

Magnetische Polymernanopartikel

Charakterisierung und Effizienzsteigerung von
superparamagnetischem Eisenoxid in Polymernanokapseln,
sowie niederfrequente magnetische Freisetzung.



Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie,
Geographie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Michael Patrick Klak
geb. in Bad Nauheim

Mainz, 2023

-
1. Gutachter: Professor Dr. Peter Langguth
 2. Gutachter: Dr. habil. Thomas Nawroth

Tag der mündlichen Prüfung:
06.12.2023

Entsprechend §10 Absatz D) der Promotionsordnung des Fachbereichs 09 Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität Mainz vom 22.08.2012 versichere ich, dass ich diese Arbeit selbst angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel angegeben wurden. Des Weiteren bestätige ich, dass diese Arbeit noch nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung verwendet wurde und weder in Teilen noch Gänze als Dissertation in einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht wurde.

Alle Versuche, die durch dritte ausgeführt und/oder analysiert wurden werden in Kapitel 3 „Methoden“ explizit im jeweiligen Unterpunkt erwähnt. Versuche ohne Vermerk wurden eigenständig durchgeführt.

Michael Klak

Für meine Familie.

DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich Herrn Professor Langguth danken für die gute Betreuung und die Möglichkeit, mit einem eigenen Projekt einen Beitrag zur Forschung in der pharmazeutischen Technologie leisten zu dürfen. Des Weiteren danke ich Thomas Nawroth für die Begleitung, die zusätzliche Betreuung und die Hilfe bei der initialen Ideenfindung in Bezug auf mein Projekt.

Großer Dank gilt besonders allen, die durch das Durchführen von Synthesen, Analysen, Versuchen und dem Bau von Gerätschaften an dieser Arbeit Anteil hatten. Ich danke Aljoscha K. für die Hilfe bei der Synthese und Charakterisierung der SPIONs. Ich danke Jennifer K. für die Synthese und Charakterisierung der Polymere sowie für die Vorbereitung, Mithilfe und Auswertung bei der Eisenkonzentrationsbestimmung. Ich danke Professor F. für die Unterstützung und die Betreuung beim Hydroxamsäure Projekt. Ich danke Frank H. für den Bau, die Installation und Planung des niederfrequenten magnetischen Impulssystems. Ich danke Matthias B. für die Durchführung und Auswertung der Zellversuche. Ich danke Christoph W. für die Hilfe bei der Charakterisierung und Entwicklung der magnetischen Polymerpartikel.

Ich danke allen meinen Kollegen und Kolleginnen im pharmazeutischen Institut Mainz für die wertvolle und schöne Zeit und die unerlässliche gegenseitige Hilfe bei Projekten. Besonders bedanke ich mich bei Lukas U., Jonas P., Christian S., Mark D., Antje Z., Julia S., Jozef A., Lukas G., Benjamin B., Anna-Maria C., Johannes B., Moritz R., Mauricio G., Michael H., Valentin S. und Doris G.

Meinen größten Dank schulde ich meiner Familie. Meiner Frau Sinikka Klak, die mich stets unterstützte, immer an mich geglaubt hat und mich immer weiter vorantrieb, besonders in schwierigen Zeiten. Meiner Tochter Liara, dafür dass sie da ist. Meinen Eltern Georg und Gabriele Klak für die Opferbereitschaft und das Zurückstellen der eigenen Bedürfnisse und den großen Glauben an mich. Meinen Bruder Lukas und seiner Familie für die Unterstützung und den Rat, besonders in persönlichen und beruflichen Dingen. Meiner Großmutter Magdalena, für ihre nie endende Zuneigung. Und meiner [REDACTED] für die abschließende Korrektur sowie meinem Freund Dr. Julius H.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	6
1. Einleitung	11
1.1 <i>Parenterale Darreichungsformen</i>	12
1.2 <i>Parenterale Depotarzneiformen</i>	13
1.3 <i>PLGA-Nanopartikel in der onkologischen Wirkstoff- freisetzung und Diagnostik</i>	14
1.3.1 PLGA als bioabbaubare Grundlage für Nanopartikel	14
1.3.2 PLGA als Grundlage für das Targeting von Tumorzellen	16
1.3.3 Charakterisierung und Herstellung von Nanopartikeln.....	19
1.4 <i>Magnetische PLGA-Partikel in der Krebstherapie</i>	21
1.4.1 Superparamagnetismus	21
1.4.2 Magnetisches Targeting	24
1.4.3 Magnetische diagnostische Bildgebung	26
1.4.4 Magnetische Hyperthermie	27
1.4.5 Magnetisch gesteuerte Freisetzung aus PLGA-Partikeln.....	28
1.4.6 Niederfrequente induzierte Freisetzung	30
1.4.7 Technische und physikalische Grundlagen magnetischer niederfrequenter Impulse	32
1.4.8 Hydroxamsäuren als Komplexbildner für Eisen *.....	40
2. Ziel der Arbeit	42
3. Methoden	43
Material- und Geräuelisten.....	43
3.1 <i>Synthese von superparamagnetischen Eisenpartikeln</i>	47
3.2 <i>Vibrating Sample Magnetometer (VSM)</i>	48
3.3 <i>Herstellungsmethode von magnetischen Polymer Nanopartikel</i>	49
3.3.1 Herstellung der PLGA-Partikel für Magnetversuche	49
3.3.3 Herstellung von Polymethylmethacrylat-Hydroxamsäure-Partikeln	51

3.4	<i>Dynamische Lichtstreuung (DLS)</i>	52
3.5	<i>Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)</i>	54
3.6	<i>Rasterelektronenmikroskopie (SEM)</i>	56
3.7	<i>Synthese von Rhodamin B mit PLGA</i>	58
3.8	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	59
3.9	<i>Dynamische Differenzkalorimetrie DSC</i>	61
3.10	<i>Magnetsystem für niederfrequenten Impulse</i>	63
3.11	<i>Fluoreszenz Messungen</i>	65
3.12	<i>MTT-Assays</i>	66
3.13	<i>Durchflusszytometrie</i>	67
3.14	<i>Gehaltsbestimmung von inkludierten Eisenpartikeln</i>	70
4	Ergebnisse niederfrequente Freisetzung aus PLGA-Nanopartikeln	71
4.1	<i>Eigenschaften von superparamagnetischen Eisenoxid Nanopartikeln</i>	71
4.2	<i>Charakterisierung von PLGA-Nanopartikeln</i>	74
4.2.1	<i>Größenbestimmung durch Dynamische Lichtstreuung</i>	74
4.2.2	<i>Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der PLGA-Partikel</i>	77
4.2.2.1	<i>Partikel hergestellt mit einer 1 % PVA Lösung (Standard)</i>	77
4.2.3	<i>Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PLGA-Partikeln</i>	83
4.2.3.1	<i>Partikel hergestellt mit einer 2 % PVA Lösung (Standard)</i>	83
4.2.4	<i>Floreszenzmikroskopie</i>	87
4.2.5	<i>dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)</i>	92
4.2.5.1	<i>Partikel hergestellt mit einer 2 % PVA Lösung (Standard)</i>	92
4.3	<i>Magnetsystem und Freisetzungsversuche</i>	95
4.3.1	<i>Das Niederfrequente Impulsmagnetsystem</i>	95
4.3.2	<i>Freisetzungsversuche im magnetischen Impulssystem</i>	101
5	Diskussion der Freisetzungsversuche mit einem niederfrequenten magnetischen Impulssystem	107
6	Ergebnisse Hydroxamsäuren als Komplexbildner in Polymerpartikeln	115
6.1	<i>Polymercharakterisierung PMMA und PMMA-HA</i>	115
6.2	<i>Größenbestimmung durch Dynamische Lichtstreuung</i>	118

6.3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PMMA- und P(MMA-co-MAHA)-Partikeln	120
6.4 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der PMMA- und P(MMA-co-MAHA)-Partikeln.....	122
6.5 Gehaltsbestimmung von inkludierten Eisenpartikeln.....	126
6.6 MTT-Assay.....	128
6.7 Durchflusszytometrie.....	130
7 Diskussion: Hydroxamsäuren als Komplexbildner in Polymerpartikeln.....	132
Quellen.....	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

Abkürzungen	Ausgeschrieben
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
C-NMR	¹³ C-nuclear magnetic resonance
CPBDT	2-Cyano-2-propyl benzodithioate
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DLS	Dynamic light scattering
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Differential scanning calorimetry
DSPC	Colfoscerilstearat)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicines Agency
EPR Effekt	Enhanced permeability and retention
EU	Europäische Union
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDA	Food and Drug Administration
FVD	Fixable Viability Dyes
HA	Hydroxamic acid
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
H-NMR	Proton nuclear magnetic resonance
IR	Infrarotspektroskopie

MAHAA	Methacrylathydroxam-säureacetonid
MFI	Median fluorescence intensity
MMA	Methyl-Methacrylat
MRT	Magnetresonanztomographie
MOS-FET	Metall-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistor
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
NP	Nanopartikel
P(MMA-co-MAHA)	Poly-methyl-methacrylat-co-Methacrylate hydroxamic acetone
PLGA	Poly lactid-co-Glycolid
PLGA-PEG	Poly lactid-co-Glycolid-Polyethylenglycol
PNDA	N-palmitoyl-6-nitro-dopamine
PSMA	Prostata-specific membrane
rcf	Relative centrifugal force
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute
ROS	Reactive oxygen species
SEM	Scanning electron microscope
SPIONs	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
STEM	Scanning transmission electron microscope
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
VSM	Vibrating Sample Magnetometer
WHO	World health organisation

1. EINLEITUNG

In der modernen Wissenschaft gibt es auf der Basis pharmazeutischer Forschungen eine Vielzahl an Projekten mit dem Ziel, hochpotente Wirkstoffe direkt am Wirkungsort freizusetzen. Durch verschiedenste Systeme soll ihre Wirkdauer an lokal begrenzten Stellen verlängert werden. Ein zweiter, ebenso wichtiger Vorteil ist die Verringerung von Nebenwirkungen im gesunden Gewebe.¹ Wie im weiteren Verlauf dieser Arbeit gezeigt und belegt wird (Kapitel 1.4.1-1.4.6), sticht das magnetische Targeting aus dieser Forschung heraus. Vor allem weil es wie wenige andere Ansätze universal im Körper einsetzbar ist und nicht begrenzt wird durch die Eigenschaften des Zielgewebes. Aber auch, weil magnetische Formulierungen durch ihre Eigenschaften gut kombinierbar mit anderen Strategien sind und Magnetismus selbst mehrere Anwendungsmöglichkeiten gleichzeitig in sich vereinen kann. Um einen Beitrag zu diesem System zu leisten und eine weitere Möglichkeit zur lokalen Freisetzung zu erforschen wurde im ersten Teil dieser Dissertation versucht, das schon bekannte Thema der niederfrequenten magnetischen Freisetzung auf eine weitere pharmazeutische Grundlage, das PLGA (Polylactid-co-Glycolid), zu erweitern. Der zweite Teil beschäftigt sich mit Modifikationen an Polymeren, die als Grundlage zur Herstellung von Nanopartikeln dienen. Mit neuartigen Nanopartikeln wurde der Versuch unternommen, die Grenzen, die einem solchen magnetischen System zugrunde liegen, zu limitieren. Nanopartikel wurden schon in den verschiedensten Verabreichungswegen untersucht, um ihre speziellen Eigenschaften zur Therapieoptimierung zu verwenden. Hierzu zählen unter anderem die parenterale Gabe, die Gabe über die Nase und die orale Gabe.² Für das lokale Targeting, besonders in der Krebstherapie, ist durch die Vielzahl an möglichen Einsatzorten die parenterale Gabe nanopartikulärer Formulierungen von großer Bedeutung.

1.1 PARENTERALE DARREICHUNGSFORMEN

Als parenterale Formulierungen werden pharmazeutische Darreichungsformen bezeichnet, die als sterile Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen zum Zwecke der Therapie oder der Diagnostik über eine Nadel in den Körper eingebracht werden. Sie können direkt in die Blutbahn, in ein Gewebe oder in Organe injiziert werden. Der Name Parenteralia leitet sich aus den griechischen Worten „par enteron“ ab, dessen Übersetzung „Am Darm vorbei“ bedeutet. Parenterale Formulierungen bieten einige Vorteile gegenüber anderen Applikationswegen und sind ein wichtiger Bestandteil der pharmazeutischen Technologie. So hat bspw. allein die Wahl des Applikationsortes einen ausschlaggebenden Einfluss auf den Wirkeintritt und die Wirkdauer. Über die intravenöse Gabe einer Wirkstoffformulierung kann ein schneller Wirkeintritt erreicht werden, wohingegen die Injektion in Muskel- oder Fettgewebe zur Verzögerung der Wirkstofffreisetzung führt. Wirkstoffe, die im Darm inaktiviert, nur schlecht resorbiert oder zu lokalen Reizungen führen würden, können zum Teil nur durch parenterale Gabe patientenverträglich verabreicht werden. Zudem ist diese Art der Arzneimittelgabe zu bevorzugen, sollte ein Patient das Bewusstsein verloren haben. So lassen sich mit Infusionen Blutverluste durch Plasmalösungen ausgleichen und Patienten ernähren.³ Wobei die Formulierung selbst zu einer Verzögerung des Wirkstoffaustrittes beitragen kann. Diese Formulierungen werden Depotarzneimittel genannt und können auf verschiedenen Grundlagen beruhen. Der Einschluss des Wirkstoffes als eine Variante, die auf der Auflösungsgeschwindigkeit beruht oder Formulierungen, deren verzögerte Freisetzung auf Esterstrukturen basiert und welche, die dies über Adsorption erreichen. Ihre Vorteile erstrecken sich von einem reinen lokalen Einsatz, einer einfacheren Handhabung, über eine geringere Injektionshäufigkeit bis hin zu einer besseren Compliance beim Patienten.⁴ Auch Nanopartikel zählen zu diesen Depotarzneiformen, die im folgenden Kapitel näher betrachtet werden sollen.

