkung an HT29- und L929-Zellen an biolitec in Jena übergeben.

Für die Zelltests wurde ausschließlich das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material verwendet. Um einen potentiell toxischen Effekt durch das Trägersystem ausschließen zu können, wurde das unbeladene und das mit *m*THPC beladene System untersucht.

Die Dispersion mit einem Farbstoffgehalt von 10,7 μ M (Ostim/PEI/*m*THPC_1) wurde mit DMEM auf eine Endkonzentration von 2 μ M verdünnt. Das System mit einer Farbstoffkonzentration von 36,5 μ M (Ostim/PEI/*m*THPC_2) wurde auf eine Endkonzentration von 2 μ M und 6 μ M an *m*THPC eingestellt. Die zugehörige Kontrolle ohne Farbstoff wurde zum Vergleich mit äquivalenten Anteilen an DMEM verdünnt, um eine potentielle Toxizität durch das Trägersystem auszuschließen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 26: Eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der PEI-stabilisierten Ostim®-Nanostäbchen nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose mit und ohne *m*THPC-Beladung sowie der in Ethanol gelöste Farbstoff nach erfolgter Verdünnung mit DMEM.

Komponente	<i>m</i>THPC-Konzentration / μM	Mit DMEM eingestellte <i>m</i>THPC- Konzentrationen / μM
Ostim/PEI nGF	0	-
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC_1 nGF	10,7	2
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC_2 nGF	36,5	2; 6
<i>m</i> THPC	-	2; 6

Aus Tabelle 27 geht hervor, dass das hier eingesetzte Trägersystem ohne *m*THPC-Beladung keine merkliche Toxizität gegenüber den hier eingesetzten HT29-Zellen aufwies. Die Dunkeltoxizität der beladenen Systeme lag hier bei 5 % und 10 % und war damit vergleichbar mit dem Farbstoff in ethanolischer Lösung. Die Phototoxizität der mit *m*THPC beladenen Partikel lag bei einer Farbstoffkonzentration von 2 μM bei etwa 20 %. Diese Werte waren vergleichbar mit den Phototoxizitäten des Farbstoffes in ethanolischer Lösung bei gleicher Konzentration.

Für eine Farbstoffkonzentration von 6 μM zeigte sich eine wesentlich höhere Photoaktivität nach Bestrahlung. Hier lag die Zellvitalität bei etwa 50 % und war ebenfalls vergleichbar mit der phototoxischen Wirkung des freien Farbstoffes bei gleicher Konzentration. Der direkte Vergleich der Dunkeltoxizitäten zwischen dem in Ethanol gelösten Farbstoff (etwa 20 %) und

dem mit *m*THPC beladenen Trägersystem in Wasser zeigte hier einen um die Hälfte geringeren Wert von etwa 10 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die photodynamische Wirkung der Polyethylenimin-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Nanostäbchen basierend auf Ostim[®] im Vergleich zu den in Kapitel 4.3.3.3.2 vorgestellten Partikeln trotz größerer Farbstoffkonzentration eine geringere Wirkung gegenüber HT29-Zellen zeigte. Eine mögliche Ursache könnte in der Größe der Ostim[®]-Nanostäbchen liegen, wodurch eine effiziente endozytotische Aufnahme reduziert wurde.

Die photodynamische Wirkung der *m*THPC-haltigen Dispersionen wurde im weiteren Verlauf an L929-Zellen getestet (Abbildung 88). Die gewählte Inkubationszeit nach der Partikelzugabe betrug hier 24 h. Für die Phototoxizitätsstudien wurde mit einer Laserleistung von 5 J cm^{-2} gearbeitet. Um einen potentiell toxischen Effekt durch das Trägersystem auszuschließen, wurde das unbeladene als auch das mit *m*THPC beladene Trägersystem vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose untersucht.

Die in Abbildung 88 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das hier eingesetzte Trägersystem ohne *m*THPC-Beladung keine merkliche Toxizität gegenüber den L929-Zellen aufwies. In allen Fällen lag die Zellvitalität der unbeladenen als auch der beladenen Partikel vor der Bestrahlung bei 100 %. Hier zeigte der in Ethanol gelöste Farbstoff bei einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ eine Dunkeltoxizität von 10 %, bei einer Farbstoffkonzentration von $6 \mu\text{M}$ sogar 80 %.

Polyethylenimin-stabilisiertes Ostim[®] zeigte hier eine wesentlich geringere Dunkeltoxizität und wäre daher für eine Anwendung besser geeignet. Die Zellvitalität nach erfolgter Bestrahlung lag bei einer *m*THPC-Konzentration von $2 \mu\text{M}$ für den beladenen Träger als auch für den freien Farbstoff bei etwa 20 %.

Ergebnisse und Diskussion

Bei einer Konzentration von 6 μM konnte dieser Wert sogar auf 10 % reduziert werden.

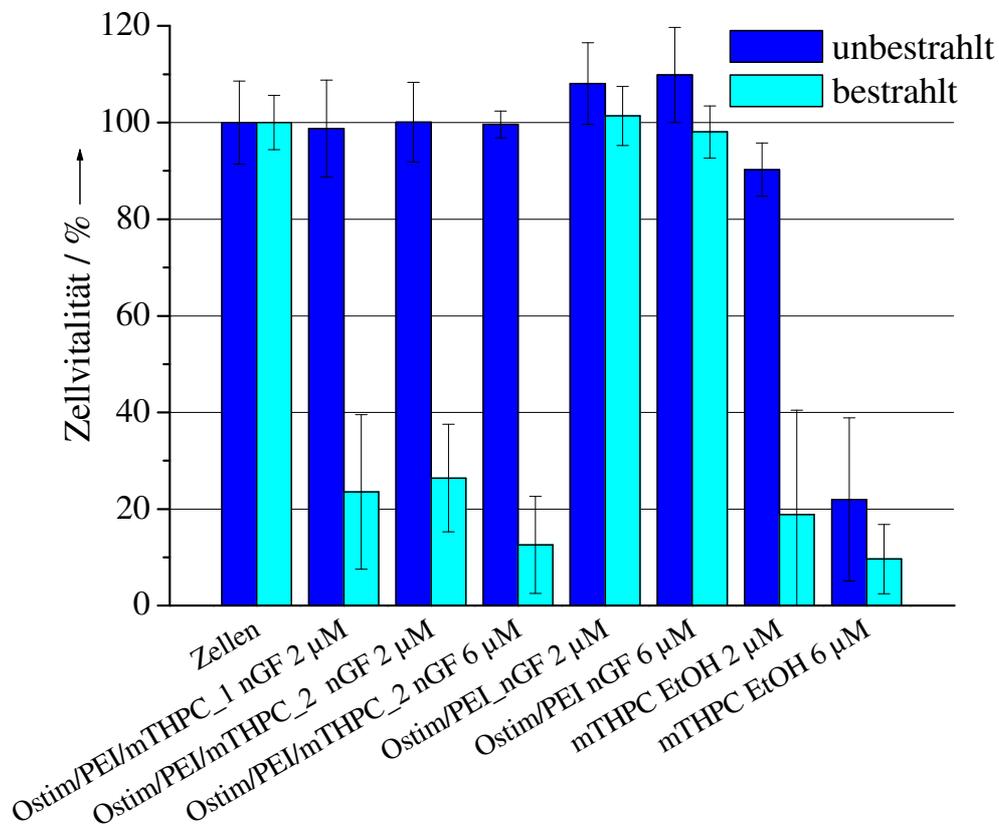


Abbildung 88: Phototoxizitätseigenschaften der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose und des Farbstoffes in ethanolischer Lösung an L929-Zellen. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Zellen vor und nach der Bestrahlung (5 J cm^{-2}) mit und ohne Partikelzusatz in DMEM aufgeführt.

So war die photodynamische Wirkung der beladenen Nanopartikel vergleichbar mit den Werten des in Lösung befindlichen Farbstoffes. Ein Vorteil der *m*THPC-haltigen Trägersysteme lag hier in der wesentlich geringeren Dunkeltoxizität als auch in der Anwendung des Farbstoffes im wässrigen Medium, sodass eine lokale Applikation nicht in ethanolischer Lösung erfolgen müsste.

Ergebnisse und Diskussion

Alle Ergebnisse zur phototoxischen Wirkung der PEI-stabilisierten und *m*THPC-beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen gegen HT29- und L929-Zellen sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Zusammenstellung der in DMEM durchgeführten Zelltests für die PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen für HT29- und L929-Zellen. Zum Vergleich sind die Ergebnisse des Farbstoffes in ethanolischer Lösung dargestellt. Es sind die Zellvitalitäten vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser) aufgeführt.

*Entsprechende Verdünnung des unbeladenen Systems.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / μM	Zellvitalität HT29 / %		Zellvitalität L929 / %	
		DT	Laser	DT	Laser
Ostim/PEI nGF	0 (2)*	96 ± 4	97 ± 7	108 ± 9	101 ± 6
	0 (6)*	98 ± 10	100 ± 8	110 ± 10	98 ± 5
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC_1 nGF	2	94 ± 5	77 ± 10	99 ± 10	24 ± 16
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC_2 nGF	2	93 ± 5	83 ± 9	100 ± 8	26 ± 11
	6	90 ± 7	53 ± 11	100 ± 3	13 ± 10
<i>m</i> THPC	2	96 ± 3	81 ± 12	90 ± 6	19 ± 22
	6	81 ± 5	52 ± 12	22 ± 17	10 ± 7

4.3.3.4.3 Diskussion der Bakterientests

Für die Versuche wurden die Bakterienstämme *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* verwendet. Zur Bestimmung der Photoaktivität wurden die Bakterien mit den unterschiedlich beladenen Partikelsystemen vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die finale Farbstoffkonzentration der *m*THPC-beladenen Partikel lag nach der erfolgten Verdünnung in PBS bei 0,53 μM und 1,83 μM . Als Kontrolle wurden die unbeladenen Systeme bei gleicher Verdünnung und der in Ethanol gelöste Farbstoff bei gleicher Konzentration untersucht.

Tabelle 28: Eingesetzte Farbstoffkonzentrationen der PEI-stabilisierten Ostim[®]-Nanostäbchen mit und ohne *m*THPC-Beladung in PBS vor (Dispersion) und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose (nGF) sowie der in Ethanol gelöste Farbstoff.

Komponente	<i>m</i> THPC-Konzentration / μM	Mit PBS eingestellte <i>m</i> THPC- Konzentrationen / μM
Ostim/PEI Dispersion	0	-
Ostim/PEI nGF	0	-
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC Dispersion	10,7; 36,5	0,53; 1,83
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC nGF	10,7; 36,5	0,53; 1,83
<i>m</i> THPC	-	0,53; 1,52

Die Ergebnisse für *Staphylococcus aureus* als auch für *Pseudomonas aeruginosa* nach 30- und 90-minütiger Inkubation in PBS und anschließender Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 652 nm sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Die in Tabelle 29 zusammengestellten Resultate zeigten für die unbeladenen Träger vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose keinen Einfluss auf die Vitalität des Bakterienstammes *Staphylococcus aureus* vor und nach der Bestrahlung. Die auf eine *m*THPC-Konzentration von 0,53 μM eingestellte Nanopartikel-Dispersion zeigte nach 30-minütiger Inkubation in PBS und anschließender Bestrahlung eine Reduktion der Kolonie-bildenden Einheiten um eine Größenordnung. Dieser photodynamische Effekt war bei dem in Gegenwart von Trehalose lyophilisierten Material leicht verstärkt.

Das *m*THPC in ethanolischer Lösung zeigte bei gleicher Farbstoffkonzentration eine vollständige Bakterienreduktion. Diese Wirkung wurde durch das *m*THPC-beladene Trägersystem nicht erreicht. Eine Erklärung dafür könnte hier die geringe Inkubationszeit geben. Die Freisetzung des Farbstoffes aus den Polymerschleifen der Partikel wäre zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend, um eine vergleichbare Wirkung zu erzielen. Zudem war diese Zeitspanne möglicherweise zu gering, um eine Anlagerung der *m*THPC-haltigen Nanopartikel an die Bakterienwand in ausreichender Menge zu realisieren. Ein Vorteil des *m*THPC-haltigen Trägers lag in der wesentlich geringeren Dunkeltoxizität im Vergleich zum freien Farbstoff der gleichen Konzentration. Während die beladenen Nanopartikel keine Dunkeltoxizität zeigten, wurde beim Farbstoff in ethanolischer Lösung eine Bakterienreduktion um 2 Größenordnungen ohne Bestrahlung gemessen.