1.2 PARENTERALE DEPOTARZNEIFORMEN

Parenterale Arzneiformen mit verzögerter Wirkstofffreisetzung haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen.⁵ Die Methoden, die zu diesem Zweck entwickelt werden, variieren in ihren zu Grunde liegenden Systemen stark. Zu diesen Methoden gehört unter anderem die Nutzung von öligen Grundlagen zur Injektion. Durch eine schlechte Löslichkeit des Arzneistoffs im Blut ist die Freisetzung von dessen Verteilungskoeffizienten in wässriger und ölicher Phase abhängig.⁶ Diesem System sind jedoch Grenzen gesetzt. Beispielsweise kann eine hohe Viskosität der öligen Phase die Injektionsfähigkeit deutlich beeinträchtigen und auch das Schmerzempfinden während der Applikation verstärken.³

Andere Forschungen konzentrierten sich auf in situ-Systeme, die aus flüssigen Zubereitungen bestehen und nach der Applikation in den Körper ein bioabbaubares festes oder halbfestes Depot bilden. Diese Verfestigung kann unter anderem auf der Grundlage von Temperatur- oder pH-Veränderungen sowie auf Quervernetzungen oder auf Präzipitation beruhen.⁷ Die verzögerte Freisetzung des Wirkstoffes in solchen Systemen erfolgt in den meisten Fällen durch Erosion des Depots. Auch diese Freisetzungsort hat die in Kapitel 1.1 angesprochenen Vorzüge. Jedoch birgt auch diese Variante nicht nur Vorteile. Viele Hilfsstoffe und Lösungsmittel können Gewebeschädigungen hervorrufen. Ebenso ist die Form, in der sich das Depot bildet, ein entscheidender Freisetzungsfaktor, da die Form nach der Injektion nicht kontrollierbar ist.

Eine weitere Methode zur Freisetzungverzögerung einer parenteralen Formulierung ist die Verwendung von Suspensionen mit schwer löslichen Wirkstoffen. Hierbei spielt zum einen die Löslichkeit des Wirkstoffes selbst eine entscheidende Rolle. Zum anderen können die Eigenschaften der Arzneiform der Suspensionen genutzt werden, um den retardierenden Effekt über einen größeren Partikeldurchmesser zu erreichen. Dieser Effekt ist bei öligen Suspensionen schon bei mikronisierten Partikeln gegeben und lässt sich durch den ausbleibenden flächendeckenden Kontakt mit der Gewebsflüssigkeit

1. EINLEITUNG

erklären. Hinzu kommen noch Kristallsuspensionen, Komplexbildner wie z. B. Zink in Insulinzubereitungen und das Präzipitieren von Wirkstoffen selbst nach der Injektion.³

Eine Besonderheit unter den Depotsystemen bilden Trägersysteme aus Polymeren und Lipiden mit Größen unter einem μM . Diese Systeme sind als Nanopartikel (NP) oder Liposomen bekannt und können als sphärische Objekte mit Wirkstoffen beladen werden.^{8,9} Bei Polyesternanopartikeln, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, erfolgt die Freisetzung über hydrolytischen Abbau, wie es auch bei PLGA (Polylactid-co-Glycolid) der Fall ist.^{10,11} Diverse Studien zeigen, dass die Freisetzung aus PLGA- aber auch anderen Polymer-Partikeln ein deutlich verlangsamtes Freisetzungsprofil aufweist.^{12,13}

1.3 PLGA-NANOPARTIKEL IN DER ONKOLOGISCHEN WIRKSTOFF-FREISETZUNG UND DIAGNOSTIK

1.3.1 PLGA ALS BIOABBAUBARE GRUNDLAGE FÜR NANOPARTIKEL

PLGA (Abbildung 1) ist ein von der FDA und EMA zugelassenes Polymer für die Arzneimittelherstellung und wurde bereits in den 70er-Jahren als bioabbaubares Polymer für chirurgische Nähte eingesetzt.¹⁴ Es hat seitdem als Grundlage für in situ formendes Gel, Mikrosphären, Implantate und sogar für Tabletten, bestehend aus Mikrosphären, eine Zulassung in den Vereinigten Staaten erhalten.¹⁵ Es gilt als besonders verträglich und kaum toxisch. Diese Eigenschaft beruht auf seinem molekularen Aufbau aus den monomeren Bausteinen Milchsäure und Glycolsäure, die körpereigen im Citratzyklus metabolisiert werden.¹⁶ Weiter ist PLGA eine häufig genutzte Grundlage für die Herstellung von NP innerhalb aktueller Forschungen.¹⁶ Eines dieser Forschungsfelder innerhalb der NP stellt die Onkologie dar. NP haben in der Krebstherapie große Aufmerksamkeit auf sich ziehen können.¹⁷⁻¹⁹ Besonders der Umstand, dass man NP durch Modifikation oder Zusätze an einen bestimmten Wirkort

bringen und die Wirkstofffreisetzung zeitlich steuern kann, hat eine Vielzahl von Therapieansätzen hervorgebracht.^{20,21} Im Englischen wird diese Art der gesteuerten Freisetzung als „Targeting“ bezeichnet. Der im Nanometerbereich liegende Durchmesser der Partikel spielt besonders bei einer Form des Targetings eine entscheidende Rolle. Denn die mit Wirkstoff befüllten Hohlkörper können sich aufgrund ihres kleinen Radius vermehrt in Tumorgewebe anreichern. Diese Art der Akkumulation beruht auf einem rein physiologischen Prinzip: Die erhöhte Freisetzung von Stickstoffmonoxid im entzündungsähnlichen Tumorgewebe führt in den Wänden der angrenzenden Gefäße zu einer erhöhten Permeabilität und damit zu einer verstärkten Aufnahme von größeren Molekülen und damit auch von Nanopartikeln. Der eigentliche Effekt beruht jedoch auf dem Einbehalt der NP in den Zielzellen und dem geringeren Ausscheiden großer Strukturen. Während kleine ungebundene Moleküle nach kurzer Zeit das Gewebe wieder verlassen und in den Blutstrom zurückkehren, bleiben Moleküle, die in den Partikeln eingeschlossen wurden, in der Zelle zurück.²² Dies führt zu einer erhöhten Konzentration von bspw. Zytostatika im Tumor, die wiederum zu einer erhöhten Mortalität der Tumorzellen führt. Torchilin et al. konnten 2011 durch Nanoverkapselung von Doxorubicin dessen schwere Nebenwirkungen signifikant verringern.²³ Dieser Effekt wird als EPR-Effekt (enhanced permeability and retention) bezeichnet und wurde bereits 1986 zum ersten Mal von Matsumura und Maeda beschrieben.²⁴ Trotz alledem ist der EPR-Effekt ein sehr heterogenes Phänomen, das sich sogar mit dem Tumor verändern kann oder nur vorübergehend auftritt. Er kann sogar unterschiedlich bei Tumoren aus demselben Ursprung oder bei Metastasen im selben Patienten ausgeprägt sein.²⁵ Eine aktive Form des Targeting hat dementsprechend einen Vorteil gegenüber der rein auf Akkumulation beruhenden Tumorbekämpfung. So konnten beispielsweise die zuvor beschriebenen Doxorubicin-Partikel eine nochmals erhöhte Aufnahmerate zeigen, wenn sie an ihrer Oberfläche mit Antikörpern ausgestattet wurden, die passend zu den auf den Tumorzellen überexprimierten Antigenen codiert waren. Die Aufnahmerate dieser Partikel konnte gegenüber der Resorption der unbehandelten Partikel verdoppelt werden, während die unbehandelten Partikel eine höhere Aufnahmerate in Zellen ohne Antigene aufwiesen.²⁶ Dies zeigt deutlich, dass ein aktives zielgerichtetes Steuern von Partikeln zu pathologischen Zellen einen deutlichen therapeutischen Mehrwert

1. EINLEITUNG

aufweisen kann, obwohl die Formulierung in gesundem Gewebe in ihrer Aufnahmefähigkeit gegenüber nicht modifizierten NP im Nachteil ist.

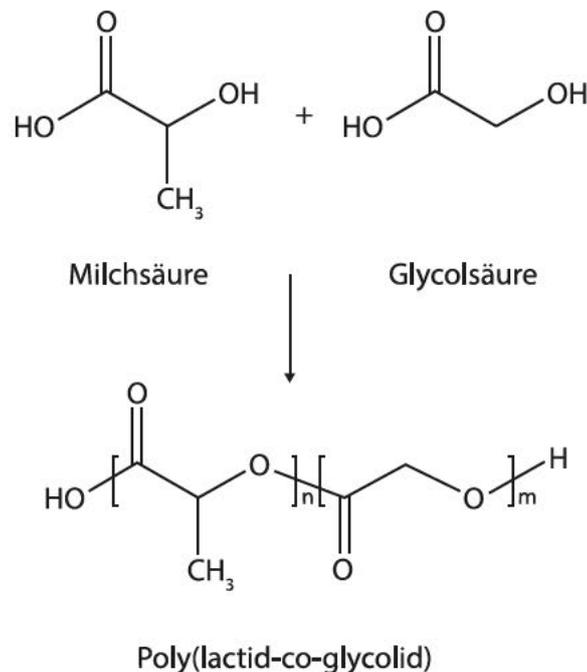


Abbildung 1 Synthese von PLGA

Aus den Monomeren Milchsäure (li) und Glykolsäure (re) wird das Polymer PLGA unter Abspaltung von Wasser generiert.

1.3.2 PLGA ALS GRUNDLAGE FÜR DAS TARGETING VON TUMORZELLEN

Es gibt eine große Anzahl an therapeutischen Ansätzen, um Wirkstoffe mithilfe von Nanopartikeln an ihren Wirkungsort zu bringen und so die Konzentration in einem bestimmten Gewebe so hoch wie möglich zu halten oder die Wirkstoffe am Bestimmungsort gezielt einzusetzen.

So konnten durch Einschluss von photosensibilisierenden Wirkstoffen in PLGA-Partikel, negative Einflüsse wie schlechte Löslichkeit, schneller Abbau oder auch eine mangelnde Anreicherung in Tumoren verbessert werden.²¹ Nach dem Targeting des gewünschten Zielgewebes können diese Wirkstoffe anschließend gezielt durch eine Licht-/Strahlungsquelle aktiviert werden. Durch die Lichteinstrahlung werden Singulett-

Sauerstoffe oder radikale Sauerstoffspezies gebildet, die am Wirkort Schäden anrichten.²⁷ Durch ihre kurze Lebensdauer haben sie einen sehr begrenzten Wirkradius von ungefähr 20 nm.²⁸ Diese Umstände machen diese Formulierung zu einer vielversprechenden Option.

Mit PLGA als Partikelgrundlage konnten auch in der Gentherapie Erfolge erzielt werden. So konnte die CRISPR-Technologie mithilfe von PLGA-Nanopartikeln erfolgreich eingesetzt werden. Gensequenzen in Tumorzellen konnten gezielt inaktiviert werden, woraus eine verlängerte Überlebensrate von Mäusen resultierte.²⁹

Auch im großen Feld der Immuntherapie konnten Fortschritte durch den Einsatz polymerer Nanopartikel aus PLGA dokumentiert werden. Hierbei wurden Antigene aus Krebszellen in Nanopartikeln eingeschlossen und Mäusen injiziert. Durch die resultierende Immunantwort auf die Tumore zeigte sich eine signifikant höhere Überlebensrate in Mäusen.³⁰

Das aktive Targeting, welches bereits angesprochen wurde und auf der Oberflächenmodifikation der Partikel beruht, besitzt ebenfalls großes Potenzial durch seine vielfältigen Einsatzmöglichkeiten. So konnten Proteine, Aptamere, Peptide und auch Sacharide/Polysaccharide auf der Oberfläche von PLGA-Partikeln verankert werden, um eine bessere Haftung an Tumorzellen zu erzielen.³¹

Eines dieser verwendbaren Proteine ist EGFR, ein Rezeptor für den Wachstumsfaktor Tyrosinkinase, der in Kolorektalen-sowie nicht kleinzelligem Lungen-, Nieren-, Eierstock, Pankreas-, Prostatakrebs und Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses vorhanden oder überexprimiert ist.³² Nanopartikel, die monoklonale Antikörper passend zu EGFR auf ihrer Oberfläche besaßen, konnten eine 13-fach höhere Aufnahme in Brustkrebszellen (MCF-7) aufzeigen, im Vergleich zu Nanopartikeln ohne diese Anpassung. Auf diese Weise konnte die Konzentration zur halbmaximalen Hemmung (IC50) der Wachstumsrate von MCF-7-Zellen von 269 ng/ml Rapamycin in nicht modifizierten TPartikeln auf 26,11 ng/ml in modifizierten Nanopartikeln gesenkt werden.³³

1. EINLEITUNG

Peptide, als ein weiteres der vorhergehend genannten Beispiele, die im Gegensatz zu Proteinen deutlich kleiner sind, besitzen durch ihren Größenunterschied einige Vorteile und eignen sich somit gleichermaßen für das Targeting. Sie sind einfacher zu synthetisieren, bewirken keine Immunantwort und können vielfältig präsentiert werden, um eine Bindung an ein Ziel zu optimieren.³⁴ Durch die Modifizierung der Oberfläche mit dem Peptid cRGD konnten Tumorzellen des Typs MDA-MB-231 direkt angegriffen werden. Das Transmembranprotein $\alpha\beta 3$, das als Ligand für das Peptid bei dieser Art von Tumorzellen dient, konnte von den Nanopartikeln erfolgreich anvisiert werden. Das Tumorstadium nahm im Vergleich zur Kontrolle, dem reinen Zytostatikum und Nanopartikeln ohne die Oberflächenmodifikation deutlich ab. Dabei blieb das Gewicht (einer der Prüfpunkte) der getesteten Mäuse gleich.³⁵

Aptamere hingegen sind DNA- oder RNA-Ketten, die eine 3-dimensionale Struktur bilden und die ebenso wie Peptide an Proteinen auf der Zelloberfläche binden können.³⁶ Auch sie sind durch ihre geringe Kettenlänge/ Größe leicht herzustellen, da es bei geringerer Größe weniger Fehler im Nukleinsäure-Produkt gibt. Ihre Affinität zum korrespondierenden Antigen ist bewiesen und ihre hohe Nukleasestabilität sind Aspekte, die Aptamere interessant für das aktive Targeting machen.³⁷ Um die Potenz von Aptameren darzustellen, wurde an die Säureenden von PLGA das Aptamer A10 2'-fluoropyrimidine RNA synthetisiert. Da es am „prostate-specific membrane“ Antigen (PSMA) bindet, konnten Partikel mit hoher Affinität zum Tumor hergestellt werden. Außerdem konnte die Funktionalität von Aptameren in dieser Studie gezeigt werden, in der die zunehmende Dichte an Aptameren auf der Oberfläche von PLGA-Partikeln auch zu einer proportionalen Aufnahme von Nanopartikeln in der Leber führte.³⁸

Polysaccharide werden ebenfalls als Gruppe von Molekülen für das Targeting verwendet. Durch ihre Affinität zu Oberflächenproteinen von Tumorzellen sind sie geeignet, um Targeting durchzuführen. Als Beispiel sei hier Hyaluronsäure genannt. Es handelt sich um ein langkettiges Zuckermolekül, das auf einem sich wiederholenden Disaccharid aus d-glucuronic acid und (1- β -3) N-acetyl-d-glucosamine basiert. Hyaluronsäure wird vom Protein CD-44 erkannt und gebunden, welches vermehrt auf bestimmten Krebszellen zu finden ist.³⁹ So konnte die Menge an aufgenommenem

Wirkstoff in Tumorgewebe um ein 5-faches erhöht werden im Gegensatz zu einem als Lösung verabreichten Wirkstoff.⁴⁰

Zudem seien noch Varianten genannt, die auf kleinen Molekülen beruhen und an PLGA-Partikel angeheftet mit Rezeptoren interagieren können. Hierzu zählen Biotin, Alendronsäure oder auch Folsäure, die eine erhöhte Affinität zu Krebszellen haben können.³¹

Die aufgezeigten Mechanismen des aktiven Targetings haben aber auch ihre Grenzen. Eine Reihe von Limitationen können solchen Systemen zugrunde liegen. Die hohe Immunantwort auf die dargebotenen Antigene kann beispielsweise zu einer verkürzten Halbwertszeit im Organismus führen. Ebenso sind die beeinträchtigte Aufnahme in das Gewebe bei modifizierten Partikeln und der lysosomale Abbau durch Endozytose zu berücksichtigen.⁴¹

1.3.3 CHARAKTERISIERUNG UND HERSTELLUNG VON NANOPARTIKELN

Um gesicherte Aussagen über die Qualität von polymeren Nanopartikeln tätigen zu können, sind ein fundiertes Herstellungsverfahren und eine umfangreiche Charakterisierung von großer Bedeutung. Um diesen beiden Punkten gerecht zu werden, wurde eine umfangreiche Literaturrecherche hinsichtlich der beschriebenen Methoden betrieben. Die so gewonnenen Erkenntnisse wurden auf die hiesigen eigenen Gegebenheiten adaptiert und umgesetzt. Eine Vielzahl der Erkenntnisse auf dem Gebiet der polymeren Nanopartikel sowie der Charakterisierung von Eisennanopartikel für die Behandlung von Eisenmangelanämien wurde im Arbeitskreis Prof. Dr. Langguth und der Betreuung von PD Dr. Nawroth, durchgeführt. So wurde beispielsweise die Herstellung und Charakterisierung von PLGA Partikeln bereits 2011 durch Dr. Buch beschrieben. In seiner Arbeit behandelte er die erfolgreiche Beladung von PLGA Nanopartikeln mit Lanthanoiden für die Bestrahlungsverstärkung in der Krebstherapie.⁴² Dr. Buch war in der Lage, eine stabile Suspension aus Nanopartikeln zu formulieren, in deren Inneren er Lanthanoide einschließen konnte. Im Gegensatz zur sonst üblichen Herangehensweise wurde in Dr. Buchs Arbeit die Doppemulsionsmethode zur Herstellung der Partikel verwendet. Aufbauend auf Dr. Buchs Erkenntnissen wurden viele Ansätze wie das

1. EINLEITUNG

Verwenden von Ultraschall zur Zerkleinerung durch Beschallung der Emulsionströpfchen übernommen und eine Methode gesucht, die auf der einfachen Emulsionsmethode beruht, um eine gute Einschlussrate einer hydrophoben Beladung zu erzielen. Denn wohingegen die Doppelemulsionsmethode aus zwei Zerkleinerungsschritten besteht und im inneren einen wässrigen Kern mit einer Polymerhülle umschließt, wird bei der einfachen Emulsionsmethode das hydrophobe Lösungsmittel von Wasser umschlossen. Das hydrophobe Polymer wird an der Außenseite der Partikel bei Kontakt mit Wasser fest und durch das Verdampfen des Lösungsmittels können hydrophobe Wirkstoffe und Strukturen gut im inneren eingeschlossen werden.⁴³

Wichtige Erkenntnisse in Bezug auf die Aufnahme von Eisenpartikeln in CaCo₂- Zellen konnte Dr. Jahn liefern. Ihm gelang der Nachweis, dass durch Oberflächenmodifikationen mit Hämin an Eisenoxidpartikeln ihre Aufnahme im Darm gesteigert werden kann. Außerdem zeigte sich in einer zweiten Studie, dass geladene Eisenoxidpartikel abhängig von der Ladung unterschiedlicher Kohlenhydrathüllen (Succrose-, Dextran-, oder Gluconkomplexe) besser im Darm aufgenommen werden, wenn sie eine negative Ladung besitzen.^{44,45} Zur Bestimmung der Partikeleigenschaften setzte Dr. Jahn Methoden ein, wie das MTT Assay, TEM-Aufnahmen und DLS-Messungen zur Größenbestimmung sowie Ferrozin als farbiger Komplexbildner für Eisen zur Konzentrationsbestimmung. Etablierte Methoden, die unter anderem auch in dieser Arbeit zu finden sind und die sich als erfolgreiche analytische Instrumente erwiesen haben.

In einer weiteren Publikation bestimmte Jahn et al. die Menge an potenziell toxischem und labilem Eisen in parenteralen Eisenkomplexen.⁴⁶ Auf diesen Studien aufbauend untersuchte Dr. Fütterer die Eigenschaften weiterer parenteraler Eisenkomplexe und wies auf die bekannten Nebenwirkungen von freiem Eisen durch oxidativen Stress hin.⁴⁷ Wobei er in Zusammenarbeit mit Dr. Schnorr die Methode zur Bestimmung des freien Eisens anpassen konnte und die Menge an labilem Eisen durch eine verbesserte Ferrozin-Komplexierung bestimmte.⁴⁸ In Erweiterung dieser Methodik konnte Dr. Schnorr eine Verbindung zwischen der Menge an labilem Eisen und der Verteilung in verschiedenen Organen im Hühner-Ei-Modell (In Ovo) herstellen.⁴⁹ Die Theorie von

labilem toxischem Eisen ist in Fachkreisen weitgehend bekannt und wird in Kapitel 7 in Bezug auf diese Arbeit diskutiert. Des Weiteren wurden von PD Dr. Nawroth wichtige Arbeiten zur Beladung von Nanoformulierungen mit magnetischem Eisenoxid veröffentlicht. So wurden hydrophile Eisenpartikel hergestellt und anschließend in Liposomen eingeschlossen, in denen sie sich - belegt durch SANS-Aufnahmen - an der inneren Oberfläche als magnetische Schicht anlagerten.⁵⁰ Durch die ausgiebigen Versuche und Kenntnisse in Analytik und Herstellung konnte innerhalb des Arbeitskreises Prof. Dr. Langguth auf ein großes Vorwissen und gut etablierte Prozesse zurückgegriffen werden, wodurch die folgenden Ergebnisse ermöglicht wurden.

1.4 MAGNETISCHE PLGA-PARTIKEL IN DER KREBSTHERAPIE

1.4.1 SUPERPARAMAGNETISMUS

Trotz aller aussichtsreichen Therapieansätze gibt es bis heute keine PLGA-Nanopartikelformulierung in der Krebstherapie, die eine Zulassung durchlaufen hat.²¹ Magnetische Nanopartikel besitzen das Potenzial, dies zu ändern. Sie bilden ein weiteres großes Spektrum an Möglichkeiten, um Nanopartikel zielgerichtet für therapeutische und diagnostische Ansätze zu verwenden. Magnetische Nanopartikel wurden in den letzten Jahren exzessiv untersucht und konnten mehrere neue Methoden in der modernen Weiterentwicklung der Krebstherapie hervorbringen.⁵¹

Die Grundlage dieser Formulierungen ist das Einschließen von kleineren Sphären mit magnetischen Eigenschaften in größere Polymerpartikel. Hierbei muss bei den magnetischen Eigenschaften der kleineren magnetischen Sphären zwischen Ferromagnetismus, Paramagnetismus und Superparamagnetismus unterschieden werden. Wobei Ferromagnetismus bei Temperaturen über 20° C nur bei Eisen, Cobalt und Nickel vorkommt und Superparamagnetismus von der Größe der Partikel abhängt

1. EINLEITUNG

und beispielsweise bei Eisenpartikeln unter einer Größe von 20 nm beobachtet werden kann.

Ferromagnetische Eisenpartikel sind größer als 20 nm und besitzen mehrere magnetische Domänen, also kleinstmögliche magnetische Einheiten, die jeweils aus einem Plus- und einem Minuspol bestehen. Indem mehrere magnetische Domänen durch ein Magnetfeld in dieselbe Richtung orientiert werden, beeinflussen sie sich anschließend gegenseitig und verhindern eine Neuausrichtung. Die neue Strukturierung wird beibehalten, so werden ferromagnetische Stoffe nach Anlegen des Magnetfeldes dauerhaft magnetisiert. Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPIONs) besitzen einen Vorteil aufgrund ihrer kleinen Größe. Wenn die Partikel unterhalb der genannten Größe liegen, bestehen sie im Gegensatz zu ferromagnetischen Stoffen, aus nur einer magnetischen Domäne und können so nicht dauerhaft magnetisiert werden. In einem magnetischen Feld richten sich die Partikel aus und werden dadurch magnetisch. Sobald das magnetische Feld keinen Einfluss mehr auf das Material ausübt, verliert auch dieses gleichzeitig seine Magnetisierung. Gleiches Verhalten ist auch bei paramagnetischen Materialien unabhängig von der Größe zu beobachten (beispielsweise bei Alkalimetallen)⁵², wobei ihre Fähigkeit zur Magnetisierung denen von z. B. superparamagnetischem Eisenoxid deutlich unterliegt. Dieses Verhalten von superparamagnetischen Stoffen lässt sich bei dieser geringen Größe durch die Néel-Relaxation erklären, die bei nachlassender Wirkung eines externen magnetischen Feldes durch reine thermische Bewegung die Ausrichtung der einzelnen magnetischen Momente ändert. (Abbildung 2) Ein magnetisches Feld kann also nur einen ferromagnetischen Stoff dauerhaft magnetisieren, da die Ausrichtung der magnetischen Domänen auch ohne ein äußeres Magnetfeld bestehen bleibt.⁵³⁻⁵⁶

Bei der Wahl der magnetischen Materialien für parenterale Formulierungen ist es dementsprechend wichtig, dass es sich um superparamagnetische Stoffe handelt, da es bei ferromagnetischen Stoffen ansonsten zur Agglomeration der Partikel kommen könnte. Eine Agglomeration könnte dann Embolien und andere schwerwiegende Verschlusskrankheiten hervorrufen.⁵⁷ Das Beladen von Polymerpartikeln mit ferromagnetischen Stoffen wäre vielleicht zu Beginn unproblematisch, könnte aber nach

dem Anlegen eines magnetischen Vektors zu interpartikulären Anziehungen führen und damit die oben beschriebenen Komplikationen auslösen. Superparamagnetische Partikel können durch ihre besonderen Eigenschaften durch mehrere Verfahren einen zusätzlichen Nutzen in der nanopartikulären Therapie bringen. In den nachfolgenden Kapiteln werden die wichtigsten dieser Verfahren beschrieben.

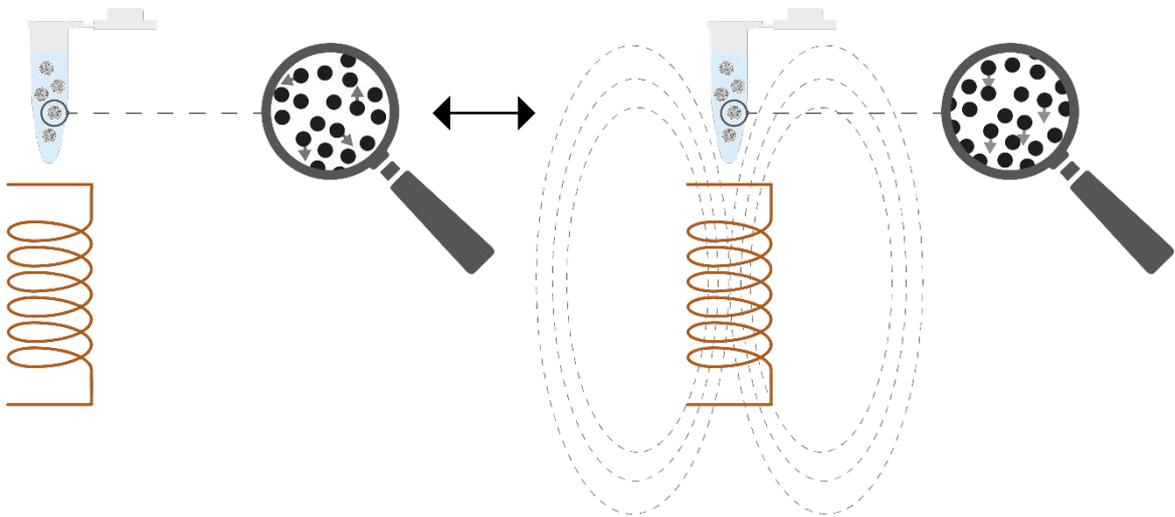


Abbildung 2 Schematische Darstellung von superparamagnetischem Verhalten

Zu sehen ist eine elektromagnetische Spule (orange), die ein magnetisches Feld erzeugt (gestrichelte Linie). Diese Magnetische Kraft wirkt sich auf die superparamagnetischen Partikel in der Probe aus. Durch Anlegen eines Magnetfeldes richten sich die Partikel entlang des Magnetfeldes aus und werden magnetisiert. Nach dem Wegfall der magnetischen Kraft werden die einzeln auftretenden magnetischen Domänen durch thermische Effekte bewegt und verlieren dadurch ihre Ausrichtung und somit ihre Magnetisierung (Néel-Relaxation).