Die auf eine Farbstoffkonzentration von 1,83 μM verdünnte Nanopartikel-Dispersion (36,5 μM) zeigte im Vergleich zum geringer beladenen System (10,7 μM) eine erhöhte photodynamische Wirkung. Die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten verringerte sich nach erfolgter Bestrahlung um 2 Größenordnungen. Diese Wirkung wurde durch die Anwesenheit von Trehalose weiter verstärkt. Hier wurde eine Bakterienreduktion um 3 Größenordnungen beobachtet. Die Anwesenheit von Trehalose stimulierte wie zuvor die

Anlagerung der Nanopartikel an die Bakterienwand. Eine durch den Zucker gesteigerte Adhäsion wäre ebenfalls denkbar. Dieser Effekt ließ die photodynamische Wirksamkeit des Trägersystems ansteigen.

Der in Ethanol gelöste Farbstoff zeigte bei der gleichen Konzentration eine vollständige Bakterienabtötung und wirkte damit effektiver. Auch hier könnte die zu kurze Inkubationszeit der beladenen Nanopartikel eine Ursache für die im Vergleich zum freien Farbstoff gehemmte Photoaktivität sein. Ein Nachteil der Applikation des in Ethanol gelösten Farbstoffes im Vergleich zur beladenen Nanopartikel-Dispersion lag allerdings in der starken Dunkeltoxizität. Hier erfolgte die Bakterienreduktion bereits ohne Bestrahlung um 3 Größenordnungen.

Nach 90-minütiger Inkubationszeit wurde wie zuvor keine Toxizität des unbeladenen Trägersystems vor und nach der Bestrahlung beobachtet (Abbildung 89). Die auf eine Farbstoffkonzentration von $0,53 \mu\text{M}$ verdünnte Nanopartikel-Dispersion zeigte nach 90-minütiger Inkubation eine gesteigerte Photoaktivität nach Bestrahlung (2 Größenordnungen) im Vergleich zu denjenigen Werten nach 30-minütiger Inkubation (1 Größenordnung). Hier hatte die 3-fache Inkubationszeit einen großen Einfluss auf die photodynamische Wirkung. Dieser Effekt wurde durch die Anwesenheit von Trehalose weiter verstärkt. Hier lag die Bakterienreduktion bei etwa 3 Größenordnungen. Auch hier könnte die gesteigerte phototoxische Wirkung mit einem potentiellen Verkleben der Nanopartikel auf der Bakterienwand durch Trehalose erklärt werden. Im Vergleich zum gelösten Farbstoff lag auch hier eine reduzierte Photoaktivität nach Bestrahlung vor.

Für die auf eine Farbstoffkonzentration von $1,83 \mu\text{M}$ verdünnte Nanopartikel-Dispersion ließ sich ebenfalls eine gesteigerte Photoaktivität nach 90-minütiger Inkubationszeit beobachten. Die Anwesenheit von Trehalose führte zu einer vollständigen Bakterienreduktion.

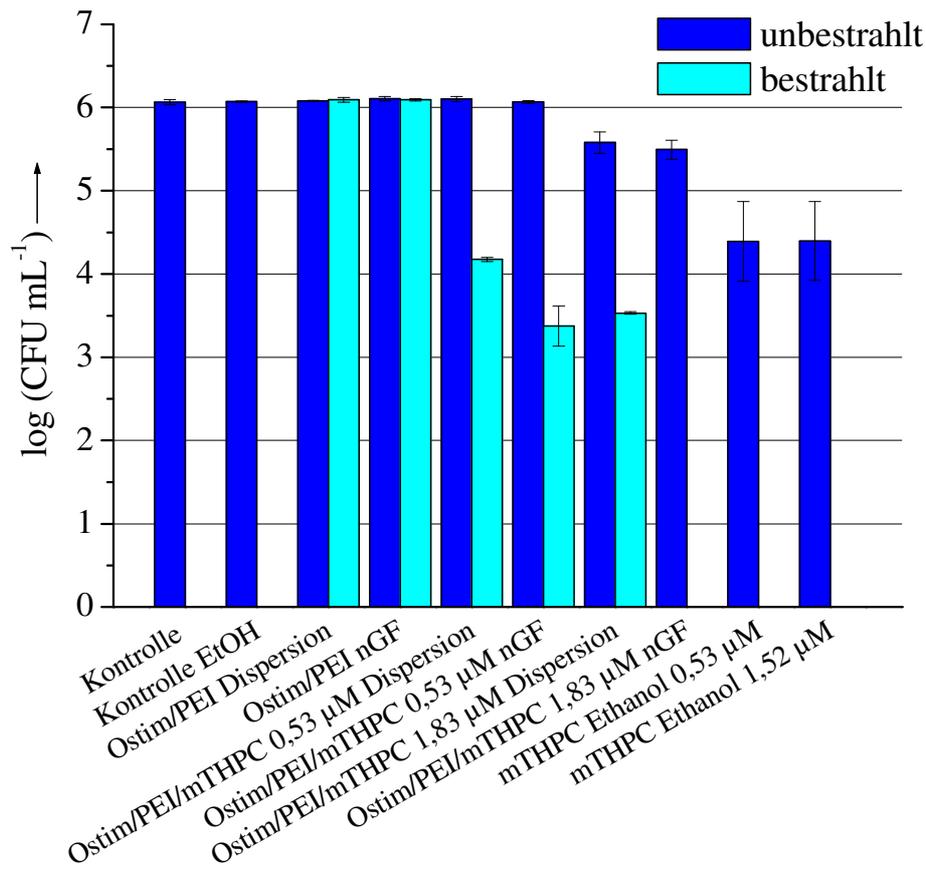


Abbildung 89: Phototoxizitätseigenschaften der PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen vor und nach der Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose am Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* in PBS nach 90-minütiger Inkubation. Als Vergleich sind die Kontrollwerte der Bakterien vor und nach der Bestrahlung mit und ohne Partikelzusatz sowie für den in Ethanol gelösten Farbstoff aufgeführt.

Durch die Kombination einer 90-minütigen Inkubationszeit und dem Zusatz von Trehalose konnte die photodynamische Wirkung der *m*THPC-beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen optimiert werden. Damit war die Wirksamkeit der *m*THPC-beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen mit der photodynamischen Wirksamkeit des freien Farbstoffes vergleichbar.

Ein positiver Nebeneffekt resultierte aus der wesentlich geringeren Dunkeltoxizität der *m*THPC-beladenen Nanopartikel.

Ergebnisse und Diskussion

Zur weiteren Untersuchung wurde die photodynamische Wirkung der Dispersionen an *Pseudomonas aeruginosa* getestet.

Alle in Tabelle 29 aufgeführten Systeme zeigten nach 30- und 90-minütiger Inkubation und anschließender Bestrahlung keine signifikante photodynamische Aktivität. Sowohl die unbeladenen als auch die mit *m*THPC beladenen Nanopartikel zeigten vor und nach der Bestrahlung keine Wirkung auf den Gram-negativen Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa*. Selbst die Anwesenheit von Trehalose zeigte keinen stimulierenden Einfluss auf die Photoaktivität. Hier konnte im Falle des Gram-positiven Bakterienstammes *Staphylococcus aureus* nach 90-minütiger Inkubation eine vollständige Bakterienreduktion verzeichnet werden. Der Farbstoff in ethanolischer Lösung zeigte bei gleicher Konzentration ebenfalls keine photodynamische Wirkung. Die erhöhte Resistenz gegenüber *m*THPC und auch gegenüber dem stäbchenförmigen Träger könnte aus dem komplexen Aufbau der Bakterienwand resultieren, wodurch eine Penetration dieser Systeme herabgesenkt war. Diese Resultate belegten deutlich, dass das hier eingesetzte stäbchenförmige Trägersystem trotz positiver Ladung keine ausreichende phototoxische Wirkung gegenüber dem Gram-negativen Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* nach Bestrahlung erzielte. In allen Phototoxizitätsstudien führte der Zusatz von 10%igem Pferdeserum zu einer vollständigen Reduktion der phototoxischen Wirkung. Der Zusatz des Pferdeserums führte möglicherweise durch die Anwesenheit unterschiedlicher Elektrolyte und Proteine zur Agglomeration der Partikel. Dies führte zum Verlust der photodynamischen Aktivität.

Alle Ergebnisse für *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv) als auch für *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ) nach 30- und 90-minütiger Inkubation und anschließender Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 652 nm sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 29: Zusammenstellung der in PBS durchgeführten Bakterientests für die PEI-stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen für *S. aureus* und *P. aeruginosa*. Es ist jeweils die logarithmierte Zahl der Koloniebildenden Einheiten vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser) für unterschiedliche Inkubationszeiten (*t*) aufgeführt.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / μM	<i>t</i> / min	$\log(\text{CFU mL}^{-1})$		$\log(\text{CFU mL}^{-1})$	
			<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
			DT	Laser	DT	Laser
Kontrolle	-	30	6,07 ± 0,03	-	5,54 ± 0,03	-
		90	6,06 ± 0,03	-	5,62 ± 0,07	-
Ostim/PEI Dispersion	0	30	6,09 ± 0,01	6,11 ± 0,01	5,51 ± 0,02	5,39 ± 0,02
		90	6,08 ± 0,01	6,09 ± 0,03	5,31 ± 0,04	5,55 ± 0,13
Ostim/PEI nGF	0	30	6,09 ± 0,01	6,10 ± 0,01	5,55 ± 0,12	5,41 ± 0,12
		90	6,11 ± 0,03	6,09 ± 0,01	5,39 ± 0,02	5,35 ± 0,07
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC Dispersion	0,53	30	6,07 ± 0,01	5,09 ± 0,04	5,55 ± 0,02	5,50 ± 0,01
		90	6,10 ± 0,03	4,17 ± 0,03	5,66 ± 0,05	5,45 ± 0,06
	1,83	30	6,03 ± 0,03	4,20 ± 0,04	5,59 ± 0,05	5,46 ± 0,05
		90	5,58 ± 0,13	3,53 ± 0,02	5,70 ± 0,06	5,36 ± 0,07
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC nGF	0,53	30	6,06 ± 0,01	4,85 ± 0,05	5,54 ± 0,08	5,57 ± 0,05
		90	6,07 ± 0,02	3,37 ± 0,24	5,52 ± 0,12	5,48 ± 0,10
	1,83	30	5,70 ± 0,03	2,77 ± 0,15	5,56 ± 0,06	5,48 ± 0,03
		90	5,49 ± 0,11	0 ± 0	5,64 ± 0,03	5,52 ± 0,04
<i>m</i> THPC	0,53	30	3,83 ± 0,04	0 ± 0	6,13 ± 0,02	6,06 ± 0,01
		90	4,39 ± 0,48	0 ± 0	6,16 ± 0,02	6,06 ± 0,01
	1,52	30	3,08 ± 0,12	0 ± 0	6,08 ± 0,02	6,10 ± 0,01
		90	4,40 ± 0,47	0 ± 0	6,17 ± 0,02	6,13 ± 0,01

4.3.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die erfolgreiche Darstellung Polymer-stabilisierter Calciumphosphat-Nanopartikel beschrieben, die mit dem kommerziell eingesetzten Photosensibilisator *m*THPC funktionalisiert werden konnten. Alle Systeme wurden mittels kolloid-chemischer Methoden charakterisiert. Der finale Farbstoffgehalt an den Partikeln wurde UV-Vis-spektroskopisch quantifiziert. Die Zusammensetzung aller Partikelsysteme konnte durch Elementaranalyse und Thermogravimetrie bestimmt werden. Der kristalline Charakter wurde mittels Röntgenpulverdiffraktometrie bestimmt.

Die Herstellung erfolgte zunächst an bereits etablierten Partikelsystemen nach Schwiertz *et al.* Als Erweiterung konnte in dieser Arbeit die erfolgreiche Langzeitstabilität durch den Einsatz geeigneter Kryoprotektoren ohne Verlust des kolloidalen Charakters gewährleistet werden.

Die mit Carboxymethylcellulose stabilisierten und mit *m*THPC beladenen Calciumphosphat-Nanopartikel zeigten nach der Lyophilisation in Gegenwart von Lactose gegenüber den J774A.1- sowie den HIG-82-Zellen eine sehr gute photodynamische Wirksamkeit, die mit der Photoaktivität des freien Farbstoffes vergleichbar war. Eine Phototoxizität gegenüber den HT29-Zellen blieb für das in Gegenwart von Lactose lyophilisierte Material und auch für den in Ethanol gelösten Farbstoff aus. Für den Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* konnte nach 90-minütiger Inkubationszeit eine vollständige Bakterienreduktion verzeichnet werden.

Um einen höheren phototoxischen Effekt zu erzielen, wurde nach dem *layer-by-layer*-Verfahren auf die negativ geladenen Partikel eine weitere Schicht von Polyethylenimin aufgetragen. Die zusätzliche Schicht konnte mittels Dynamischer Lichtstreuung und der Umkehr des Zetapotentials von negativ zu positiv gezeigt werden. Für die untersuchten Zelllinien wurde in allen Fällen eine sehr hohe Dunkeltoxizität beobachtet. Dieser Effekt konnte mit dem

Einfluss des Polyethylenimins und der daraus gesteigerten Toxizität erklärt werden.