Eine weitere wichtige Eigenschaft superparamagnetischer Stoffe zeigt sich in ihrer Magnetisierbarkeit. Diese kann auf unterschiedlichste Weise gemessen und bewertet werden. In diesem Zusammenhang ist der Begriff der magnetischen Suszeptibilität von großer Bedeutung. Diese Eigenschaft ist eine einheitslose Größe, die stoffabhängig in ihrer Stärke variiert und beschreibt die Fähigkeit von einem externen Magnetfeld magnetisiert zu werden. Diese dimensionslose Materialkonstante wird positiv bei Stoffen, die in einem äußeren Magnetfeld ein eigenes, „inneres“ Magnetfeld erzeugen,

1. EINLEITUNG

das parallel mit dessen „inneren“ Feldlinien verläuft und das äußere dadurch verstärkt. Ein solches Verhalten beschreibt die Partikel, die in dieser Arbeit verwendet wurden.⁵⁸ Trotz der ferromagnetischen Eigenschaften der verwendeten Materialien bei größeren Strukturen wurde eine partikuläre Größe von unter 20 nm angestrebt, die zu paramagnetischen Eigenschaften führt. Obwohl durch eine optimierte Formulierungsentwicklung reproduzierbar Partikel mit der angestrebten Partikelgröße synthetisiert wurden, bleibt die Suszeptibilität ein entscheidender Faktor, der einen direkten Einfluss auf die ausgeübte magnetische Kraft hat. Diese wiederum spiegelt sich beim Anlegen eines Magnetfeldes in der kinetischen Energie wider, wenn Eisen durch ein Magnetfeld in Bewegung gesetzt wird. Die benötigte kinetische Energie ist mitentscheidend für den Erfolg einer Formulierung, die auf einer niederfrequenten magnetischen Freisetzung beruht. Die Gründe hierfür werden in Kapitel 1.4.6 erörtert.

1.4.2 MAGNETISCHES TARGETING

Eine der Zielsetzung von aktivem Targeting, wie es in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben wurde, ist die Reduzierung von Nebenwirkungen durch hochpotente Wirkstoffe auf gesunde Zellen.²¹ Denselben Ansatz verfolgt auch das magnetische Targeting. Durch das Anlegen eines externen Magnetfeldes können Partikel, die mit superparamagnetischen Sphären beladen sind, an einem vorher definierten Ort angereichert werden.⁵⁹ Während die Partikel durch die Blutbahn im Körper verteilt werden, hält ein starkes äußeres Magnetfeld sie in ihrer Bewegung zielgerichtet zurück. So wird das magnetische Targeting bereits seit über 20 Jahren praktiziert.⁶⁰ PLGA-Partikel konnten hier eingesetzt werden, um lipophile Wirkstoffe zusammen mit den SPIONs im Inneren einzuschließen. Schleich et al. verglichen verschiedene Targeting Möglichkeiten miteinander. Hierbei konnten sie einerseits PLGA mit einem Zytostatikum beladen und über magnetisches Targeting zum Tumor transportieren. Andererseits wurde ein Tripeptid aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure an der Oberfläche der Partikel verankert. Das Tripeptid wiederum ist ein Ligand für ein Oberflächenprotein des untersuchten Tumors. Bei den Tumorwachstumsraten konnte kein Unterschied zwischen

dem aktiven und dem magnetischen Targeting nachgewiesen werden. Beide waren jedoch einem Ansatz, der auf dem EPR-Effekt beruhte, überlegen und dieser zeigte Vorteile gegenüber der Kontrollgruppe. Interessanterweise konnten die besten Ergebnisse jedoch bei einer Kombination aus aktiven und magnetischem Targeting erzielt werden.⁶¹ Cui et al. konnten auch eine erhöhte Wirksamkeit von Paclitaxel gegen Tumorgewebe feststellen, wenn sie aktives mit magnetischem Targeting kombiniert haben.⁶² Ähnliches konnte auch über magnetisches Targeting und den induzierten Release durch Ultraschall gezeigt werden. Die Anreicherung der Partikel über magnetisches Targeting war im MRT deutlich sichtbar und die Tumorstadiumsrate sank deutlich gegenüber der Injektion von einfachen Partikeln, aber auch hier war die Kombination aus beiden Systemen wieder am erfolgreichsten.⁶³ Eine andere Studie bewies, dass die Fähigkeit zum magnetischem Targeting erheblich durch die Menge an eingeschlossenem Eisen beeinflusst wird. Bei der Herstellung wurde die Beladung durch unterschiedliche Konzentrationen an Eisen eingestellt und eine Korrelation von erhöhter Eisenmenge zu Tumoraufnahme von Partikeln wurde gezeigt.⁶⁴ Dieser Umstand ist eine bedeutsame Beobachtung und zeigt auf, wie wichtig die Eisenbeladung für ein effizientes System ist. Betrachtet man einen der bedeutendsten Nachteile des magnetischen Targetings, wird dies umso deutlicher. Denn eine der größten Schwächen ist die Problematik, dass präzise ausgerichtete Magnetfelder nicht tief genug ins Gewebe eindringen können. Dies liegt vor allem daran, dass die Stärke des Feldes rasant mit wachsender Entfernung zur Quelle abnimmt.^{65,66} Somit könnte dieses Problem durch eine höhere SPION-Dichte im Partikelinneren verbessert werden.

1.4.3 MAGNETISCHE DIAGNOSTISCHE BILDGEBUNG

Superparamagnetische Substanzen haben noch einen weiteren Vorteil gegenüber anderen Nanopartikeln. Durch die Fähigkeit, magnetisch zu werden, kann man sie als negatives Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie einsetzen.⁶⁷ Wird ein externes Magnetfeld angelegt, dann bilden die einzelnen SPIONs einen Dipol, indem sie magnetisiert werden. Dadurch entstehen Inhomogenitäten im äußeren Magnetfeld und die Wassermoleküle in der näheren Umgebung dephasieren weil sie sich nicht mehr in der Resonanz des MRTs bewegen. Das bedeutet, dass sich die Wassermoleküle in der Umgebung des Eisens nicht mehr entlang des Magnetfeldes ausrichten. Resultierend ist eine höhere T_2 -Relaxationszeit, die auch Spin-Spin-Relaxationszeit genannt wird.⁶⁸ Dadurch erscheinen Areale auf dem MRT dunkler, weswegen man von einem negativen Kontrastmittel spricht. So wurden auch für diesen Zweck PLGA-Partikel hergestellt und untersucht. Schleich et al. haben PLGA-PEG-Partikel mit SPIONs und Paclitaxel beladen.⁶⁹ Durch den EPR-Effekt wurden die Partikel bevorzugt in CT-26-Zellen aufgenommen und damit auch die miteingeschlossenen SPIONs. Auf diese Weise ist Therapie und Bildgebung gleichzeitig möglich. Solche Ansätze werden als theranostisch bezeichnet. Die zuvor zitierten Cui, Zhang et al. konnten in ihrer Arbeit nicht nur zeigen, dass magnetisches und aktives Targeting in Kombination gut funktioniert, sie haben ihre Partikel auch auf die Bildgebung hin untersucht. So konnten sie einerseits nachweisen, dass aktives Targeting und Eisenbeladung einen Tumor deutlicher sichtbar machten. Andererseits untersuchten sie die Korrelation zwischen Eisenkonzentration und T_2 -Relaxationszeitverlängerung. So zeigte sich, dass sich die Eisenkonzentration linear zur Signalhemmung verhält.⁶² Auch in diesem Fall ist die Konzentration an Eisen ein entscheidender Faktor für die Effizienz eines Systems.

1.4.4 MAGNETISCHE HYPERTHERMIE

Große Aufmerksamkeit erlangte auch das Prinzip der Hyperthermie bei magnetischen Formulierungen. In der Hyperthermie wird die Tatsache genutzt, dass Eisenpartikel in einem alternierenden magnetischen Feld mit hoher Frequenz Hitze erzeugen. Oberhalb einer Temperatur von 42 °C beginnt die Denaturierung von Proteinen und dadurch die Zerstörung von Zellen.^{70,71} Für die Therapie über Hyperthermie ist eine Hülle aus PLGA nicht zwingend notwendig. So konnte beispielsweise der monoklonale Antikörper Trastuzumab, der als Antigen an HER-2 bindet, direkt an die Oberfläche von SPIONs synthetisiert werden. Die Möglichkeit, die Partikel auf oben genanntes Temperaturniveau zu erhitzen, konnte in diesen Versuchen neben einer sehr guten Affinität zu Tumorzellen bewiesen werden.⁷² Seit 2012 existiert ein Präparat mit einer europäischen Zulassung für den Einsatz in der Hyperthermie gegen Glioblastome (NanoTherm®).⁷³

Dass dieses hyperthermische System potent genug ist, starke Zellschädigungen hervorzurufen, haben Connord und Clerc et. al. in einer Studie bewiesen, indem sie SPIONs zu INR1G9-RCCK2 Zellen hinzugaben und mittels eines alternierenden Magnetfeldes aufheizten.⁷⁴

Durch den Einsatz von PLGA als zusätzlichen Wirkstoffträger konnte darüber hinaus die Hyperthermie mit der Chemotherapie in Einklang gebracht werden. Die Viabilität von Tumorzellen nahm bei einer Gabe von 5-Fluoruracil stärker ab, wenn es in PLGA eingeschlossen wurde. Ohne magnetisches Feld konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben festgestellt werden. Jedoch wurde durch das zusätzliche Erhitzen der Partikel in einem alternierenden magnetischen Feld eine zusätzlich verringerte Viabilität der Zellen nachgewiesen.⁷⁵ Gleiches konnten auch Vivek und Thangam et al. berichten; sie benutzten zusätzlich Trastuzumab als Antikörper, um die Affinität zum Tumor zu steigern. So erreichten sie eine erhöhte Zellsterblichkeit im Zusammenhang der Hyperthermie-Therapie.⁷⁶

1. EINLEITUNG

Ein weiteres Beispiel für den erfolgreichen Einsatz des Hyperthermie-Verfahrens wurden von Griffete und Fresnais et al. 2018 demonstriert, indem sie durch das hyperthermische Erhitzen von Eisennanopartikeln eine Polymerisation auf der Oberfläche des Fe-Partikels starten konnten.⁷⁷ So bildet sich eine dünne Polymerschicht um die Partikel.

Auch Nanogele auf der Basis von Oligo-(ethylen-glycol)-Methyl-Ether-Methacrylat-Monomere konnten erfolgreich mit SPIONs beladen werden und zeigten durch die erzeugte Hitze einen deutlichen Anstieg an Doxorubicin Freisetzung. Bei einem pH-Wert von 7,5 konnte die Freisetzung nach 250 Minuten von 20 % auf 40 % durch das alternierende Magnetfeld gesteigert werden. Im Kontrast zu diesem System wurden Gele verwendet, die gezielt die Langlebigkeit von SPIONs im Organismus verlängern und so eine Therapie durch Hyperthermie über einen längeren Zeitraum in Mäusen erlaubten, trotz einmaliger Gabe einer intramuskulären Injektion.⁷⁸

Aber auch diesem Ansatz sind Grenzen gesetzt. Die große Herausforderung, die sich in der Hyperthermie zeigt, ist die genaue Lokalisation des Magnetfeldes und damit eine Reduktion von Schäden am gesunden Gewebe. Zwar gibt es Mechanismen, dies zu umgehen, jedoch sind sie sehr aufwendig. Außerdem trifft man dann auf die Problematik, dass die Wärmeentwicklung in einem therapeutischen injizierbaren Bereich bleiben sollte. Es wird geschätzt, dass nur 0,25-1 % der Eisenpartikel den Tumor wirklich erreichen.⁷⁹ Darüber hinaus ist auch bei diesem Konzept die Menge an Eisen entscheidend. La Presa und Luengo et al. konnten auch bei der Hyperthermie einen Zusammenhang zwischen Eisenkonzentration und Effizienz beschreiben.⁸⁰ Es ist nicht verwunderlich, dass auch bei diesem System die Wärmeentwicklung stärker wird, je mehr Eisen in einer Flüssigkeit vorhanden ist.

1.4.5 MAGNETISCH GESTEUERTE FREISETZUNG AUS PLGA-PARTIKELN

Als weiteres Konzept soll an dieser Stelle die gezielte Freisetzung von Wirkstoffen aus PLGA-Partikeln vorgestellt werden. Indem man Eisenpartikel zum Schwingen bringt und

damit Wärme erzeugt, kann die Freisetzung von Wirkstoffen aus Polymerpartikeln initiiert werden, mit oder ohne den Vorsatz, thermische Schäden am Gewebe zu verursachen. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die Temperatur oberhalb der Glasübergangstemperatur des Polymers gebracht wird.⁸¹ PLGA besitzt in diesem Fall eine vorteilhafte Eigenschaft gegenüber anderen Polymeren, da es mit einer geringen Erweichungstemperatur von schon 42 °C Wirkstoff freisetzen kann. (Abbildung 36 und 37, S. 93). So konnten Hua, Tan et al. durch das Erhitzen in einem hochfrequenten magnetischen Feld die Freisetzung aus Partikeln erhöhen. Die Formulierung zeigte im Verlauf der nächsten Tage eine deutlich gesteigerte Freisetzung gegenüber den Kontrollpartikeln ohne den Einsatz eines magnetischen Feldes. Außerdem wurden Mikro- und Nanopartikel miteinander verglichen. In beiden Fällen hatte die Gruppe mit magnetischem Feld eine höhere Freisetzung.⁸² In einer weiteren Studie konnten SPIONs an der Oberfläche von PLGA Mikropartikeln über elektrostatische Anziehung angeheftet werden und so eine Freisetzung mit einem alternierenden Feld hervorrufen. Auch in diesem Fall konnte die alleinige Hitzeentwicklung genug Schaden anrichten, um einen Tumor deutlich am Wachstum zu hindern. Aber wie auch bei den vorherigen Versuchen war eine Kombination aus zwei Systemen, in diesem Fall getriggert Release und Hyperthermie am erfolgreichsten.⁸³ Chaing, Ke et al. wiederum erzeugten die Signale ihres Systems zu unterschiedlichen Zeitpunkten, sodass es immer zu einem erhöhten Release kam, wenn das Magnetfeld die Partikel beeinflusste. Sie konnten dementsprechend einen erhöhten Wirkstoffaustritt direkt zeitlich steuern.⁸⁴

Dennoch sind wie bei den anderen magnetischen Systemen durch die gleichen Auslöser ähnliche Nachteile zu verzeichnen. Eine schlechte Lokalisation der Erwärmung, sowie eine schlechte Effizienz durch die geringe Eindringtiefe des Magnetfeldes.⁸⁵ Zudem haben mehrere Autoren zu bedenken gegeben, dass dieses System und die Hyperthermie Schäden am gesunden Gewebe durch die Hitzeentwicklung hervorrufen können.^{71,81,86}

1.4.6 NIEDERFREQUENTE INDUZIERTE FREISETZUNG

Um das Problem der Schäden durch Hitzeentwicklung zu umgehen, gibt es seit einigen Jahren Versuche mithilfe niederfrequenter Freisetzung aus Liposomen und Lipid-Nanopartikeln Wirkstoff rein durch einen kinetischen Effekt freizusetzen. Die in Kapitel 1.4.5 angesprochene Methode, die mit PLGA angewendet wird, beruht auf einem magnetischen Feld, das Frequenzen von mehreren Hundert kHz benötigt. Senkt man diesen Frequenzbereich auf z. B. 50 Hz, kommt es immer noch zur Bewegung, jedoch ohne Hitzeentwicklung.⁸¹ Das magnetische Feld erzeugt dann kinetische Energie, indem es die Partikel in Bewegung versetzt. Auf Grundlage dieses Phänomens wurde in dieser Arbeit versucht, die Freisetzung von Wirkstoffen durch die genannte partikuläre Bewegung beruhend auf niederfrequenten magnetischen Impulsen zu erzeugen. Anstelle von Schmelzprozessen in der Hülle oder einer verstärkten Löslichkeit durch eine erhöhte Temperatur sollte die Freisetzung durch Strukturdefekte in der äußeren Hülle induziert werden, wie beispielsweise Poren. An dieser Stelle lässt sich auch die in Kapitel 1.4.1 beschriebene Notwendigkeit einer hohen Suszeptibilität erklären. Diese steht auch in direktem Zusammenhang mit der magnetischen Permeabilität, die im folgenden Kapitel genauer erörtert wird. Dabei gilt $\mu_r = 1 + \chi_{\text{mag}}$. Hierbei ist μ_r die relative Permeabilität und χ_{mag} die Suszeptibilität.⁵⁸ Dieser Zusammenhang hat zur Folge, dass eine erhöhte Suszeptibilität der SPIONs auch zu einem besseren Übertrag der Energie führt und damit auch das Entstehen von Strukturdefekten begünstigt. Die Natur des magnetischen Stoffes selbst bestimmt somit ebenfalls die Magnetisierbarkeit der Partikel und ist nicht nur vom äußeren Magnetfeld abhängig. Ab einer bestimmten Feldstärke werden magnetische Materialien nicht weiter magnetisiert, weil dann alle Teilchen des Materials sich in dieselbe Richtung ausrichten. Ab diesem Punkt ist ein stärkeres Magnetfeld wirkungslos und führt nicht zu einer erhöhten Krafteinwirkung. Wie stark ein Material magnetisiert werden kann, liegt an der Natur des Materials selbst und an der Menge an magnetisierbarem Material der Substanz/ Legierung. In meiner Arbeit wurde die Vorschrift von Sun et al. verwendet und Magnetit (Fe_3O_4) mit Ölsäuremantel als SPIONs, aufgrund der hohen Magnetisierbarkeit des Materials, eingesetzt.⁸⁷

Dass Systeme mit niederfrequenter Freisetzung im Labormaßstab erfolgreich eingesetzt werden, konnte schon 2012 durch Nappini et al. belegt werden. Nappini stellte mit Ölsäure ummantelte Kobalt-Ferrit Nanopartikel her und verteilte sie intralaminar in Liposomen. Durch den Einschluss von Carboxyfluorescein im Inneren der Liposomen konnten sie die Menge an freigesetztem Farbstoff bestimmen. Es zeigte sich, dass das Fluorescein mit zunehmender Magnetisierungsdauer in einem magnetischen Feld der Frequenz 5,2 kHz eine deutlich gestiegene Austrittsrate hatte. Außerdem wurden verschiedene Frequenzen getestet und damit die Korrelation zwischen erhöhter Frequenz und damit erhöhter Freisetzung für diese Art von Liposomen bewiesen. Dennoch ist durch die entstandene Vibration die Temperatur der Proben auf ungefähr 40 °C gestiegen. Zwar existiert in diesem Fall ein Zusammenhang zwischen erhöhter Temperatur und der Austrittsrate, aber der Effekt des Magnetfelds erwies sich gegenüber einer reinen Erwärmung auf 40 °C als überlegen. Abschließend sei noch erwähnt, dass auch Nappini et al. eine bessere Effizienz in der Freisetzung mit gesteigerter Eisenkonzentration in den Liposomen belegen konnte.⁸⁸ Andere Projekte benutzten anstatt in Ölsäure ummantelten SPIONs eine hydrophile Variante, die auf eine Stabilisierung durch Citronensäure auf der Oberfläche beruhte und somit die Eisenpartikel hydrophil machte. Damit konnten Eisenpartikel im Inneren der Liposomen zusammen mit Doxorubicin eingeschlossen werden. Ein äußeres Magnetfeld mit einer Frequenz von 50 Hz wurde angelegt und somit die Freisetzung über Zeit deutlich verstärkt. Zusätzlich wurden verschiedene Stärken des Magnetfeldes angelegt und bewiesen, dass eine größere magnetische Flussdichte auch die Freisetzung positiv beeinflusst.⁸⁹ Auffällig war jedoch bei beiden Systemen, dass die Freisetzung aus den Liposomen trotzdem stattfand. Das Anlegen des Magnetfeldes bewirkte nur eine Beschleunigung. Deshalb ist für den gesteuerten Wirkstoffaustritt so ein System nicht ideal, da der Grund für die gezielte zeitliche Freisetzung die Reduktion von Nebenwirkungen ist. Vlosova, Piroyan et al. haben dieses Problem vor Kurzem lösen können, indem sie Lipidnanopartikel aus DSPC (Colfoscerilstearat) herstellten und die Eisenpartikel mit PNDA (N-palmitoyl 6-nitro-dopamine) ummantelten.⁹⁰ DSPC ist ein Lipid, das einen Schmelzpunkt von ungefähr 55 °C besitzt und somit bei Raumtemperatur fest wird. Das PNDA diente der besseren Einarbeitung von SPIONs in die Lamelle durch einen aufgeheizten Extruder. So konnten Partikel aus Lipiden erzeugt

1. EINLEITUNG

werden, die Calcein im Inneren und Eisen intralaminar beinhalten. Diese Partikel konnten den Fluoreszenzfarbstoff über mehrere Stunden ohne ungewollten Austritt halten und gaben ihn zu teilen frei, je nachdem, wie lange das magnetische Feld angelegt wurde. Auch nach den magnetischen Impulsen war über einen Zeitraum von 24 h keine zusätzliche Freisetzung zu verzeichnen. Diese Fortschritte zeigen, dass niederfrequente gesteuerte Freisetzung möglich ist. Durch präzise angelegte Magnetfelder könnten so Nebenwirkungen erheblich reduziert werden, ohne dass man das Risiko der hitzeinduzierten Schäden eingeht. Jedoch konnte kein Versuch gefunden werden, um mithilfe von niederfrequenten magnetischen Impulsen eine Freisetzung aus PLGA-Nanopartikeln zu erwirken, trotz ihrer oben genannten vielfältigen Einsatzmöglichkeiten. An diesem Punkt setzt diese Arbeit an und verwendet verschiedene physikalisch Grundlagen, um ein niederfrequentes Impulssystem zu bauen und an magnetischen Nanopartikeln zu verwenden. Die Grundlagen dessen werden im nächsten Kapitel erörtert.

1.4.7 TECHNISCHE UND PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN MAGNETISCHER NIEDERFREQUENTER IMPULSE

Magnetische Impulse lassen sich in einer Vielzahl von Frequenzen und Frequenzformen finden. Bei Elektromagneten sind sie abhängig von der Dauer des Stromflusses und der Art, wie die Spannung und der Strom sich verhalten. Übliche Varianten von gepulsten Signalen sind Rechtecksignale, Dreiecksignale oder Signale in Sinusform und wie oben erwähnt, sind in der magnetischen Freisetzung Frequenzen von 50 Hz bis zu mehreren Hunderttausend Hz untersucht worden.

Zum Erzeugen von Impulsen werden elektrische Signale durch Spulen geleitet. Dabei bildet sich in deren Inneren und um sie herum ein magnetisches Feld (Abbildung 3 Seite 35). Dieses Verhalten lässt sich wie folgt erklären: Ein Stromfluss durch einen Leiter wie ein Kupferkabel erzeugt ein magnetisches Feld. Wird das Kabel gewickelt, dann summieren sich die einzelnen Magnetfelder der nunmehr entstandenen Spule und

bilden ein dem Querschnitt ausgerichtetes Gesamtmagnetfeld. Im Fall einer zylindrischen Anordnung (die auch in dieser Arbeit benutzt wurde) bildet sich abhängig von der Länge der Spule (l), der Anzahl der Windungen (N) und der Stromstärke (I), eine gewisse magnetische Feldstärke (H). Wobei Folgendes gilt:

$$H = \frac{I \cdot N}{L}$$

Ist das Innere der Spule leer, so spricht man von einer Luftspule, deren Permeabilitätszahl nahe derer im Vakuum liegt. Die einschlägige Literatur weist hier einen Wert von: $4\pi \times 10^{-7} \frac{Vs}{Am}$ aus. Dieser Wert im Vakuum wird auch als magnetische Feldkonstante bezeichnet (μ_0) und dient als Grundlage für die Berechnung anderer Permeabilitätszahlen, deren Werte als ein Vielfaches dieser Konstante dargestellt werden. Beispielsweise würde ein Material mit einer Permeabilitätszahl von 100 die magnetische Flussdichte um den Faktor 100 gegenüber dem Vakuum erhöhen. Anders ausgedrückt ist die relative Permeabilitätszahl (μ_r) ein Faktor, der das magnetische Feld um einen festen Wert verstärkt und je besser ein Material das Magnetfeld leitet, desto höher ist diese Zahl. Dieser Faktor ist abhängig von der Feldstärke und kann bei geeigneten Materialien einen Wert von 1.000 bis 10.000 erreichen. Aus diesem Grund werden im Inneren von Spulen häufig Materialien zur Verstärkung des Magnetfeldes eingebaut. Oftmals handelt es sich um Eisenkerne oder Kerne aus Eisenlegierungen.

Möchte man nun die Stärke des Magnetfeldes im Zusammenhang mit den Permeabilitätszahlen berechnen, verwendet man folgende Formel:

$$B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \frac{I \cdot N}{l}$$

B entspricht hierbei der magnetischen Flussdichte und wird in Tesla angegeben.^{91,92}

1. EINLEITUNG

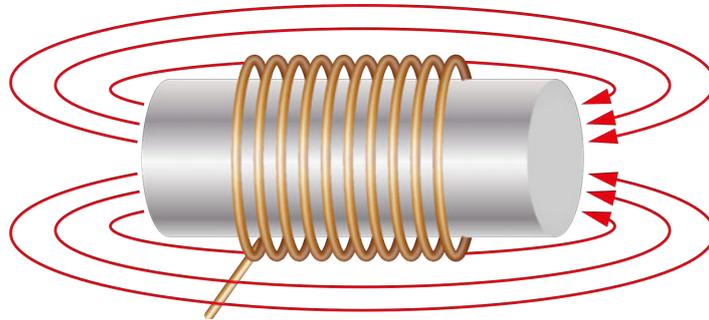


Abbildung 3 Magnetfeld einer Zylinderspule mit magnetisierbarem Kern

Wird ein elektrischer Leiter zu einer Spule gewickelt und ein elektrischer Strom geleitet, entsteht ein Magnetfeld (rote Linien). Dieses kann durch einen magnetisierbaren Kern im inneren der Spule verstärkt werden.

Wie beschrieben können die Feldlinien eines solchen magnetischen Feldes über ein Material mit hoher Permeabilität geführt werden. Bildet dieses Material ein in sich geschlossenes System, spricht man von einem magnetischen Kreis. Es handelt sich dabei überwiegend um ein ferromagnetisches Material mit hoher Permeabilitätszahl, um das ein stromleitender Draht gewickelt wurde. In Abbildung 4 ist so ein magnetischer Kreis schematisch dargestellt. Wie auch im Schaubild kann der Kreis an einer oder mehreren Stellen durch einen Luftspalt unterbrochen sein, trotzdem leitet er das Magnetfeld entlang seiner Form. Ist dieser Luftspalt klein genug, wird davon ausgegangen, dass das Magnetfeld im Inneren des Kerns ebenso wie im Spalt homogen verläuft.⁹¹ Da das Magnetfeld sich weiter durch den Raum bewegt, auch wenn er nur aus Luft besteht, eignet sich so ein Aufbau, um an dieser Stelle eine Probe dem magnetischen Feld auszusetzen.

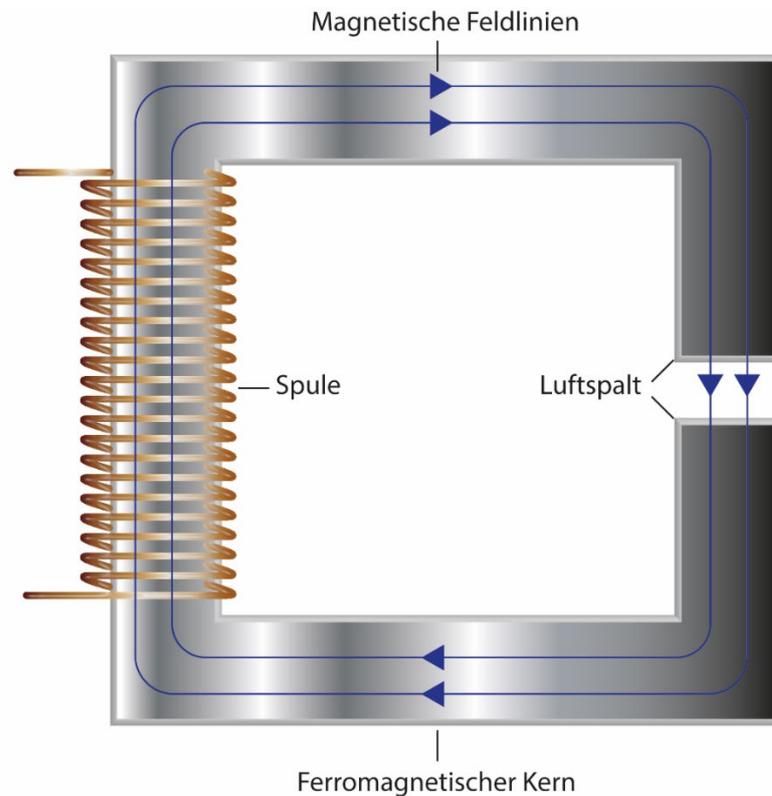


Abbildung 4 Magnetfeld eines magnetischen Kreises mit Luftspalt

Zu sehen ist ein magnetischer Kreis mit Luftspalt. Das durch die Spule erzeugte Magnetfeld (blaue Linien) wird durch den magnetischen Kern geleitet und fließt entlang der vorgegebenen Form. Ist der Luftspalt klein genug, fließt das Magnetfeld homogen durch den Spalt hindurch und behält seine Form bei.