Neben einer quantitativen Bakterienreduktion an *Staphylococcus aureus* konnte zusätzlich eine verhältnismäßig starke Phototoxizität an dem Gram-negativen Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet werden.

Weiterhin wurden in diesem Kapitel erstmalig Polyethylenimin-stabilisierte und *m*THPC-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel vorgestellt. Das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material zeigte gegenüber den HT29-Zellen eine geringe dunkeltoxische Wirkung und eine starke Phototoxizität. Zudem wurde die phototoxische Wirkung an Cal27- und L929-Zellen untersucht. Auch hier konnte eine starke Phototoxizität, vergleichbar mit dem Farbstoff in ethanolischer Lösung bei gleicher Konzentration gezeigt werden. Gegenüber *Staphylococcus aureus* konnte auch hier eine quantitative Bakterienreduktion nach 90-minütiger Inkubationszeit festgestellt werden. Für *Pseudomonas aeruginosa* blieb dieser Effekt aus.

Im letzten Teil dieses Kapitels wurde der Einsatz des kommerziell erhältlichen Knochenersatzmaterials Ostim[®] als Trägersubstanz für *m*THPC untersucht. Dazu wurde das unfunktionalisierte Ostim[®] zunächst mit Polyethylenimin kolloidal-stabilisiert und im nächsten Schritt die Funktionalisierung mit *m*THPC realisiert. Die Dispersion als auch das in Gegenwart von Trehalose lyophilisierte Material wurde an HT29- und L929-Zellen untersucht. In beiden Fällen konnte eine signifikante Reduktion der Zellvitalität nach Bestrahlung beobachtet werden. Die Resultate waren mit den Ergebnissen des freien Farbstoffes vergleichbar. Für die mit *m*THPC-beladenen Ostim[®]-Nanostäbchen wurde bei gleicher Farbstoffkonzentration eine signifikant geringere Dunkeltoxizität festgestellt. Somit ist die Belastung des hier vorgestellten Trägers bei gleicher Farbstoffkonzentration gegenüber dem umliegenden Gewebe ohne Bestrahlung deutlich geringer.

Ergebnisse und Diskussion

Auch für dieses System konnte eine quantitative Bakterienreduktion an *Staphylococcus aureus* beobachtet werden. Für *Pseudomonas aeruginosa* konnte keine photodynamische Wirkung erzielt werden. Aus zulassungsrechtlicher Sicht birgt das auf Ostim[®] basierende System sicherlich die geringsten Risiken, da das hier eingesetzte Trägermaterial bereits europaweit zugelassen ist. Damit wäre ein neuer Anwendungsbereich für ein bereits seit Jahren zugelassenes System eröffnet.

In Tabelle 30 und 31 sind die aussichtsreichsten *m*THPC-beladenen Trägersysteme für die unterschiedlichen Zelllinien und Bakterienstämme für alle Experimente zusammengefasst.

Tabelle 30: Zusammenfassung der photodynamischen Wirkung ausgewählter *m*THPC-haltiger Partikelsysteme mit variierender *m*THPC-Konzentration gegen unterschiedliche Zelllinien vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser). Alle Experimente wurden in DMEM durchgeführt.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / μM	Zelllinie	Zellvitalität / %	
			DT	Laser
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC nGF	2	HIG-82	120 \pm 15	9 \pm 2
	2	J774A.1	101 \pm 2	7 \pm 12
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC nGF	0,5	HT29	98 \pm 3	23 \pm 19
	0,5	L929	104 \pm 2	14 \pm 13
	0,5	Cal27	110 \pm 9	11 \pm 5
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC_2 nGF	6	L929	100 \pm 3	13 \pm 10

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 31: Zusammenfassung der photodynamischen Wirkung ausgewählter *m*THPC-haltiger Partikelsysteme mit variierender *m*THPC-Konzentration gegen *S. aureus* und *P. aeruginosa* vor (DT) und nach der Bestrahlung (Laser) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (*t*). Alle Experimente wurden in PBS durchgeführt.

System	<i>c</i> (<i>m</i> THPC) / μ M	<i>t</i> / min	Bakterien- stamm	log (CFU mL ⁻¹)	
				DT	Laser
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC/PEI nGF	0,413	90	<i>S. aureus</i>	6,12 ±	0 ± 0
				0,01	
	0,413	90	<i>P. aeruginosa</i>	6,05 ±	5,18 ±
				0,01	0,16
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC	0,357	30	<i>S. aureus</i>	6,12 ±	2,83 ±
				0,01	0,07
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC nGF	0,357	90	<i>S. aureus</i>	6,17 ±	0 ± 0
				0,02	
	0,357	90	<i>P. aeruginosa</i>	6,04 ±	5,69 ±
				0,01	0,05
Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC nGF	0,530	90	<i>S. aureus</i>	6,07 ±	3,37 ±
				0,02	0,24

4.4. Kontinuierliche Fällung Chondroitin-4-sulfat-stabilisierter Calciumphosphat-Nanopartikel

4.4.1 Einführung in die Thematik

Chondroitinsulfat ist ein Biopolymer und wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix im Knochen und im Knorpel.^[231] Es wird sowohl von Osteoblasten als auch von Knorpel-bildenden Zellen, den Chondroblasten, erzeugt und überwiegend aus Knorpelregionen extrahiert.^[232] Im Knorpelgewebe fungiert Chondroitinsulfat als Dämpfer und reduziert die Kompression des Knorpels bei höheren Belastungen.^[233] In diesem Biopolymer sind die Glucuronsäure-Moleküle an die Galactosamin-Moleküle über eine β -1-3-glykosidische Verknüpfung gebunden.^[234] Die Monomereinheit dieses Biopolymers ist in Abbildung 90 schematisch dargestellt.

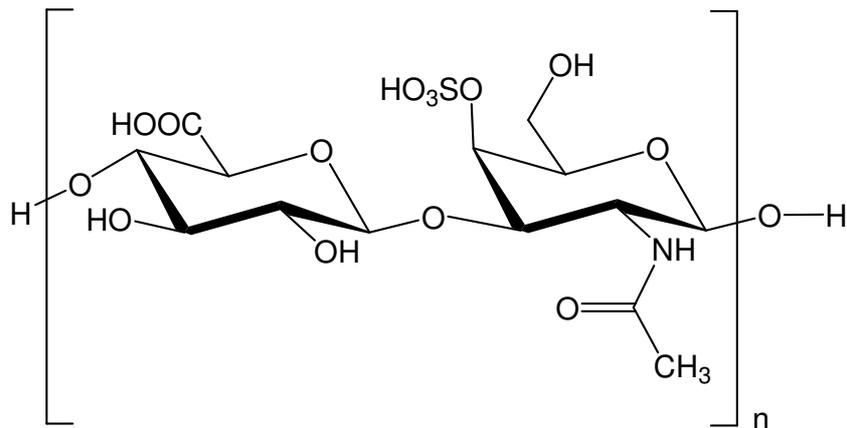


Abbildung 90: Struktur der Monomereinheit von Chondroitin-4-sulfat.

Dieses Biopolymer zeichnet sich aus biologischer Sicht durch eine Vielzahl interessanter Eigenschaften aus. Es wird von einem antiinflammatorischen Charakter und von einer regulierenden Wirkung auf die Neuentwicklung des Nervensystems berichtet.^[235-238] Weiterhin stimulieren mit Chondroitinsulfat funktionalisierte Implantatoberflächen die Osseointegration von knochenbildenden Zellen, was für die Bioverträglichkeit von Implantaten in

unterschiedlichen Regionen von zentraler Bedeutung ist.^[239, 240] Mit Chondroitinsulfat modifizierte Knochenersatzmaterialien weisen eine erhöhte osteoblastäre Aktivität und daher eine Stimulation auf die Bioresorbierbarkeit eines solchen Materials auf.^[241, 242] Die hohe Affinität von Chondroitinsulfat in Verbindung mit Collagen zu Wachstumsfaktoren wie Zytokinen oder *bone morphogenetic proteins* machen diese Substanz für die Behandlung und Rekonstruktion von Knochendefekten und auch für Implantatbeschichtungen besonders interessant.^[243] Eine Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Chondroitinsulfat kann für eine Bioaktivierung von bereits bestehenden Implantaten genutzt werden. So können diese Nanopartikel in biodegradierbare Implantate im Grenzflächen-Bereich zwischen humanem Knochen und der Knorpelregion eingesetzt werden. Hier kann die Calciumphosphat-Komponente den für den Knochenaufbau benötigten Mineralanteil zur Verfügung stellen, während der Chondroitinsulfat-Anteil einen fließenden Übergang in die Knorpelregion gewährleistet.

Aufgrund des entzündungshemmenden Charakters könnte eine mit diesen Nanopartikeln-beladene Wundauflage die Regeneration einer durch Verbrennung geschädigten Dermis ebenfalls stimulieren, wodurch die Wundheilung schneller eintreten würde.

4.4.2 Herstellung und Charakterisierung

Die Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit Chondroitin-4-sulfat erfolgte mit dem in Kapitel 4.1.4.1 dargestellten Fällungsreaktor. Hier wurden die Calcium- und die Phosphatlösungen zunächst im Calciumphosphat-Keimbildungssektor zusammengeführt. Die nachträgliche Funktionalisierung durch Chondroitin-4-sulfat erfolgte durch einen separaten Zufluss. So konnte die Verweilzeit der Calciumphosphat-Keimbildung und der Dosierung des Polymers individuell angepasst werden. Die optimale Calciumphosphat-Keimbildungszeit von 0,25 Sekunden (τ_l) wurde in Kapitel 4.1.4.1 am Beispiel von Carboxymethylcellulose und DNA als Funktionalisierungssysteme diskutiert. Dieser Parameter wurde für die kontinuierliche Fällung zur Darstellung Chondroitin-4-sulfat-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel übernommen. Die Funktionalisierung mit Chondroitin-4-sulfat erfolgte durch Variation der zudosierten Menge an Polymer. Die Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuung sind in Abbildung 91 dargestellt.

Ab einer Pumpgeschwindigkeit von 10 mL min^{-1} (rot) für Chondroitin-4-sulfat wurden monodisperse Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 150 nm erhalten. Der Polydispersitätsindex von 0,136 bestätigte das Vorliegen eines monodispersen Systems. Das Zetapotential von -31 mV deutete auf eine ausreichend elektrosterische Stabilisierung durch das Polymer und die negativen Carboxylat- und Sulfatgruppen hin.

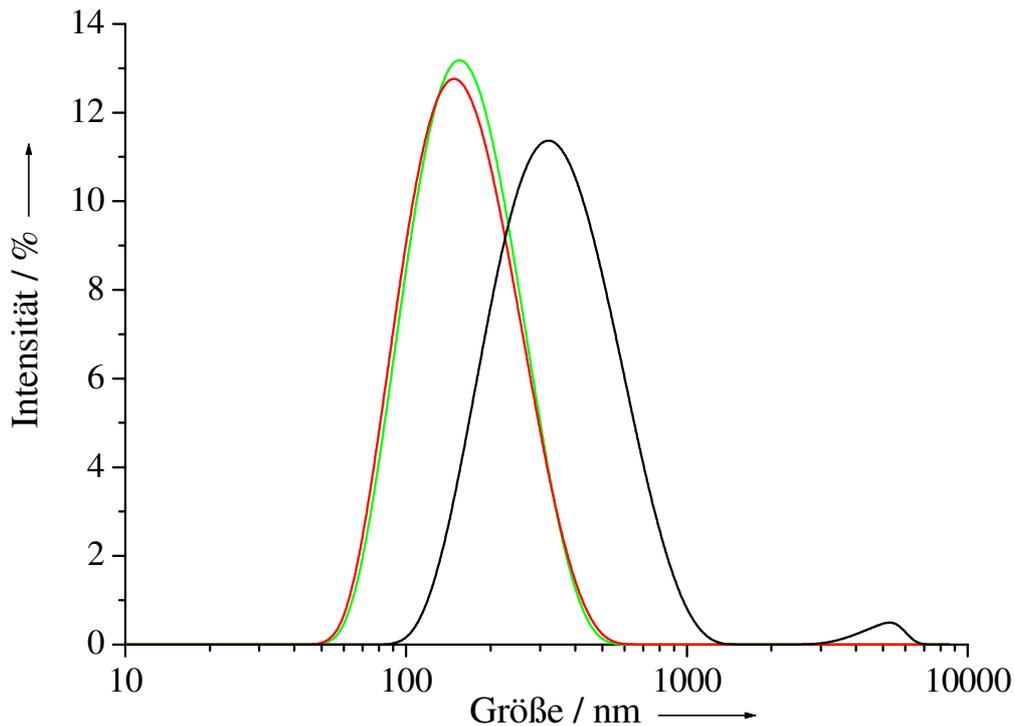


Abbildung 91: Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuung von Chondroitin-4-sulfat-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln bei einer Calciumphosphat-Keimbildungszeit von 0,25 s und einer Polymerzugabegeschwindigkeit von 5 mL min^{-1} (schwarz), 10 mL min^{-1} (rot) und 15 mL min^{-1} (grün).