Mit einem magnetischen Kreis hat man nun die Möglichkeit einen Kondensator in Reihe oder Parallel zu schalten, wobei Kondensatoren elektronische Bauteile sind, die definitionsgemäß eine elektrische Ladung speichern können. Die daraus resultierende Schaltung einer Induktivität (Spule) und einer Kapazität (Kondensator) wird Schwingkreis genannt. Wird ein Kondensator mit einer Ladung E aufgeladen, entlädt er sich, sobald der Stromfluss durch die Quelle abbricht. Normalerweise würde eine solche Entladung zu einem steilen An- und Abstieg der Spannung und damit zu einem einzigen starken Stromstoß führen. Ist jedoch eine Induktivität vorhanden, wird der Anstieg der Spannung durch den induktiven Widerstand gebremst. Die Energie, die im Kondensator gespeichert wurde, dient nun zum Aufbau eines Magnetfeldes, welches beim Zusammenbrechen erneut einen Stromstoß abgibt. Trifft dieser auf den Kondensator, nimmt er diese Ladung erneut auf, allerdings mit umgekehrter Polarität. Anschließend

1. EINLEITUNG

entlädt er sich wieder und es wird erneut ein Magnetfeld aufgebaut, das beim Zusammenbrechen Strom erzeugt und den Kondensator mit der ursprünglichen Polarität auflädt. Somit hat der Schwingkreis eine vollständige Schwingung erzeugt. (Abbildung 5) Wäre der Schwingkreis ein perfektes System ohne jeglichen Energieverlust, würde dieser Kreislauf ewig fortgeführt werden. Jedoch kommt es durch Verluste wie z. B. ohmsche Leistungswiderstände oder Ummagnetisierungsverluste zu einer stetigen Abnahme der geleiteten Energie. (Abbildung 6). Wird jedoch der Kondensator vor jeder Entladung erneut aufgeladen, bleibt das Signal und die Induktivität gleich. Zudem kann man die Frequenz des Wechselstromes so einstellen, dass der Schwingkreis in Resonanz schwingt. Bei dieser speziellen Schaltungsgeschwindigkeit sind die Widerstände der Spule und des Kondensators gleich und heben sich auf. Es bleibt nur der ohmsche Widerstand der Schaltung und deshalb ist die Stromstärke und damit auch die Stärke des Magnetfeldes bei dieser Frequenz am höchsten. Zur Bestimmung der Resonanzfrequenz ω_0 kann folgende Formel angewendet werden, die zusätzlich die Induktion der Spule L in Henry und die Kapazität des Kondensator C in Farad enthält:

$$\omega_0 = \frac{1}{2\pi\sqrt{L \cdot C}}$$

Die Formel zeigt, dass die Resonanzfrequenz eine Konstante für jeden Schwingkreis ist und sich nur über die Induktion und die Kapazität steuern lässt. Somit hat jeder Schwingkreis eine unveränderliche Frequenz, bei der er den größtmöglichen Strom leitet.^{91,92} Wie aus der Formel für die magnetische Flussdichte abgeleitet werden kann, ist somit auch die magnetische Kraft bei dieser Frequenz am größten.

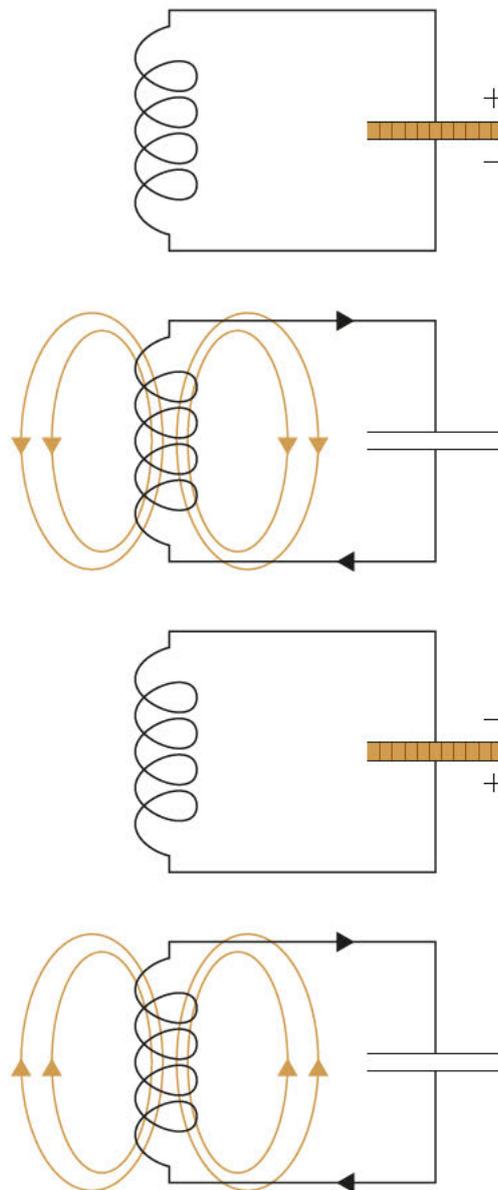
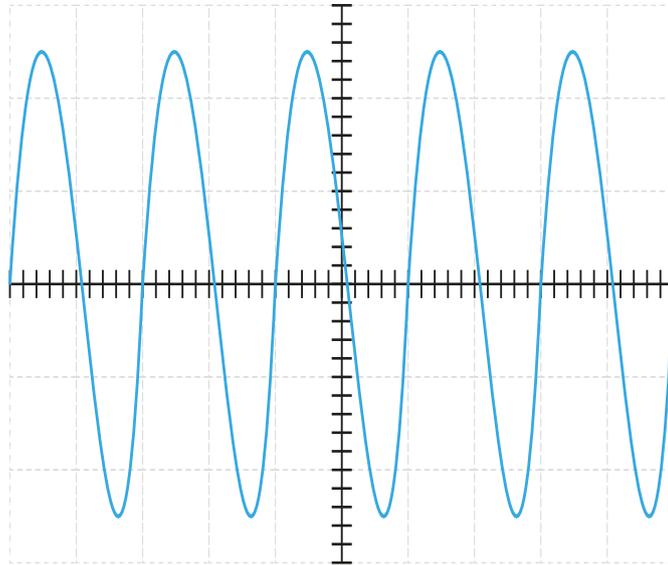


Abbildung 5 Verhalten eines magnetischen Schwingkreises.

Abwechselnde Beladung des Kondensators und des Magneten in umgekehrter Polarisation⁹²

1. EINLEITUNG

A)



B)

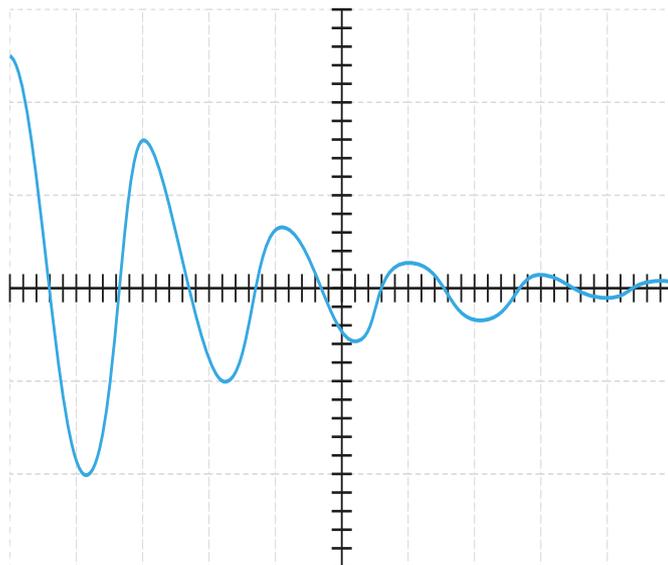


Abbildung 6 Spannungsverlauf im Schwingkreis

Spannung eines theoretisch perfekten Schwingkreises (A) Spannung eines magnetischen Schwingkreises, mit natürlichem Verhalten durch energetische Verluste (B)²²

Um einen möglichst großen kinetischen Effekt in die Probe zu bringen, ist es zudem noch erforderlich, das Magnetfeld inhomogen anzulegen. In Kapitel 1.4.1 wurde erklärt, dass SPIONs mit nur einer magnetischen Domäne die kleinstmögliche Einheit eines magnetischen Dipols bilden. Dipole wiederum werden nach Anlegen eines homogenen Magnetfeldes ausgerichtet. Da sie aus einem Plus und einem Minuspol bestehen, werden beide Seiten des Dipols bei parallel verlaufenden Feldlinien gleichermaßen angezogen. Es kommt in diesem Zusammenhang zwar zu einem Drehmoment, aber zu keiner Bewegung. In einem inhomogenen Magnetfeld hingegen wird eine Seite des Dipols, da sie sich näher an der Quelle des Magnetfeldes befindet, stärker angezogen. Es erfolgt eine Bewegung in Richtung des magnetischen Ursprungs.⁵²(Abbildung 7) So würde ein SPION in einem inhomogenen Magnetfeld eine Kraft erfahren.

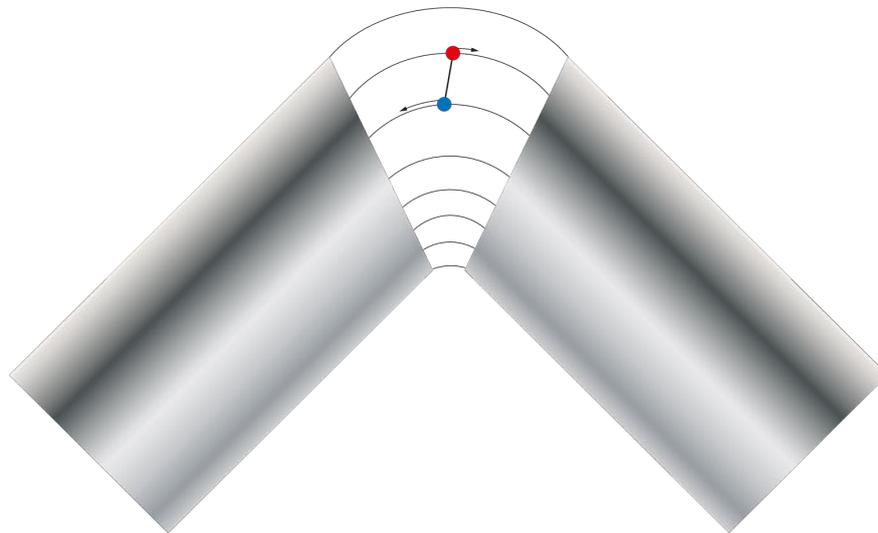


Abbildung 7 Verhalten eines Dipols in einem inhomogenen magnetischen Feld.

Die magnetische Feldliniendichte ist bei kleinerem Abstand höher, dadurch ist die magnetische Kraft im unteren Teil des Magneten größer. (Roter und blauer Punkt stellen die beiden Pole des Dipols dar). Dadurch erfährt der Minuspol, der tiefer im Magneten liegt, eine größere Kraft (Pfeil). Dadurch erfolgt eine Bewegung.

1. EINLEITUNG

Die in diesem Kapitel vorgestellten Grundlagen bilden die Theorie ab, mit der man einen impulsgesteuerten Schwingkreis bauen kann, der durch einen Luftspalt die Möglichkeit bietet, eine Probe einem magnetischen Impuls auszusetzen. Durch die geometrische Form des Luftspaltes erfährt die magnetische Probe eine kinetische Kraft. Alle diese Prinzipien wurden in Zusammenhang gebracht, um einen selbst gebauten Impulsgenerator im niederfrequenten Bereich zu bauen. Dieser wird im Methodenteil näher beleuchtet.

1.4.8 HYDROXAMSÄUREN ALS KOMPLEXBILDNER FÜR EISEN *

Im Kapitel 1.4. wurde schon mehrfach angesprochen, dass die Vorteile der magnetischen Systeme stark von der Eisenkonzentration innerhalb der Partikel abhängen. Für jede vorgestellte Methode konnten Publikationen gefunden werden, die dies belegen. Es scheint jedoch keine Versuche zu geben, eine effizientere Herstellungsweise und damit eine gesteigerte Einschussrate von Eisen in den Partikeln zu erwirken. Der Einsatz von Komplexbildnern und damit eine verbesserte Bindung des Eisens an das eingesetzte Polymer könnten dies ändern. Einer dieser Eisen-Komplexbildner ist Hydroxamsäure, sie ist seit 1869 bekannt und wurde von Heinrich Lossen benannt, der sie durch eine Reaktion aus Hydroxalamin und Diethyloxlat herstellte.⁹³ Ihre Komplexbildner-Eigenschaften zu Eisen sind deutlich stärker als die von Carbonsäuren (ungefähr um das Siebenfache⁹⁴), denn sie bilden im Gegensatz zu Carbonsäuren einen Ring aus fünf Teilen und binden durch ihre chemische Struktur mit einer O,O-Koordination das Eisen mit einem zweizähligen Liganden.^{94,95} (Abbildung 8) Hydroxamsäure kann man zudem im Eisenmetabolismus von Mikroorganismen finden. Dort werden sie als starke Komplexbildner von Fe^{3+} -Ionen genutzt und sind für den Eisentransport verantwortlich.⁹⁶ In diesem Zusammenhang werden sie als Mono-, Di- und Trihydroxamsäuren synthetisiert und zum Beispiel als Siderophore benutzt. Siderophore sind kleine Moleküle, die bei Eisenmangel von Mikroorganismen ausgeschüttet werden und Eisen binden. Anschließend werden sie durch Oberflächenproteine wieder in das Zellinnere transportiert.⁹⁷ Durch ihre starke Affinität zu Eisen werden Hydroxamsäuren

auch in der Medizin eingesetzt und dort bei Eisenstoffwechselerkrankungen wie β -Thalassämie oder Cooley-Anämie verwendet. Eine Vielzahl an Bluttransfusionen ist bei Patienten mit dieser Erkrankung nötig, da sie eine ungenügende Menge an β -Seitenketten des Eisen-Komplexbildners Hämoglobin produzieren. Durch die Therapie dieser Generkrankung leiden die Patienten an einem Eisenüberschuss.⁹⁸ Ein Wirkstoff, der in der Therapie von zu hohen Eisenmengen im Blut eingesetzt wird, ist Desferoxamin. Es bindet Eisen ebenfalls über Hydroxamsäuren und ist ein von der WHO als essenziell gelistetes Medikament.⁹⁴ Aufgrund der kurzen Halbwertszeit im Plasma bedeutet eine Therapie mit Desferoxamin jedoch lange Infusionen von 8 - 12 Stunden bis zu 5 Tage die Woche. Deswegen wurden Polymere mit Desferoxamin synthetisiert, um diese Zeitspanne deutlich zu erhöhen.^{99,100} Auf diesem Gebiet konnten Kombinationen aus Polymeren und Hydroxamsäuren bereits mögliche Verbesserungen in der medizinischen Anwendung von Eisen-Komplexbildnern zeigen. Die hohe Affinität zu Eisen, die Kombinationsmöglichkeiten mit Polymeren und der Jahrzehnte lange Einsatz in der Medizin machen Hydroxamsäuren zu einer ausgezeichneten Grundlage für die Effizienzsteigerung in der Herstellung von polymeren Nanopartikeln.

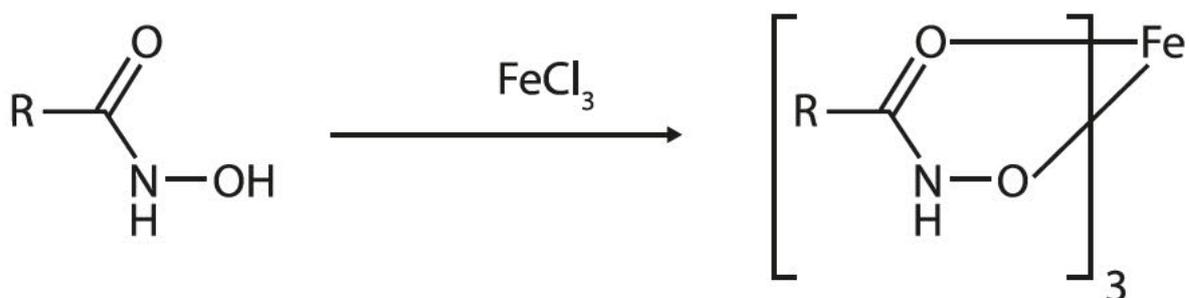


Abbildung 8 Hydroxamsäure als Eisenkomplexbildner

Hydroxamsäure bildet mit Eisenionen einen zweizähligen Liganden über eine O,O-Koordination.

2. ZIEL DER ARBEIT

Diese Arbeit besteht aus zwei Projekten, die sich beide mit magnetischen Polymernanopartikeln befassen. Zum einen sollte bewiesen werden, dass die oben erwähnte niederfrequente Freisetzung aus PLGA-Nanopartikeln zu erwirken und dies mit einem eigens angefertigten Magnetimpulssystem zu erreichen ist. Hierbei sollten die Vorteile von PLGA als pharmazeutische Grundlage und die Vorteile der niederfrequenten Freisetzung kombiniert werden. Eine deutlich langlebigere und somit stabilere Formulierung mit einer hitzefreien gezielten Freisetzung zur Nebenwirkungsminderung wurde angestrebt. Durch das gezielte Einsetzen von niederfrequenten magnetischen Impulsen sollten Strukturdefekte in der Oberfläche von Polymerpartikeln erzeugt werden, die eine gezielte zeitliche Freisetzung oder Freisetzungserhöhung möglich machen sollten. Gekoppelt mit der guten Bioabbaubarkeit des Polymers trotz der langen Zirkulationszeit, wäre ganz im Gegensatz zu Liposomen ein mehrfacher Einsatz mit einer einmaligen Darreichung denkbar.

Die zweite Fragestellung beschäftigte sich mit der Herstellung und Charakterisierung von Nanopartikeln aus neuartigen Polymeren, die zur besseren Bindung von Eisenpartikeln Hydroxamsäureverbindungen auf ihrer Oberfläche besitzen. Als Komplexbildner für Eisen haben sie das Potenzial, die Effizienz aller oben dargestellten magnetischen Systeme zu erhöhen und somit medizinische Limitationen zu verringern. Das Potenzial der magnetischen Formulierungen ist abhängig von der Fähigkeit magnetisiert zu werden und diese Fähigkeit wiederum, wie in den oberen Kapiteln dargestellt, ist abhängig von der Masse an integriertem Eisen. Somit war das Ziel, ein Polymer und eine passende Herstellmethode zu entwickeln, welche die Masse an Eisen erhöht, ohne dass der kritische Radius der Eisenpartikel zum Eintritt in den Ferromagnetismus überschritten wird.

3. METHODEN

MATERIAL- UND GERÄELISTEN

Geräte:

Christ Gefriertrockner (LOC-1M, Alpha 1-4, B.Braun Biotech International GmbH, Christ LOC-1M, Alpha 1-4, B.Braun Biotech International GmbH, Osterode am Harz, Deutschland)
DCS Thermofisher Modell Star 1 (Switzerland)
DLS Malvern Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcesterhire, United Kingdom)
FE-SEM Hitachi SU8000 (HHT, Krefeld, Germany)
Fluoreszenzmessgerät Tecan Reader (TECAN infinite F200, Männedorf, Switzerland)
Fluoreszenzmikroskop Keyence Model BZ 8000 (Neu-Isenburg, Germany)
Gate-Treiber der Marke Texas Instruments (Model UCC21520DWR, Dallas, Texas, USA)
Heraeus Multifuge X1R, mit einem Fiberlite F15-8 x 50c y Rotor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Impulsgenerator Voltcraft Universal System MS-9150 (Prag, Czech Republic)
Kondensator Kemet (Model C4DE, Lauderdale, FL, USA)
Kondensator ROE (IEC Typ 1, Berlin-Charlottenburg, Germany)
Kondensatoren WIMA (Model MKP 1, Mannheim, Germany)
Netzgerät Aim TTi (Model CPX400DP, Cambridgeshire, UK)
Netzgerät Conrad Electronic (Model PS-303 D Conrad & Co; Berlin, Hirschau, Germany)
Oszilloskop 1740A (Hewlett Packard, CA, USA)

3. METHODEN

Rührwerk IKA Model RW 15 (Staufen, Germany)
SEM Leo 1530 GEMINI (ZEISS, Oberkochen, Germany)
Tecan Infinite 200 Pro (Grödig, Austria)
TEM 4K CCD Kamera (Tietz Video and Image Processing Systems GmbH, Gauting, Germany)
TEM FEI Tecnai 12 Biotwin (Beschleunigungsspannung: 120 kV, Eindhoven Netherlands)
TEM FEI Tecnai F20 (Beschleunigungsspannung: 200 kV, Hillsboro, Oregon, USA)
Ultraschallprozessor UP 200s (Dr. Hielscher GmbH, Teltow, Germany)
UV/VIS Detektor JASCO V-630 (Pfungstadt, Germany)
Vibrating Sample Magnetometer Model 7300 (Lake Shore Cryotronics Inc., Westerville, OH, USA)
VWR-63000PC Spectrophotometer (Leuven, Belgien)
Zentrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Germany, Rotor F-34-6-38)

Eingesetzte Materialien:

1,2-hexadecandiol	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
4-(Dimethylamino)pyridin	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
96 Well Plates der Firma Greiner	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Aceton	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Bidest. Wasser	Eigenherstellung
Chloroform	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Curcumin	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Dichlormethan	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Eisen-III-Acetat (Fe(acac) ₃)	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Eppendorf gefäße	VWR International, Pennsylvania, USA
Eppendorf gefäße schwarz	VWR International, Pennsylvania, USA
Ethanol	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ethylacetat	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ferrozin-Kit	Bioanalytic GmbH Umkirch/Freiburg, Germany
Hydroxyethylcellulose	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Germany
Kanülen 27 G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
KNO ₃	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Kupfer-Grid maschenweite 300 µm	Plano GmbH, Wetzlar Germany
Luer-Lock 2 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
NaNO ₂	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

3. METHODEN

NaNO ₃	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Natriumlaurylsulfat	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Germany
Oleylamin	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ölsäure	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Petrolether	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
PLGA RG 502 H	Evonik Industries AG, Darmstadt, Germany
PVA	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Germany
Rhodamin B	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Rührfische	VWR International, Pennsylvania, USA
Schnappdeckelgläschen	VWR International, Pennsylvania, USA

3.1 SYNTHESE VON SUPERPARAMAGNETISCHEN EISENPARTIKELN

Die Synthese der Eisenoxidnanopartikel erfolgte anhand der Publikation von Sun et al.⁸⁷ Hierfür wurden 2 mMol Eisen-III-Acetat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), 10 mMol 1,2-hexadecandiol, 6 mMol Ölsäure und 6 mMol Oleylamin in 20 ml Petrolether gelöst. Diese Lösung wurde in einer Nitratschmelze bestehend aus 53 % KNO_3 , 40 % NaNO_2 und 7 % NaNO_3 bei 140 ° C erhitzt. Abwechselnd wurde Unterdruck angelegt und der abgedichtete Rundkolben mit Kühler mit Stickstoff geflutet, um eine möglichst vollständige Abwesenheit von Sauerstoff und Wasser zu erreichen. Nach ungefähr 30 Minuten wurde die Lösung auf 200 °C erhitzt und 2 Stunden bei dieser Temperatur unter Schutzgas gehalten. Anschließend wurde die Temperatur für eine weitere Stunde auf 300 ° C erhöht, um sie danach auf Raumtemperatur abkühlen zu lassen.

Zur Aufreinigung wurden die Nanopartikel zunächst mit 50 ml Ethanol gefällt und bei 10.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Zum Zentrifugieren wurde eine Heraeus Multifuge X1R, mit einem Fiberlite F15-8 x 50cy Rotor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) eingesetzt. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Prozess wurde noch 2 weitere Male wiederholt. Anschließend wurden das Präzipitat in 5 mL Chloroform resuspendiert und mit 50 µl Oleyamin und Ölsäure versetzt. Die Probe wurde ein weiteres Mal bei 20.000 g für 10 min zentrifugiert, um Agglomerate zu entfernen. Der Überstand wurde zur weiteren Verarbeitung gesammelt und erneut wie oben beschrieben mit Ethanol aufgereinigt und bei jedem Schritt in Chloroform resuspendiert. Nach der dritten Zugabe von Chloroform wurde überstehendes Ethanol durch eine Pipette entfernt und 1 ml des Chloroforms zur Gehaltsbestimmung gesammelt. Die Menge an SPIONs wurde gravimetrisch bestimmt und die Eigenschaften durch VSM und Transmissionselektronenmikroskopie mit einem Tecnai F20 der Firma FEI ermittelt.

3.2 VIBRATING SAMPLE MAGNETOMETER (VSM)

Die Messung und die Analyse der Daten mit dem VSM wurden von Aljoscha [REDACTED] im Arbeitskreis [REDACTED] - Physikalische Chemie - an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Um die magnetischen Eigenschaften der reinen Eisenpartikel (SPIONs) zu bestimmen, wurde ein VSM verwendet. Diese Methode wurde unter anderem von S. Foner beschrieben und wird auch als Foner Magnetometer bezeichnet.¹⁰¹ Indem eine Probe mit einem möglichst unmagnetischen Halter in einem konstanten und parallelen elektrischen Magnetfeld zum Schwingen gebracht wird, können anhand der Änderung des magnetischen Flusses die magnetischen Eigenschaften bestimmt werden. Die Schwingungen werden anhand zweier Detektionsspulen gemessen, in denen die Bewegung der magnetischen Probe durch ein alternierendes elektromagnetisches Feld messbar ist. Diese Änderungen im magnetischen Fluss sind proportional zur Magnetisierung der Probe.¹⁰²⁻¹⁰⁵

Ferromagnetische und superparamagnetische Proben weisen bei der Magnetisierung denselben Verlauf auf, wenn sie einem stärker werdenden Magnetfeld ausgesetzt werden. Wird das Magnetfeld anschließend wieder gesenkt, wird das Signal bei einer superparamagnetischen Probe gleichbleibend denselben Verlauf in umgekehrter Richtung nehmen. Eine ferromagnetische Probe hingegen zeigt ein erhöhtes Signal und somit eine gesteigerte Magnetisierung im Vergleich zur vorherigen Messung. Eine Hysterese ist zu beobachten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die ferromagnetische Probe, wie in Kapitel 1.4.1 angesprochen, magnetisiert wurde und diesen Zustand beibehält. Superparamagnetische Stoffe reagieren nur auf das äußere Magnetfeld und verändern ihre Magnetisierung nur abhängig von diesem.¹⁰⁶

Für die Bestimmung der magnetischen Eigenschaften wurde eine Vibrating Sample Magnetometer Model 7300 (Lake Shore Cryotronics Inc., Westerville, OH, USA) verwendet. Die Versuche wurden in der Abteilung für experimentale Physik der Universität des Saarlandes durchgeführt unter Führung von Professor Rainer Birringer. Die Proben wurden in einen Teflonbehälter pipettiert und luftdicht verschlossen, um das

Verdampfen des Chloroforms zu verhindern. Als maximale Feldstärke wurden 600 kA/m verwendet. Eine Probe mit reinem Lösungsmittel diente als Blindwert und wurde von den Prüfergebnissen subtrahiert. Prozessiert wurden die Daten in Microsoft Excel mit der Langevin-Funktion.