Zur Entfernung der überschüssigen Polymerkomponente wurden 25 mL der Dispersion für 30 min bei 66000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und der erhaltene Rückstand mit 20 mL Reinstwasser aufgenommen. Zur Redispersion wurde das System für 1 min mittels Ultraschalldispenser behandelt. Die hydrodynamischen Durchmesser vor und nach der Ultrazentrifugation und anschließendem Redispersieren sind in Abbildung 92 dargestellt.

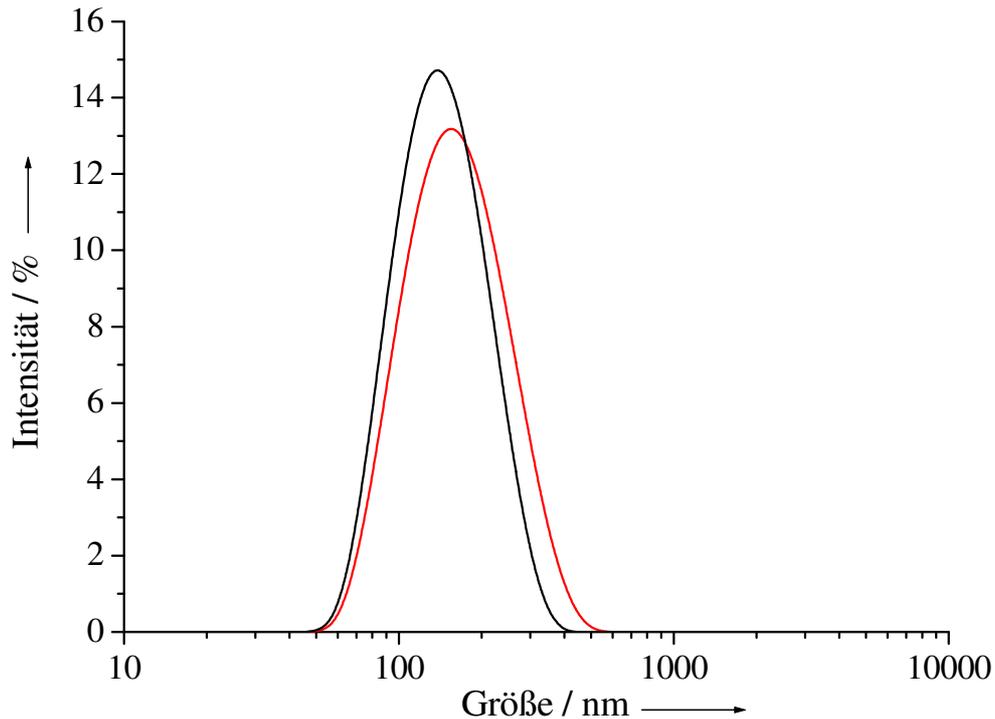


Abbildung 92: Mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilungen von Chondroitin-4-sulfat-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln vor (rot) und nach (schwarz) der Aufreinigung.

Die mittels Dynamischer Lichtstreuung erhaltene Größenverteilung der aufgereinigten (schwarz) zeigte im Vergleich zur unaufgereinigten (rot) Dispersion einen monodisperseren Charakter mit einem Polydispersitätsindex von 0,109. Eine leichte Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers von 150 nm auf 130 nm deutete auf die Entfernung der überschüssigen Polymerkomponenten durch den Aufreinigungsschritt hin. Das Zetapotential der gewaschenen Dispersion betrug -26 mV und bestätigte das Vorliegen einer elektrostatisch stabilisierten Dispersion. Eine sterische Stabilisierung war zudem durch die voluminösen Polymerschleifen gewährleistet.

Zur weiteren Charakterisierung wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der abzentrifugierten und redispergierten Dispersion angefertigt (Abbildung 93).

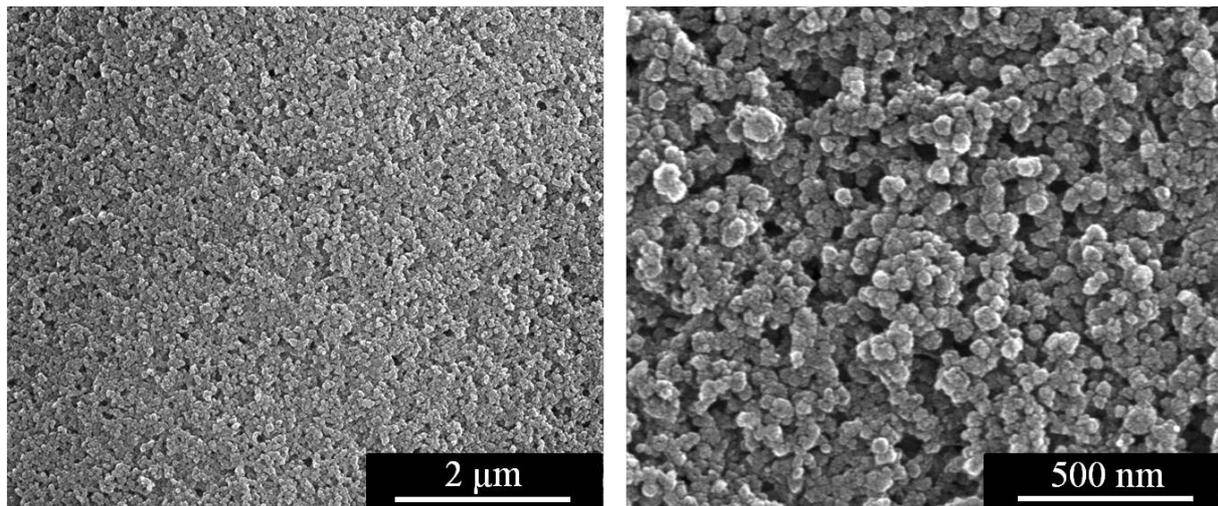


Abbildung 93: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Chondroitin-4-sulfat funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel.

Die in Abbildung 93 dargestellten Partikel zeigen einen monodispersen Charakter mit einer kugelförmigen Morphologie mit Durchmessern von 80 nm bis 100 nm. Die Abweichung zum Ergebnis der Dynamischen Lichtstreuung resultierte aus dem Aufquellen der organischen Schicht im wässrigen Medium. Zusätzlich kam es durch das im Rasterelektronenmikroskop vorliegende Vakuum zum Kollaps der funktionalisierenden Hülle, wodurch lediglich der Calciumphosphat-Kern abgebildet wurde.

Zur weiteren Charakterisierung wurde vom getrockneten Feststoff eine thermogravimetrische Analyse angefertigt (Abbildung 94). Hierzu wurden 30,5 mg des Feststoffs in einen Korund-Tiegel eingewogen und unter Sauerstoffatmosphäre thermisch zersetzt.

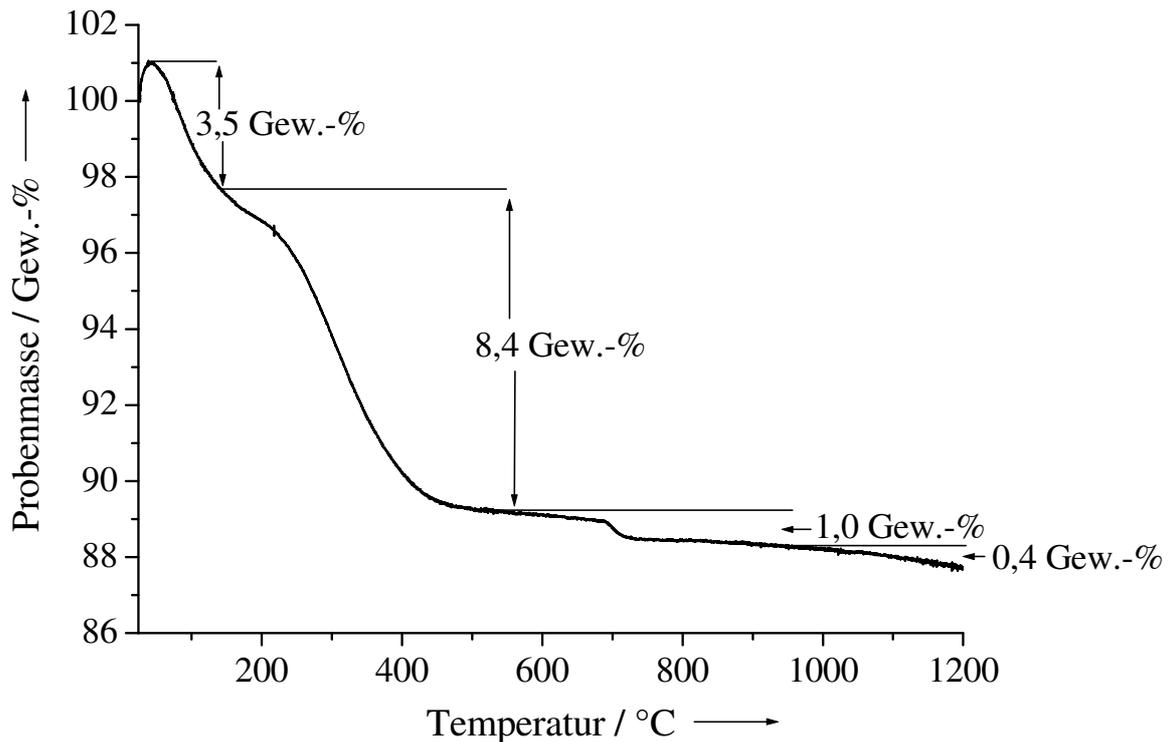


Abbildung 94: Thermogramm der mit Chondroitin-4-sulfat stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikel nach der Aufreinigung. Durchgeführt unter Sauerstoffatmosphäre (50 mL min^{-1}) mit einer Heizrate von 1 K min^{-1} .

Die mit Chondroitin-4-sulfat funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel besaßen nach der Aufreinigung einen Wasseranteil von etwa 3,5 Gew.-%. Im Temperaturbereich von 200 °C bis 900 °C kam es zum Abbrand des organischen Materials. Dieser gliederte sich in zwei Stufen. Die erste Stufe lag im Temperaturbereich zwischen 200 °C und 600 °C (8,4 Gew.-%), die zweite Stufe bei 600 °C bis 900 °C (1,0 Gew.-%). Dieser organische Anteil (9,4 Gew.-%) deutete auf eine elektrosterische Stabilisierung der Partikel im wässrigen Medium hin. Der Mineralgehalt lag bei den Chondroitin-4-sulfat-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln bei 87 Gew.-%. Der Carbonatanteil lag hier bei 0,5 Gew.-%.

Zur Bestimmung der Kristallinität, wurde ein Röntgenpulverdiffraktogramm aufgenommen. Das erhaltene Diffraktogramm sowie die zugehörigen Literaturreflexe für Hydroxylapatit sind in Abbildung 95 dargestellt.

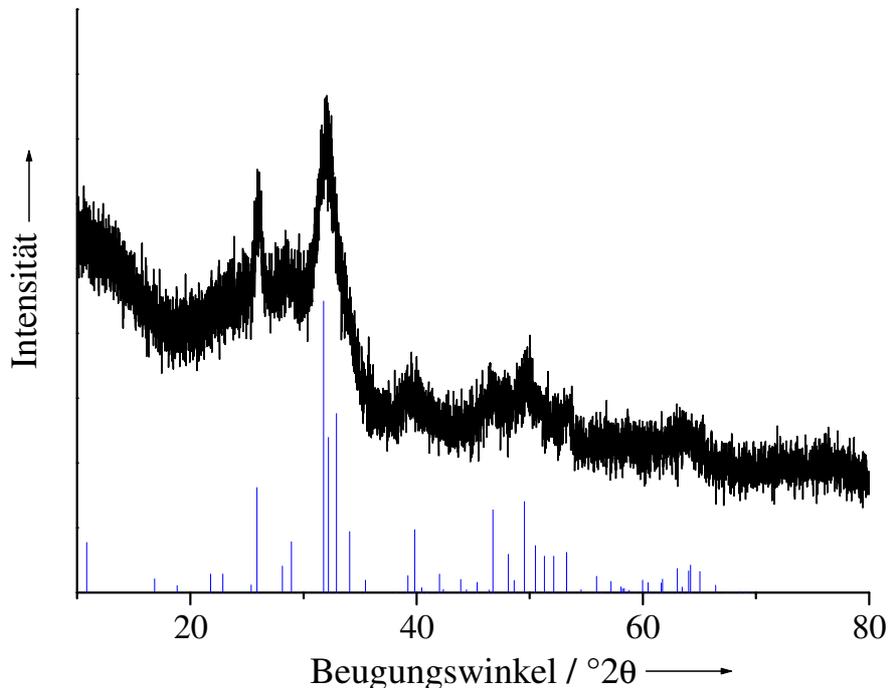


Abbildung 95: Röntgenpulverdiffraktogramm von Chondroitin-4-sulfat-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln sowie die zugehörigen Literaturreflexe für Hydroxylapatit aus der ICDD Datenbank (84-1998).

Das in Abbildung 95 dargestellte Diffraktogramm zeigt verbreiterte Reflexe und deutet auf einen nanokristallinen Charakter der Probe hin. Die erhaltenen Reflexe ließen sich eindeutig den Literaturreflexen für Hydroxylapatit zuordnen. Die Ergebnisse der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie der Nanopartikel sind in Tabelle 32 aufgelistet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 32: Durch Elementaranalyse und Thermogravimetrie ermittelte Zusammensetzung von Chondroitin-4-sulfat-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Komponente	CaP/Chondroitin-4-sulfat
Ca ²⁺ (AAS) / Gew.-%	29,4
PO ₄ ³⁻ (UV) / Gew.-%	44,8
C / Gew.-%	3,8
H / Gew.-%	2,0
N / Gew.-%	1,4
S / Gew.-%	n.n.
Mineralgehalt / Gew.-% (TG)	87,1
Molares Ca/P-Verhältnis	1,56
Organischer Anteil / Gew.-% (TG)	9,4
Carbonatgehalt / Gew.-% (TG)	0,5
Wassergehalt / Gew.-% (TG)	3,5

Das molare Ca/P-Verhältnis lieferte einen Wert von 1,56, der auf calciumdefizitären Hydroxylapatit hinwies.

4.4.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde erstmals die Darstellung Chondroitin-4-sulfat-stabilisierter Calciumphosphat-Nanopartikel durch einen kontinuierlichen Fällungsprozess beschrieben. Dazu wurden zunächst eine Calcium- und eine Phosphat-Lösung über Peristaltikpumpen zusammengeführt. Nachträglich erfolgte die Funktionalisierung durch das Biopolymer Chondroitin-4-sulfat. Die erhaltenen Dispersionen wurden kolloid-chemisch charakterisiert und der monodisperse Charakter demonstriert. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen belegten eine kugelförmige Morphologie der erhaltenen Partikel mit durchschnittlichen Größen von 50 nm bis 100 nm. Der nanokristalline Charakter wurde mittels Röntgenpulverdiffraktometrie bestätigt. Die Zusammensetzung der Chondroitin-4-sulfat-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde mittels Thermogravimetrie und Elementaranalyse bestimmt.

Auf diesem Material aufbauend ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. So kann dieses Material in pastöser Form zur Auffüllung von Knochendefekten dienen. Weiter ist der Einsatz Chondroitin-4-sulfat-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel als biokompatible Implantatbeschichtung denkbar.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Herstellung unterschiedlicher Calciumphosphat-Systeme auf nanopartikulärer Basis und deren Einsatz als Trägermaterial für Biomoleküle und Wirkstoffe diskutiert. Hierbei handelte es sich zum einen um kontinuierlich gefällte Calciumphosphat-Nanopartikel mit kugelförmiger Morphologie, zum anderen um das kommerziell erhältliche Knochenersatzmaterial Ostim[®] mit stäbchenförmiger Morphologie der Firma aap.

Im ersten Teil wurde eine kontinuierliche Fällung Carboxymethylcellulose-stabilisierter und DNA-beladener Calciumphosphat-Nanopartikel realisiert. Die eingestellten Mischungsverhältnisse zwischen dem Biopolymer Carboxymethylcellulose und der verwendeten Nukleinsäure wurden variiert und der adsorbierte DNA-Anteil elementaranalytisch quantifiziert. Weiterhin konnte die Langzeitlagerung durch den Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektoren und anschließender Lyophilisation gezeigt werden. Vor dem Gesichtspunkt der Alterung kolloidaler Dispersionen im wässrigen Medium, gefolgt von der Agglomeration, ist dies ein entscheidender Schritt in die Richtung einer Anwendung in der pharmazeutischen Industrie. Die Übertragung der Resultate mit siRNA (anti-EGFP) an EGFP-exprimierenden HeLa-Zellen zeigte eine signifikante Herunterregulation der EGFP-Expression, was durch die Anwesenheit von Trehalose als Kryoprotektor gesteigert werden konnte.

Des Weiteren wurde die Darstellung von Polyethylenimin-stabilisierten Nanostäbchen basierend auf Ostim[®] realisiert. Die erhaltene kationische Dispersion konnte ebenfalls ohne Verlust des kolloidalen Charakters in Gegenwart von Trehalose lyophilisiert werden. Darüber hinaus wurden Transfektionsresultate mit EGFP-kodierender DNA an HeLa- und MG63-Zellen sowie Gen-Stummschaltungseffizienzen mit siRNA (anti-EGFP) an HeLa-EGFP-Zellen vor und nach der Lyophilisation für unterschiedliche Beladungen

Zusammenfassung

untersucht. Die erhaltenen Effizienzen waren mit denen kommerziell erhältlicher liposomaler Transfektionsreagenzien vergleichbar. Die Zellvitalität war jedoch signifikant höher, was auf die Biokompatibilität des hier vorgestellten Trägersystems zurückzuführen ist. Die Biokompatibilität ist essentiell für einen erfolgreichen Einsatz in der Gen-Therapie.

Weiter wurde der Einsatz von Calciumphosphat-Nanopartikeln als Trägersystem für den bereits zugelassenen Photowirkstoff *mTHPC* untersucht. Dazu wurden die Calciumphosphat-Nanopartikel mit Polyelektrolyten unterschiedlicher Ladung stabilisiert und der Photowirkstoff nachträglich in die Polymerschleifen eingebettet. Eine Umladung negativ geladener Partikel konnte mit Polyethylenimin realisiert werden. Die Stabilisierung der erhaltenen Dispersionen über einen längeren Zeitraum wurde mittels Lyophilisation in Gegenwart geeigneter Kryoprotektoren demonstriert. Die Phototoxizitätsstudien wurden in Kooperation mit der Firma biolitec in Jena an J774A.1-, HIG-82-, L929-, HT29- und Cal27-Zellen durchgeführt. Für die kationischen und mit *mTHPC* beladenen Partikelsysteme konnte nach erfolgter Lyophilisation in Gegenwart von Trehalose eine signifikante Reduktion der HT29- und Cal27-Zellen (Krebszelllinien) nach der Laserbehandlung beobachtet werden. Die Ergebnisse sind vielversprechend, ermöglichen dennoch keine direkte Adressierung in tumoröses Zielgewebe.

Um eine antibakterielle Wirksamkeit nachzuweisen, wurden der Gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* und der Gram-negative Bakterienstamm *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Für den Gram-positiven Bakterienstamm konnte eine vollständige Phototoxizität nach Bestrahlung erzielt werden. Der Gram-negative Bakterienstamm war wesentlich resistenter. Im Großen und Ganzen ist eine signifikante photodynamische Wirksamkeit der hier vorgestellten Träger gegenüber Krebszellen und Bakterien zu verzeichnen. Zusätzlich ist der Einsatz des hydrophoben Farbstoffes *mTHPC* durch dessen

Zusammenfassung

Einlagerung in die stabilisierenden Polymerschichten der Calciumphosphat-Nanopartikel in Wasser realisiert worden.

Im letzten Kapitel wurde erstmals die Darstellung Chondroitin-4-sulfat-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel durch einen kontinuierlichen Fällungsprozess beschrieben. Das eingesetzte Polymer Chondroitin-4-sulfat ist als Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix biokompatibel und verfügt aus biomedizinischer Sicht über viele regulierende Eigenschaften. Die erhaltenen Partikel wurden mittels kolloid-chemischer Methoden vollständig charakterisiert. Die Zusammensetzung der erhaltenen Partikel wurde elementaranalytisch und thermogravimetrisch bestimmt. Ein Einsatz dieser Nanopartikel als Implantatbeschichtung oder zur Auffüllung und Rekonstruktion von Knochendefekten ist somit durchaus denkbar.

6 Literatur

- [1] B. V. Derjaguin, *Theory of Stability of Colloids and thin films*, Plenum Press, New York, **1989**.
- [2] H. D. Dörfler, *Grenzflächen und Kolloidchemie*, VCH, Weinheim, **1994**.
- [3] G. Lagaly, O. Schulz, R. Zimehl, *Dispersionen und Emulsionen*, Steinkopff, Darmstadt, **1997**.
- [4] F. Caruso, *Colloids and Colloid Assemblies*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [5] D. H. Everett, *Grundzüge der Kolloidwissenschaft*, Steinkopff, Darmstadt, **1992**.
- [6] H. Chang, X. Q. Chen, C. S. Jwo, S. L. Chen, *Mater. Trans.* **2009**, *50*, 2098.
- [7] J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6144.
- [8] Malvern-Instruments, *Zetasizer nano series, user manual*, **2003**.
- [9] I. S. Zuhorn, J. B. F. N. Engberts, D. Hoekstra, *Eur. Biophys. J.* **2007**, *36*, 349.
- [10] J. Kurreck, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378.
- [11] S. Neumann, A. Kovtun, I. D. Dietzel, M. Epple, R. Heumann, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6794.
- [12] M. Epple, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, V. Sokolova, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 18.
- [13] E. Klein, C. Leborgne, M. Ciobanu, J. Klein, B. Frisch, F. Pons, G. Zuber, D. Scherman, A. Kichler, L. Lebeau, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4781.
- [14] D. Reischl, A. Zimmer, *Nanomedicine* **2009**, *5*, 8.
- [15] D. Lechardeur, K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich, G. L. Lukacs, *Gene Ther.* **1999**, *6*, 482.
- [16] D. Luo, W. M. Saltzman, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 33.
- [17] R. J. Lee, L. Huang, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1997**, *14*, 173.
- [18] I. M. Verma, N. Somia, *Nature* **1997**, *389*, 239.
- [19] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1382.
- [20] D. J. Glover, H. J. Lipps, D. A. Jans, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 299.
- [21] F. Liu, L. Huang, *J. Controlled Release* **2002**, *78*, 259.

- [22] H. Kotani, P. B. Newton III, S. Zhang, Y. L. Chiang, E. Otto, L. Weaver, R. M. Blaese, W. F. Anderson, G. J. McGarrity, *Hum. Gene Ther.* **1994**, *5*, 19.
- [23] F. D. Bushman, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 2083.
- [24] P. J. Gough, E. W. Raines, *Curr. Opin. Lipidol.* **2003**, *14*, 491.
- [25] H. Ishii, K. R. Dumon, A. Vecchione, F. Trapasso, K. Mimori, H. Alder, M. Mori, G. Sozzi, R. Baffa, K. Huebner, C. M. Croce, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1578.
- [26] L. M. Kasman, S. Barua, P. Lu, K. Rege, C. Voelkel-Johnson, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 1612.
- [27] D. J. Orlicky, J. Schaack, *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 460.
- [28] K. R. G. Martin, R. L. Klein, H. A. Quigley, *Methods* **2002**, *28*, 267.
- [29] S. K. McLaughlin, P. Collis, P. L. Hermonat, N. Muzyczka, *J. Virol.* **1988**, *62*, 1963.
- [30] K. J. Fisher, K. Jooss, J. Alston, Y. Yang, S. E. Haecker, K. High, R. Pathak, S. E. Raper, J. M. Wilson, *Nat. Med.* **1997**, *3*, 306.
- [31] P. D. Robbins, S. C. Ghivizzani, *Pharmacol. Ther.* **1998**, *80*, 35.
- [32] M. Thomas, A. M. Klibanov, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 27.
- [33] G. Chu, H. Hayakawa, P. Berg, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1311.
- [34] G. L. Andreason, G. A. Evans, *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 269.
- [35] M. Cemazar, G. Sersa, J. M. Wilson, G. M. Tozer, S. L. Hart, A. Grosel, G. U. Dachs, *Cancer Gene Ther.* **2002**, *9*, 399.
- [36] G. Scangos, F. H. Ruddle, *Gene* **1981**, *14*, 1.
- [37] M. R. Capecchi, *Cell* **1980**, *22*, 479.
- [38] Y. M. Shen, R. R. Hirschhorn, W. E. Mercer, E. Surmacz, Y. Tsutsui, K. J. Soprano, R. Baserga, *Mol. Cell. Biol.* **1982**, *2*, 1145.
- [39] A. Boyd, *Methods Cell Sci.* **2002**, *24*, 115.
- [40] E. F. Fynan, R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro, H. L. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 11478.
- [41] A. L. Rakhmievich, J. Turner, M. J. Ford, D. McCabe, W. H. Sun, P. M. Sondel, K. Grota, N. S. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 6291.
- [42] J. Dileo, T. E. Miller Jr., S. Chesnoy, L. Huang, *Hum. Gene Ther.* **2003**, *14*, 79.
- [43] M. Nishikawa, L. Huang, *Hum. Gene Ther.* **2001**, *12*, 861.
- [44] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H. P. Elsasser, T. Kissel, *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1273.
- [45] J. A. Wolff, D. B. Rozema, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 8.

- [46] Z. Liu, M. Zheng, F. Meng, Z. Zhong, *Biomaterials* **2011**, 32, 9109.
- [47] A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 543.
- [48] L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R. S. Langer, O. C. Farokhzad, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, 83, 761.
- [49] K. K. Sandhu, C. M. McIntosh, J. M. Simard, S. W. Smith, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 3.
- [50] N. L. Rosi, D. A. Giljohann, C. S. Thaxton, A. K. R. Lytton-Jean, M. S. Han, C. A. Mirkin, *Science* **2006**, 312, 1027.
- [51] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, P. C. Patel, J. E. Millstone, N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2007**, 7, 3818.
- [52] C. Kneuer, M. Sameti, U. Bakowsky, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, C. M. Lehr, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 926.
- [53] R. A. Gemeinhart, D. Luo, W. M. Saltzman, *Biotechnol. Prog.* **2005**, 21, 532.
- [54] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri, V. S. Y. Lin, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, 17, 1225.
- [55] D. Pantarotto, R. Singh, D. McCarthy, M. Erhardt, J. P. Briand, M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 5242.
- [56] W. Yang, P. Thordarson, J. J. Gooding, S. P. Ringer, F. Braet, *Nanotechnology* **2007**, 18, 1.
- [57] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36, 167.
- [58] C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36, 198.
- [59] F. L. Graham, A. J. van der Eb, *Virology* **1973**, 52, 456.
- [60] Y. Liu, T. Wang, F. He, Q. Liu, D. Zhang, S. Xiang, S. Su, J. Zhang, *Int. J. Nanomed.* **2011**, 6, 721.
- [61] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 3130.
- [62] J. A. Juhasz, S. M. Best, *J. Mater. Sci.* **2012**, 47, 610.
- [63] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, Teubner, Wiesbaden, **2003**.
- [64] D. Olton, J. Li, M. E. Wilson, T. Rogers, J. Close, L. Huang, P. N. Kumta, C. Sfeir, *Biomaterials* **2007**, 28, 1267.
- [65] R. Gonzalez-McQuire, D. W. Green, K. A. Partridge, R. O. C. Oreffo, S. Mann, S. A. Davis, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 2236.
- [66] A. Maitra, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2005**, 5, 893.

- [67] I. Roy, S. Mitra, A. Maitra, S. Mozumdar, *Int. J. Pharm.* **2003**, *250*, 25.
- [68] V. Sokolova, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, H. Coelfen, H. Rehage, A. Shukla, M. Epple, *Materialwiss. Werkstofftech.* **2006**, *37*, 441.
- [69] V. Sokolova, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, **2006**.
- [70] V. Sokolova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 4029.
- [71] M. D. Brown, A. G. Schatzlein, I. F. Uchegbu, *Int. J. Pharm.* **2001**, *229*, 1.
- [72] L. Hu, Z. Mao, C. Gao, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3108.
- [73] R. Kircheis, L. Wightman, E. Wagner, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53*, 341.
- [74] A. Fire, S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806.
- [75] G. J. Hannon, *Nature* **2002**, *418*, 244.
- [76] S. M. Hammond, A. A. Caudy, G. J. Hannon, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 110.
- [77] E. G. Moss, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 772.
- [78] M. Chopra, C. Pachuk, C. Satishchandran, T. Giordano, *Targets* **2002**, *1*, 102.
- [79] H. Siomi, M. C. Siomi, *Nature* **2009**, *457*, 396.
- [80] C. X. Li, A. Parker, E. Menocal, S. Xiang, L. Borodyansky, J. H. Fruehauf, *Cell Cycle* **2006**, *5*, 2103.
- [81] S. S. Ryazansky, V. A. Gvozdev, *Biochemistry* **2008**, *73*, 514.
- [82] N. Agrawal, P. V. N. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, S. K. Mukherjee, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 657.
- [83] V. V. Kuznetsov, *Biochemistry* **2003**, *68*, 1063.
- [84] D. H. Kim, J. J. Rossi, *Biotechniques* **2008**, *44*, 613.
- [85] A. S. Abdolhamid, S. S. Hedayati, R. H. Poor, S. Madani, S. S. Poor, S. Panahi, *J. Genet.* **2010**, *89*, 527.
- [86] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494.
- [87] M. Izquierdo, *Cancer Gene Ther.* **2005**, *12*, 217.
- [88] M. A. Matzke, J. A. Birchler, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 24.
- [89] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliansky, D. W. Y. Sah, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 711.
- [90] M. N. Rosso, J. T. Jones, P. Abad, *Annu. Rev. Phytopathol.* **2009**, *47*, 207.
- [91] S. M. Hammond, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5822.

- [92] K. Kim, Y. S. Lee, R. W. Carthew, *RNA* **2007**, *13*, 22.
- [93] M. Ghildiyal, P. D. Zamore, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 94.
- [94] J. B. Preall, E. J. Sontheimer, *Cell* **2005**, *123*, 543.
- [95] G. Ramaswamy, F. J. Slack, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1053.
- [96] S. M. Hammond, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 63.
- [97] M. Tijsterman, R. H. A. Plasterk, *Cell* **2004**, *117*, 1.
- [98] S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, *Nature* **2000**, *404*, 293.
- [99] A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe, *Science* **1999**, *286*, 950.
- [100] D. Tadic, F. Peters, M. Epple, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2553.
- [101] T. Welzel, W. Meyer-Zaika, M. Epple, *Chem. Commun.* **2004**, 1204.
- [102] H. Urch, S. Franzka, D. Dahlhaus, N. Hartmann, E. Hasselbrink, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1798.
- [103] K. Ganesan, A. Kovtun, S. Neumann, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3655.
- [104] T. Welzel, I. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2213.
- [105] J. Klesing, Diplomarbeit, Universität Duisburg-Essen, **2009**.
- [106] J. Schwiertz, A. Wiehe, S. Graefe, B. Gitter, M. Epple, *Biomaterials* **2009**, *30*, 3324.
- [107] K. B. Cederquist, C. D. Keating, *ACS Nano* **2009**, *3*, 256.
- [108] J. B. Heng, A. Aksimentiev, C. Ho, P. Marks, Y. V. Grinkova, S. Sligar, K. Schulten, G. Timp, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1098.
- [109] S. J. Prestrelski, T. Arakawa, J. F. Carpenter, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 465.
- [110] W. Wang, *Int. J. Pharm.* **2000**, *203*, 1.
- [111] T. Arakawa, S. J. Prestrelski, W. C. Kenney, J. F. Carpenter, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1993**, *10*, 1.
- [112] R. Markham, J. D. Smith, *Biochem. J.* **1952**, *52*, 552.
- [113] J. Florian, A. Warshel, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5473.
- [114] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1688.
- [115] F. T. Zohra, E. H. Chowdhury, T. Akaike, *Biomaterials* **2009**, *30*, 4006.
- [116] J. Beirowski, S. Inghelbrecht, A. Arien, H. Gieseler, *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 1958.
- [117] C. Schwarz, W. Mehnert, *Int. J. Pharm.* **1997**, *157*, 171.
- [118] M. K. Lee, M. Y. Kim, S. Kim, J. Lee, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 4808.

- [119] Y. I. Jeong, Y. H. Shim, C. Kim, G. T. Lim, K. C. Choi, C. Yoon, *J. Microencapsulation* **2005**, *22*, 593.
- [120] Z. Cui, C. H. Hsu, R. J. Mumper, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2003**, *29*, 689.
- [121] S. Hirsjarvi, L. Peltonen, L. Kainu, J. Hirvonen, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 3110.
- [122] V. V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Epple, *Biomaterials* **2006**, *27*, 3147.
- [123] T. J. Anchordoquy, J. F. Carpenter, D. J. Kroll, *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *348*, 199.
- [124] S. D. Allison, T. J. Anchordoquy, *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 682.
- [125] V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E. A. Kubareva, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 721.
- [126] A. Kovtun, R. Heumann, M. Epple, *Bio-Med. Mater. Eng.* **2009**, *19*, 241.
- [127] W. C. Tseng, C. H. Tang, T. Y. Fang, L. Y. Su, *J. Gene Med.* **2007**, *9*, 659.
- [128] W. C. Tseng, C. H. Tang, T. Y. Fang, L. Y. Su, *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 1297.
- [129] C. S. Pereira, R. D. Lins, I. Chandrasekhar, L. C. G. Freitas, P. H. Huenenberger, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2273.
- [130] S. B. Leslie, E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, L. M. Crowe, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3592.
- [131] A. D. Elbein, Y. T. Pan, I. Pastuszak, D. Carroll, *Glycobiology* **2003**, *13*, 17.
- [132] J. C. Arguelles, *Arch. Microbiol.* **2000**, *174*, 217.
- [133] M. V. Berridge, A. S. Tan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 474.
- [134] D. Busenlechner, S. Tangl, B. Mair, G. Fugger, R. Gruber, H. Redl, G. Watzek, *Biomaterials* **2008**, *29*, 3195.
- [135] D. Tadic, M. Epple, *Biomaterials* **2004**, *25*, 987.
- [136] R. Smeets, M. B. Grosjean, G. Jelitte, M. Heiland, A. Kasaj, D. Riediger, M. Yildirim, H. Spiekermann, O. Maciejewski, *Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.* **2008**, *118*, 203.
- [137] A. Kasaj, B. Willershausen, C. Reichert, B. Rohrig, R. Smeets, M. Schmidt, *J. Oral Sci.* **2008**, *50*, 279.
- [138] F. X. Huber, I. Berger, N. McArthur, C. Huber, H. P. Kock, J. Hillmeier, P. J. Meeder, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 33.

- [139] J. J. C. Arts, N. Verdonschot, B. W. Schreurs, P. Buma, *Biomaterials* **2006**, *27*, 1110.
- [140] C. K. G. Spies, S. Schnurer, T. Gotterbarm, S. Breusch, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **2009**, *129*, 979.
- [141] D. Carmagnola, S. Abati, S. Celestino, M. Chiapasco, D. Bosshardt, N. P. Lang, *Clin. Oral Implants Res.* **2008**, *19*, 1246.
- [142] K. L. Gerlach, D. Niehues, *Mund Kiefer Gesichtschir.* **2007**, *11*, 131.
- [143] H. I. Elsner, E. B. Lindblad, *DNA* **1989**, *8*, 697.
- [144] M. M. Rageh, A. El-Lakkani, M. H. M. Ali, A. M. M. Abd El-Fattah, R. A. El-Ghreeb, *Int. J. Phys. Sci.* **2009**, *4*, 63.
- [145] M. Elfinger, C. Pfeifer, S. Uezguen, M. M. Golas, B. Sander, C. Maucksch, H. Stark, M. K. Aneja, C. Rudolph, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2912.
- [146] S. Son, W. J. Kim, *Biomaterials* **2010**, *31*, 133.
- [147] S. O. Han, R. I. Mahato, Y. K. Sung, S. W. Kim, *Mol. Ther.* **2000**, *2*, 302.
- [148] G. Sahay, D. Y. Alakhova, A. V. Kabanov, *J. Controlled Release* **2010**, *145*, 182.
- [149] A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, R. S. Langer, *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 657.
- [150] A. Kichler, C. Leborgne, E. Coeytaux, O. Danos, *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 135.
- [151] L. Parhamifar, A. K. Larsen, A. C. Hunter, T. L. Andresen, S. M. Moghimi, *Soft Matter* **2010**, *6*, 4001.
- [152] V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Sci.* **2010**, *45*, 4952.
- [153] S. E. Lee, D. Y. Sasaki, T. D. Perroud, D. Yoo, K. D. Patel, L. P. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14066.
- [154] A. Guenther, P. Bender, A. Tschoepe, R. Birringer, *J. Phys.: Condens. Matter* **2011**, *23*, 325103/1.
- [155] M. Thomas, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 9138.
- [156] C. Hu, Q. Peng, F. Chen, Z. Zhong, R. Zhuo, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 836.
- [157] M. Arsianti, M. Lim, C. P. Marquis, R. Amal, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2521.
- [158] W. T. He, Y. N. Xue, N. Peng, W. M. Liu, R. X. Zhuo, S. W. Huang, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 10496.

- [159] B. G. de Geest, G. B. Sukhorukov, H. Moehwald, *Expert Opin. Drug Delivery* **2009**, *6*, 613.
- [160] T. Boudou, T. Crouzier, K. Ren, G. Blin, C. Picart, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 441.
- [161] W. Tong, C. Gao, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3799.
- [162] R. von Klitzing, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 5012.
- [163] T. Xia, M. Kovoichich, M. Liong, H. Meng, S. Kabehie, S. George, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2009**, *3*, 3273.
- [164] M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, J. P. Benoit, *Biomaterials* **2008**, *29*, 3477.
- [165] K. Kodama, Y. Katayama, Y. Shoji, H. Nakashima, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2155.
- [166] I. R. Gilmore, S. P. Fox, A. J. Hollins, S. Akhtar, *Curr. Drug Delivery* **2006**, *3*, 147.
- [167] W. J. Song, J. Z. Du, T. M. Sun, P. Z. Zhang, J. Wang, *Small* **2010**, *6*, 239.
- [168] J. Schwiertz, W. Meyer-Zaika, L. Ruiz-Gonzalez, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3831.
- [169] A. Elbakry, A. Zaky, R. Liebl, R. Rachel, A. Goepferich, M. Breunig, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2059.
- [170] R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon & Breach, London, **2000**.
- [171] R. Ideta, F. Tasaka, W. D. Jang, N. Nishiyama, G. D. Zhang, A. Harada, Y. Yanagi, Y. Tamaki, T. Aida, K. Kataoka, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2426.
- [172] Y. Cheng, A. C. Samia, J. D. Meyers, I. Panagopoulos, B. Fei, C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10643.
- [173] T. Y. Ohulchansky, I. Roy, L. N. Goswami, Y. Chen, E. J. Bergey, R. K. Pandey, A. R. Oseroff, P. N. Prasad, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2835.
- [174] M. R. Hamblin, T. Hasan, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 436.
- [175] P. G. Calzavara-Pinton, M. Venturini, R. Sala, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2007**, *21*, 293.
- [176] A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, A. T. Byrne, *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053.
- [177] J. D. Bhawalkar, N. D. Kumar, C. F. Zhao, P. N. Prasad, *J. Clin. Laser. Med. Surg.* **1997**, *15*, 201.
- [178] R. Bonnett, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 19.
- [179] S. Wang, R. Gao, F. Zhou, M. Selke, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 487.

- [180] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889.
- [181] D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380.
- [182] R. Bonnett, G. Martinez, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9513.
- [183] Z. Huang, *Technol. Cancer Res. Treat.* **2005**, *4*, 283.
- [184] C. H. Sibata, V. C. Colussi, N. L. Oleinick, T. J. Kinsella, *Expert Opin. Pharmacother.* **2001**, *2*, 917.
- [185] H. I. Pass, *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, *85*, 443.
- [186] A. Juarranz, P. Jaen, F. Sanz-Rodriguez, J. Cuevas, S. Gonzalez, *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10*, 148.
- [187] F. S. De Rosa, M. V. L. B. Bentley, *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1447.
- [188] A. Sasnauskiene, J. Kadziauskas, N. Vezelyte, V. Jonusiene, V. Kirveliene, *Apoptosis* **2009**, *14*, 276.
- [189] M. E. Wieder, D. C. Hone, M. J. Cook, M. M. Handsley, J. Gavrilovic, D. A. Russell, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 727.
- [190] I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, E. J. Bergey, A. R. Oseroff, J. Morgan, T. J. Dougherty, P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7860.
- [191] K. Loew, T. Knobloch, S. Wagner, A. Wiehe, A. Engel, K. Langer, H. von Briesen, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 1.
- [192] D. Dye, J. Watkins, *Br. Med. J.* **1980**, *280*, 1353.
- [193] V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 145.
- [194] M. O. Senge, J. C. Brandt, *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87*, 1240.
- [195] J. Taillefer, N. Brasseur, J. E. van Lier, V. Lenaerts, D. le Garrec, J. C. Leroux, *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 155.
- [196] C. Compagnin, L. Bau, M. Mognato, L. Celotti, G. Miotto, M. Arduini, F. Moret, C. Fede, F. Selvestrel, E. I. M. Rio, F. Mancin, E. Reddi, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 1.
- [197] P. Couleaud, V. Morosini, C. Frochot, S. Richeter, L. Raehm, J. O. Durand, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1083.
- [198] L. Zhou, W. Wang, S. H. Wei, Y. Y. Feng, J. H. Zhou, J. H. Liu, J. Shen, *J. Porous Mater.* **2011**, *18*, 517.
- [199] J. Klesing, A. Wiehe, B. Gitter, S. Graefe, M. Epple, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21*, 887.
- [200] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, *Laser Med. Sci.* **2009**, *24*, 259.

- [201] C. Compagnin, F. Moret, L. Celotti, G. Miotto, J. H. Woodhams, A. J. MacRobert, D. Scheglmann, S. Iratni, E. Reddi, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1751.
- [202] K. J. Lorenz, H. Maier, *HNO* **2008**, *56*, 402.
- [203] E. D. Sternberg, D. Dolphin, C. Bruckner, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4151.
- [204] P. A. Jacobi, S. Lanz, I. Ghosh, S. H. Leung, F. Loewer, D. Pippin, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 831.
- [205] J. Ferreira, P. F. C. Menezes, C. Kurachi, C. Sibata, R. R. Allison, V. S. Bagnato, *Laser Phys. Lett.* **2008**, *5*, 156.
- [206] Z. Dai, A. Voigt, S. Leporatti, E. Donath, L. Dahne, H. Mohwald, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1339.
- [207] C. S. Peyratout, L. Daehne, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 3762.
- [208] J. Schwiertz, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, **2008**.
- [209] D. Chandler, *Nature* **2005**, *437*, 640.
- [210] D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, M. R. Boyd, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4827.
- [211] A. Bajaj, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1640.
- [212] A. E. Ewence, M. Bootman, H. L. Roderick, J. N. Skepper, G. McCarthy, M. Epple, M. Neumann, C. M. Shanahan, D. Proudfoot, *Circ. Res.* **2008**, *103*, 28.
- [213] M. Motskin, D. M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T. G. Gard, A. E. Porter, J. N. Skepper, *Biomaterials* **2009**, *30*, 3307.
- [214] V. Engelhardt, B. Krammer, K. Plaetzer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 365.
- [215] A. S. Garcez, M. S. Ribeiro, G. P. Tegos, S. C. Nunez, A. O. C. Jorge, M. R. Hamblin, *Lasers Surg. Med.* **2007**, *39*, 59.
- [216] A. Shkilnyy, A. Friedrich, B. Tiersch, S. Schoene, M. Fechner, J. Koetz, C. W. Schlaepfer, A. Taubert, *Langmuir* **2008**, *24*, 2102.
- [217] H. Urch, M. Vallet-Regi, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2166.
- [218] M. Epple, M. Neumeier, D. Doerr, R. LeHarzic, D. Sauer, F. Stracke, H. Zimmermann, *Materialwiss. Werkstofftech.* **2011**, *42*, 50.
- [219] J. D. Chen, Y. J. Wang, K. Wei, S. H. Zhang, X. T. Shi, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2275.

- [220] I. S. Neira, Y. V. Kolen'ko, O. I. Lebedev, G. Van Tendeloo, H. S. Gupta, F. Guitian, M. Yoshimura, *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 466.
- [221] X. Lu, H. Zhang, Y. Guo, Y. Wang, X. Ge, Y. Leng, F. Watari, *Cryst. Eng. Comm.* **2011**, *13*, 3741.
- [222] A. Lak, M. Mazloumi, M. S. Mohajerani, S. Zanganeh, M. R. Shayegh, A. Kajbafvala, H. Arami, S. K. Sadrnezhaad, *J. Am. Ceram. Soc.* **2008**, *91*, 3580.
- [223] X. Du, Y. Chu, S. Xing, L. Dong, *J. Mater. Sci.* **2009**, *44*, 6273.
- [224] M. J. Shieh, C. L. Peng, W. L. Chiang, C. H. Wang, C. Y. Hsu, S. J. J. Wang, P. S. Lai, *Mol. Pharmaceutics* **2010**, *7*, 1244.
- [225] O. Bourdon, V. Mosqueira, P. Legrand, J. Blais, *J. Photochem. Photobiol., B* **2000**, *55*, 164.
- [226] C. L. Peng, L. Y. Yang, T. Y. Luo, P. S. Lai, S. J. Yang, W. J. Lin, M. J. Shieh, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 1.
- [227] L. Jiang, N. Ji, Y. Zhou, J. Li, X. Liu, Z. Wang, Q. Chen, X. Zeng, *Oral. Oncol.* **2009**, *45*, 204.
- [228] C. Bombelli, F. Bordi, S. Ferro, L. Giansanti, G. Jori, G. Mancini, C. Mazzuca, D. Monti, F. Ricchelli, S. Sennato, M. Venanzi, *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5*, 672.
- [229] J. Klesing, S. Chernousova, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 199.
- [230] A. Gee, V. R. Deitz, *Anal. Chem.* **1953**, *25*, 1320.
- [231] S. H. Rhee, J. Tanaka, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13*, 597.
- [232] J. P. Bali, H. Cousse, E. Neuzil, *Semin. Arthritis Rheum.* **2001**, *31*, 58.
- [233] S. A. Baeurle, M. G. Kiselev, E. S. Makarova, E. A. Nogovitsin, *Polymer* **2009**, *50*, 1805.
- [234] P. A. S. Mourao, M. S. Pereira, M. S. G. Pavao, B. Mulloy, D. M. Tollefsen, M. C. Mowinckel, U. Abildgaard, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23973.
- [235] P. A. Brittis, D. R. Canning, J. Silver, *Science* **1992**, *255*, 733.
- [236] D. A. Wang, S. Varghese, B. Sharma, I. Strehin, S. Fermanian, J. Gorham, D. H. Fairbrother, B. Cascio, J. H. Elisseeff, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 385.
- [237] F. Ronca, L. Palmieri, P. Panicucci, G. Ronca, *Osteoarthr. Cartil.* **1998**, *6*, 14.
- [238] W. Schneiders, A. Reinstorf, M. Ruhnaw, S. Rehberg, J. Heineck, I. Hinterseher, A. Biewener, H. Zwipp, S. Rammelt, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2008**, *85A*, 638.

- [239] B. Stadlinger, S. Bierbaum, S. Grimmer, M. C. Schulz, E. Kuhlisch, D. Scharnweber, U. Eckelt, R. Mai, *J. Clin. Periodontol.* **2009**, *36*, 698.
- [240] B. Stadlinger, E. Pilling, R. Mai, S. Bierbaum, R. Berhardt, D. Scharnweber, U. Eckelt, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 1043.
- [241] F. Tamimi-Marino, J. Mastio, C. Rueda, L. Blanco, E. Lopez-Cabarcos, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 1195.
- [242] W. Schneiders, A. Reinstorf, A. Biewener, A. Serra, R. Grass, M. Kinscher, J. Heineck, S. Rehberg, H. Zwipp, S. Rammelt, *J. Orthop. Res.* **2009**, *27*, 15.
- [243] S. Rammelt, T. Illert, S. Bierbaum, D. Scharnweber, H. Zwipp, W. Schneiders, *Biomaterials* **2006**, *27*, 5561.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaar
Cal27	Humane Tumorfibroblasten-Zelllinie
CaP	Calciumphosphat
CaP/CMC/DNA	CMC-stabilisierte und DNA-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel
CaP/CMC/siRNA	CMC-stabilisierte und siRNA-beladene Calciumphosphat-Nanopartikel
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC	CMC-stabilisierte und mit <i>m</i> THPC beladene Calciumphosphat-Nanopartikel
CaP/CMC/ <i>m</i> THPC/PEI	CMC-stabilisierte, mit <i>m</i> THPC beladene und mit PEI umgeladene Calciumphosphat-Nanopartikel
CaP/PEI/ <i>m</i> THPC	PEI-stabilisierte und mit <i>m</i> THPC beladene Calciumphosphat-Nanopartikel
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
CMC	Carboxymethylcellulose
DLS	Dynamische Lichtstreuung
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Anhang

DT	Dunkeltoxizität
EA	Elementaranalyse
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
FCS	fetales Kälberserum
HeLa	Henrietta Lacks
HIG-82	Synoviozyten-Zelllinie vom Kaninchen
HT29	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
J774A.1	Makrophagen-Zelllinie
kDa	Kilodalton
L929	Mausfibroblasten-Zelllinie
MG63	Humane Osteoblasten-ähnliche Zelllinie
mRNA	<i>messenger RNA</i>
<i>mTHPC</i>	5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)-chlorin
<i>mTHPP</i>	5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)-porphyrin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nGF	nach Gefriertrocknung
OD	Optische Dichte
Ostim/PEI	PEI-stabilisiertes Ostim [®]
Ostim/PEI/DNA	PEI-stabilisiertes und DNA-beladenes Ostim [®]
Ostim/PEI/DNA/PEI	PEI-stabilisiertes, DNA-beladenes und PEI-umgeladenes Ostim [®]

Anhang

Ostim/PEI/ <i>m</i> THPC	PEI-stabilisiertes und <i>m</i> THPC-beladenes Ostim [®]
Ostim/PEI/siRNA	PEI-stabilisiertes und siRNA-beladenes Ostim [®]
Ostim/PEI/siRNA/PEI	PEI-stabilisiertes, siRNA-beladenes und PEI-umgeladenes Ostim [®]
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
PDT	Photodynamische Therapie
PEI	Polyethylenimin
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
UV	Ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
XRD	Röntgenpulverdiffraktometrie
XTT	Natrium 3-[(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzosulfonsäure

7.2 Verwendete Geräte

Atomabsorptionsspektrometer	Thermo Electron, M-Serie
Elementaranalysator	Euro Vector, Euro EA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiovert 40 CFL
Gefriertrocknungsanlage	Christ, Alpha 2-4 LSC
Laser	Ceralas PDT 652, biolitec AG
Nanosizer	Malvern, Zetasizer Nano ZS ZEN 3600
Peristaltikpumpe	ISMATEC, Reglo <i>Analog</i> MS-2/6
Rasterelektronenmikroskop	FEI, Quanta 400 FEG
Reinstwasseranlage	Elga, Purelab Ultra Bioscience
Röntgendiffraktometer	Bruker D8 Advance
Rotor (Ultrazentrifuge)	Beckmann, Typ 70 Ti
Thermowaage	Netzsch, STA 449 F3 Jupiter
Transmissionselektronenmikroskop	Philips, CM 200 FEG
Ultraschalldispenser	Hielscher, Ultraschallprozessor UP 50 H
Ultrazentrifuge	Thermo Electron Corporation, Sorvall WX Ultra Series
UV-Vis-Spektrometer	Varian, Cary 300 Bio

7.3 Publikationsliste

Reguläre Publikationen in referierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften

M. Epple, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, V. Sokolova: Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine, *Journal of Materials Chemistry* 20 (2010) 18-23.

J. Klesing, A. Kovtun, S. Chernousova, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Epple: An injectable paste of calcium phosphate nanorods, functionalized with nucleic acids, for cell transfection and gene silencing, *Journal of Materials Chemistry* 20 (2010) 6144-6148.

J. Klesing, A. Wiehe, B. Gitter, S. Gräfe, M. Epple: Positively charged calcium phosphate/polymer nanoparticles for photodynamic therapy, *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 21 (2010) 887-892.

J. Klesing, S. Chernousova, M. Epple: Freeze-dried cationic calcium phosphate nanorods as versatile carriers of nucleic acids (DNA, siRNA), *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 199-204.

V. Sokolova, O. Rotan, J. Klesing, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, A. M. Westendorf, M. Epple: Calcium phosphate nanoparticles as versatile carrier for small and large molecules across cell membranes, *Journal of Nanoparticle Research* 14 (2012) 910.

Sonstige Publikationen

J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Epple, Eine injizierbare Paste aus Calciumphosphat-Nanostäbchen zur Transfektion und zur Gen-Stummschaltung, *Biomaterialien* 11 (2010) 71.

J. Klesing, D. Steen, B. Gitter, V. Albrecht, M. Epple, Antibakterielle Wirkung von Temoporfin-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln durch Bestrahlung mit Licht, *Biomaterialien* 11 (2010) 104.

K. S. Lips, J. Klesing, S. Hartmann, K. Trinkaus, I. Schleicher, C. Weyers, M. Schmitte, L. Heimann, M. Epple, R. Schnettler, Biokompatibilität und Funktionalität von Dickkopf-1-siRNA-dotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in vitro, *Biomaterialien* 12 (2011) 43.

J. Klesing, D. Steen, B. Gitter, S. Graefe, V. Albrecht, M. Epple, Hydroxylapatit-Nanopartikel als Wirkstoffträger für Temoporfin zur photodynamischen Therapie von bakteriellen Infektionen und von Tumorerkrankungen, *Biomaterialien* 12 (2011) 82.

J. Klesing, V. Sokolova, O. Rotan, A. Kovtun, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, A. Westendorf, M. Epple, Calciumphosphat-Nanopartikel als effiziente Träger für Biomoleküle durch die Zellmembran, *Biomaterialien* 12 (2011) 147.

Wissenschaftliche Vorträge (P=Poster, V=Vortrag)

13.-15. Mai 2009, Rostock, 3rd International Symposium Interface Biology of Implants, J. Klesing, J. Schwiertz, A. Wiehe, S. Graefe, B. Gitter, M. Epple: Photodynamic therapy against tumor cells and bacteria with dye-loaded calcium phosphate nanoparticles (P).

15.-16. September 2009, Friedrichroda, Thüringer Grenzflächen und Oberflächentage, J. Klesing, D. Steen, B. Gitter, J. Schwiertz, A. Wiehe, S. Graefe, V. Albrecht, M. Epple: Calciumphosphat-Nanopartikel mit lichtinduzierter antibakterieller Wirkung durch Farbstoff-Beladung (P).

07.-11. September 2009, Lausanne, European Society of Biomaterials (ESB), J. Klesing, J. Schwiertz, M. Epple, A. Wiehe, S. Graefe, B. Gitter: Calcium phosphate/polymer nanoparticles for photodynamic therapy (P).

28.-30. September 2009, Hamburg, Jahrestagung der deutschen Kolloidgesellschaft, M. Epple, A. Kovtun, V. Sokolova, J. Klesing, M. Neumeier, S. Neumann, R. Heumann: Colloidal stability of calcium phosphate nanoparticles functionalized with nucleic acids for gene transfer into living cells (V).

05.-07. Juli 2010, Paris, 6th International Conference on Diffusion in Solids and Liquids, M. Epple, V. Sokolova, A. Kovtun, S. Chernousova, J. Klesing, S. Neumann, R. Heumann: Functionalized calcium phosphate nanoparticles: Tools for gene and drug delivery (V).

06.-10. September 2010, Beregove, Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, R. Heumann, M. Epple: Application of calcium phosphate nanorods for gene transfer in vitro (P).

11.-15. September 2010, Tampere, European Society of Biomaterials (ESB), J. Klesing, M. Epple: Long term storage of continuously prepared calcium phosphate polymer/DNA nanoparticles by lyophilisation (P).

14.-15. Oktober 2010, Barcelona, 3rd IRUN Symposium on Nanotechnology, J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, R. Heumann, M. Epple: Nucleic-acid functionalized calcium phosphate nanorods for cell-transfection and gene-silencing (V).

18.-20. November 2010, Heiligenstadt, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM e. V.), J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, R. Heumann, M. Epple: Eine injizierbare Paste von Calciumphosphat-Nanostäbchen zur Transfektion und zur Gen-Stummschaltung (V).

18.-20. November 2010, Heiligenstadt, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM e. V.), J. Klesing, D. Steen, B. Gitter, V. Albrecht, M. Epple: Antibakterielle Wirkung von Temoporfin-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln durch Bestrahlung mit Licht (P).

04.-08. September 2011, Dublin, European Society for Biomaterials (ESB), J. Klesing, S. Chernousova, S. Neumann, R. Heumann, W. Meyer-Zaika and M. Epple: Positively charged hydroxyapatite nanorods for cell transfection and gene silencing (P).

13.-15. September 2011, Zeulenroda, Thüringer Grenz- und Oberflächentage, D. Steen, J. Klesing, B. Gitter, V. Albrecht, M. Epple: Calciumphosphat-Nanopartikel als Träger des Photowirkstoffs Temoporfin für antibakterielle photodynamische Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* (P).

10.-12. November 2011, Gießen, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM e. V.), J. Klesing, V. Sokolova, O. Rotan, A. Kovtun, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, A. M. Westendorf, M. Epple: Calciumphosphat-Nanopartikel als effiziente Träger für Biomoleküle durch die Zellmembran (P).

10.-12. November 2011, Gießen, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM e. V.), J. Klesing, D. Steen, B. Gitter, S. Graefe, V. Albrecht, M. Epple: Temoporfin-beladene Hydroxylapatit-Nanopartikel für die photodynamische Therapie gegen Bakterien und Tumorzellen (P).

10.-12. November 2011, Gießen, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM e. V.), K. S. Lips, J. Klesing, S. Hartmann, K. Trinkaus, I. Schleicher, C. Weyers, M. Schmitte, L. Heimann, M. Epple, R. Schnettler: Biokompatibilität und Funktionalität von Dickkopf-1-siRNA dotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln in vitro (V).

Patent:

M. Epple, D. Zukowski, J. Klesing, S. Chernousova, Deutsche Patentanmeldung DE 10 2011 110 128.8, Hydroxylapatithaltige Substanz sowie Verfahren zu deren Herstellung (angemeldet am 15. August 2011).

7.4 Lebenslauf

Lebenslauf aus Datenschutzgründen nicht enthalten

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Untersuchung zur biologischen Aktivität funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel“

selbst verfasst und keine außer der angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Heiligenhaus, 29.06.2012

Danksagung

Ich danke,

Herrn Prof. Dr. M. Epple für die interessante Aufgabenstellung und die kontinuierliche Diskussionsbereitschaft, die zu den Ergebnissen dieser Arbeit geführt haben. Weiterhin bin ich für die Auslandsaufenthalte in Kairo und Madrid sowie für die Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen sehr dankbar, da diese Aufenthalte eine angenehme Abwechslung zum Laboralltag waren.

Frau Prof. Dr. B. Siebers für die Übernahme des Korreferats,

Herrn Prof. Dr. V. Albrecht, Herrn Dr. A. Wiehe, Frau Dipl. Chem. D. Steen, Frau Dr. S. Gräfe und Herrn Dr. B. Gitter von der Firma biolitec für die Durchführung der Zell- und Bakterientests und die fortwährende Diskussionsbereitschaft sowie für die zur Verfügung gestellten Photosensibilisatoren,

Frau Dr. G. Gasqueres, Frau Dr. L. Heimann, Herrn Dr. D. Zukowski von der Firma aap Dieburg für die Bereitstellung der Ostim[®]-Suspension,

allen Mitarbeitern aus dem AK Prof. Epple für die freundliche Aufnahme und die bedingungslose Hilfsbereitschaft,

Frau M. Sc. Biologie S. Chernousova und Frau M. Sc. Biochemie N. Soklakova für die ausgezeichnete Arbeit und die zellbiologischen Untersuchungen,

Anhang

Dipl. Chem. Ing. J. Enax, Dr. D. Mahl, Dipl. Chem. Ing. A. Peetsch, M. Sc. Biologie O. Rotan und M. Sc. Chemie J. Rüsing für die zahlreichen fachlichen Gespräche und die lustige Zeit im Labor,

Dipl. Chem. S. Backhaus, Dipl. Chem. J. Diendorf, Dipl. Chem. J. Enax, Dipl. Chem. Ing. A. Peetsch und M. Sc. J. Rüsing für die wohl gemeinten Ratschläge und die kritische Begutachtung dieser Arbeit,

Frau C. Fischer für die stetige Bereitstellung und Konstruktion diverser Arbeitsgeräte als auch für die vielen lustigen Gespräche,

Herrn Dr. O. Prymak und Herrn Dipl. Ing. J. Gündel-Graber für die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung der Röntgenpulverdiffraktogramme,

Frau S. Bollmann für die freundliche Hilfestellung bei der Literaturrecherche,

Frau S. Kiefer für die Bearbeitung jeglicher Formalitäten,

Herrn Dipl. Ing. S. Boukercha für die hilfreiche Diskussionsbereitschaft zur Auswertung der angefertigten REM-Aufnahmen,

Herrn Dr. W. Meyer-Zaika für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen,

Dipl. Chem. Ing. A. Peetsch, Dipl. Chem. J. Diendorf und C. Fischer für die schnelle Hilfsbereitschaft bei allen administrativen Problemen,

Anhang

Frau K. Brauner und Frau V. Hiltenkamp für die analytische Charakterisierung der Proben,

meinen Eltern für die kontinuierliche und ausnahmslose Unterstützung jeglicher Art während meines gesamten Studiums,

meinem Bruder Ingo für die guten Ratschläge und die Unterstützung während meiner Promotionsphase,

meiner Freundin Yvonne für die bedingungslose Unterstützung und den Ausgleich während der Promotionsphase.