3.3 HERSTELLUNGSMETHODE VON MAGNETISCHEN POLYMER NANOPARTIKEL

3.3.1 HERSTELLUNG DER PLGA-PARTIKEL FÜR MAGNETVERSUCHE

Für die Herstellung der PLGA Nanopartikel wurde die Single-Emulsion Technik angewendet nach der Vorlage von Chen et al.¹⁰⁷ Hierfür wurden 25 mg PLGA in 1 mL Ethylacetat gelöst, je nach Formulierung wurde reines Ethylacetat, eine Stammlösung aus Curcumin und/oder SPIONs suspendiert in Chloroform hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde dann in 1 mL PVA Lösung pipettiert. Unter Verschluss wurde diese Dispersion bei 1000 rpm (rounds per minute) gerührt und nach einer Stunde mit einem Ultraschallprozessor UP 200s (Dr. Hielscher GmbH, Teltow, Germany) bei einer Amplitude von 50 % für eine Minute homogenisiert. Die entstandene Suspension wurde anschließend mit 4 mL MiliQ Wasser versetzt, um die Partikel auszuhärten und über Nacht weiter gerührt, um das Ethylacetat verdampfen zu lassen. Anschließend wurden die Partikel 6-mal mit einer Zentrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Germany, Rotor F-34-6-38) zentrifugiert und bei jedem Schritt mit frischen MiliQ Wasser gewaschen. Letztendlich wurden die Proben „Standard“ für eine weitere Minute bei 500 rcf (relative centrifugal force) zentrifugiert, um Agglomerate zu entfernen. Der Überstand wurde zur weiteren Benutzung behalten.

3. METHODEN

Es wurden 2 Größen an Partikeln hergestellt und diese unterschiedlich beladen. Die Partikel wurden nach folgendem Schema in Tabelle 1 angefertigt.

Tabelle 1 Auflistung der Vorgehensweise bei der Herstellung von PLGA-Partikeln

Name	PVA-Konzentration (%(m/V))	SPIONS (mg)	Curcumin (mg)	Zentrifugeneinstellung (G)
Standard/Blank	2	0	0	10,000
Standard/Curcumin	2	0	0,25	10,000
Standard /Iron	2	1	0	10,000
Standard/I+C	2	1	0,25	10,000
Big/Blank	1	0	0	800
Big/Curcumin	1	0	0,25	800
Big/Iron	1	1	0	800
Big/I+C	1	1	0,25	800

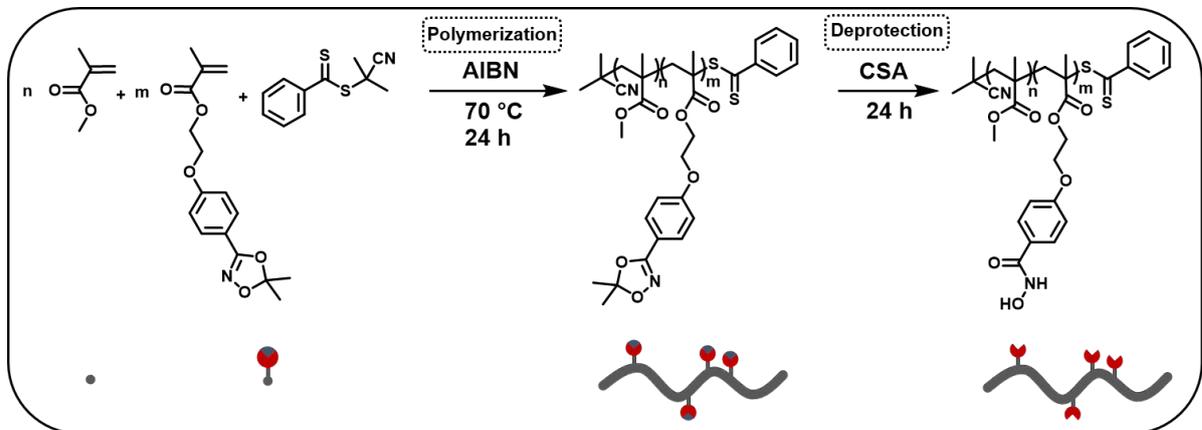


Abbildung 9 Synthese von $P(\text{MMA-co-MAHA})$ mithilfe einer RAFT-Polymerisation. Abbildung erstellt durch Jenifer ■

Die Monomere MMA und MAHAA (links) werden über eine Polymerisationsreaktion zu $P(\text{MMA-co-MAHA})$ synthetisiert. Anschließend wird die vorher protektierte Hydroxamsäure im letzten Schritt entschützt und funktionsfähig gemacht.

3.3.3 HERSTELLUNG VON POLYMETHYLMETHACRYLAT-HYDROXAMSÄURE-PARTIKELN

Für die hier durchgeführten Versuche wurden Polymere mit unterschiedlichen Hydroxamsäure Anteilen verwendet. Dazu zählte reines PMMA, PMMA mit 5% (m/m) Hydroxamsäuren, PMMA mit 10% (m/m) Hydroxamsäuren und PLGA (als Referenz). Die Polymere wurden zu je 10 mg abgewogen und in 1 mL Ethylacetat gelöst. Zu jeder Probe wurden 100 mg SPIONs pipettiert und die Lösung per Hand geschüttelt. Die Suspension wurde in eine 2 % PVA-Lösung gegeben und 1 Stunde unter Verschluss bei 1000 rpm gerührt. Die Probe wurde dann 1 Min mit einem Ultraschallprozessor (aus Kapitel 3.3.1) homogenisiert und mit 4 ml MiliQ Wasser versetzt. Nachdem die Probe über Nacht und ohne Verschluss weiter gerührt wurde, wurde sie 4-mal bei 10,000 g zentrifugiert und mit dem Ultraschallstab in 4 mL MiliQ Wasser resuspendiert.

Für die Durchflusszytometrie wurden die Polymere in einem mL einer 2,5 % (m/V) Curcumin-Ethylacetat-Lösung gelöst, sonst aber identisch zu den anderen Mustern verarbeitet.

3.4 DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG (DLS)

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Teilchengröße wurde die dynamische Lichtstreuung benutzt. Bei dieser Methode wird sich zunutze gemacht, dass sich kleinere Teilchen in einem flüssigen Medium schneller bewegen als größere. Dieser Umstand lässt sich erklären, indem man die Bewegung von kleinen Partikeln in einer Flüssigkeit betrachtet. Die Lösungsmittelmoleküle besitzen abhängig von ihrer Viskosität und der vorliegenden Temperatur eine bestimmte mittlere Geschwindigkeit, mit der sie an benachbarte Partikel stoßen und diese somit in Bewegung setzen und halten. Da alle Teilchen die gleiche Masse besitzen und man im Mittel davon ausgehen kann, dass die übertragene Energie auf alle Teilchen gleich ist, ist auch die Energie, die auf die Partikel ausgeübt wird, im Mittel gleich. Diese kinetische Energie erzeugt bei Partikeln mit geringerer Masse eine höhere Geschwindigkeit.¹⁰⁸

Strahlt man nun mit einem Laser auf eine Dispersion, wird das Licht des Lasers gestreut und kann gemessen werden. (Abbildung 10) Durch Betrachtung des Streulichts über einen bestimmten Zeitraum können Unterschiede in der Streulichtintensität bestimmt werden. Letztendlich misst man das Schwankungsquadrat des Streulichts.

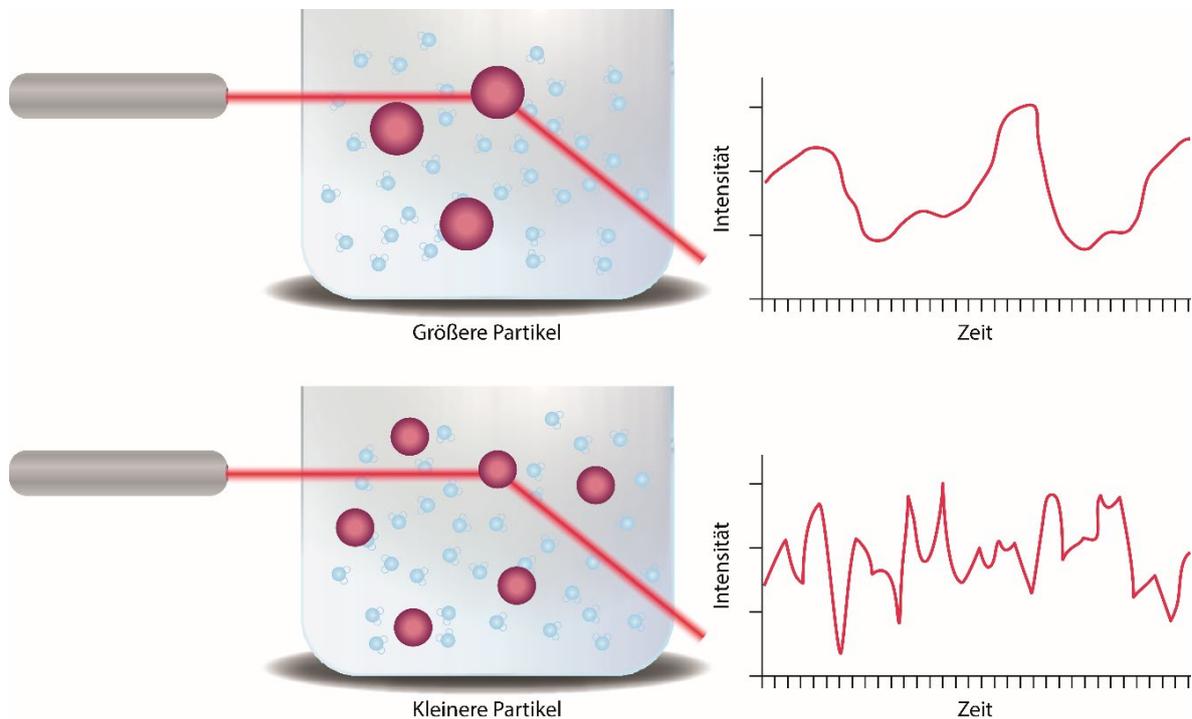


Abbildung 10 Änderung der Streulichtintensität über Zeit bei größeren und kleineren Partikeln in der dynamischen Lichtstreuung.

Mit der Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich nun der hydrodynamische Durchmesser bestimmen.

$$\text{Diese lautet: } d(H) = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Hierbei ist $d(H)$ der hydrodynamische Durchmesser, k_B die Boltzmann Konstante, η ist die dynamische Viskosität, T die absolute Temperatur und D der Diffusionskoeffizient. ¹⁰⁸

Für die Messungen in dieser Arbeit wurde ein Malvern Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcesterhire, United Kingdom) mit einem Laser der Wellenlänge 633 nm verwendet. Zur Prozessierung der Daten wurde die Malvern Software 7.11 verwendet. Die Proben wurden nach dem letzten Aufreinigungsschritt 1 zu 9 mit MiliQ Wasser verdünnt und umgehend vermessen.

3.5 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM)

Abbildung 18 und 57 wurden von Frau [REDACTED] im Arbeitskreis [REDACTED] vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz erstellt. Alle weiteren hier vorgestellten Aufnahmen sowie die Probenvorbereitung und die Auswertung wurden eigenständig durchgeführt.

Um die erfolgreiche Beladung von PLGA und PMMAHA Partikeln mit SPIONs nachzuweisen, wurden die Proben unter einem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet. Bei einem Transmissionselektronenmikroskop handelt es sich um eine Apparatur, in der Elektronen in einem Vakuum mithilfe einer Anode beschleunigt werden. Die Elektronen werden am oberen Ende beschleunigt und zu einem Strahl gebündelt. Treffen die Elektronen auf andere Atomkerne in der Probe, werden Sie aus ihrer Flugbahn gestreut. Je nach der Ordnungszahl der Atome variiert ihre Kerngröße und damit die Streuung der Elektronen. Unterhalb der Probe sitzt eine Kamera, die den Elektronenstrahl darstellen kann. Wurde der Strahl stark abgelenkt, zum Beispiel beim Auftreffen auf ein dichtes Material wie ein Metall - in diesem Fall Eisenoxid, erscheint diese Stelle dunkel auf der Kamera, da die Elektronendichte im Strahl an dieser Stelle geringer ist. Um den Einfluss der abgelenkten Elektronen auf das Bild zu vermeiden, werden diese mit einer Blende vor der Kamera entfernt. Alle sichtbaren Stellen sind somit elektronenreiche Gebiete, alle dunklen Bereiche elektronenarm.

In Abbildung 11 ist ein Transmissionselektronenmikroskop vereinfacht dargestellt und wird zur Veranschaulichung mit dem schematischen Aufbau eines Lichtmikroskops verglichen. Wurden die Elektronen durch die Elektronenquelle meist eine Wolfram-, LaB₆- oder Feldmitter-Elektronenquelle ins Hochvakuum (10^{-3} bis 10^{-7} mBar) gebracht, werden sie wie oben angesprochen, beschleunigt. Die Anodenspannung kann zwischen 20 und 300 kV variieren und leitet die Elektronen in der Säule in Richtung der Probe. Um den Elektronenstrahl in der Säule anzupassen, passiert er mehrere Blenden und magnetische Ablenkelemente. Noch vor der Probe und direkt nach der Anode befindet sich der Kondensator zur Einstellung der gewünschten Beleuchtungsbedingung und damit auch die Strahlungsmenge, die auf die Probe trifft. Anschließend erreicht der Elektronenstrahl den Probenhalter, der zur Lokalisierung 3-Dimensional zum Strahl

ausgerichtet werden kann. Der Strahl passiert daraufhin die Objektivblende, die zur Kontrastentstehung beiträgt, indem sie mehr oder weniger der abgelenkten Elektronen abfängt. Ähnlich einem Fotoapparat leidet jedoch dadurch die Auflösung, da die Öffnungsweite verkleinert wird. Letztendlich befinden sich vor dem Leuchtschirm oder der Kamera die Projektivlinsen. Sie dienen der Vergrößerung des Bildes. Der Leuchtschirm, auf den der Elektronenstrahl zu guter Letzt trifft, macht ihn für das menschliche Auge sichtbar, indem beim Auftreffen sichtbares Licht entsteht. Nach dem gleichen Prinzip werden CCD- Kameras eingesetzt, sie können vor oder nach dem Leuchtschirm geschaltet sein und sind mit einer Schicht aus Phosphor oder einem Szintillator versehen, auch hier werden Photonen erzeugt und können aufgenommen werden.¹⁰⁹

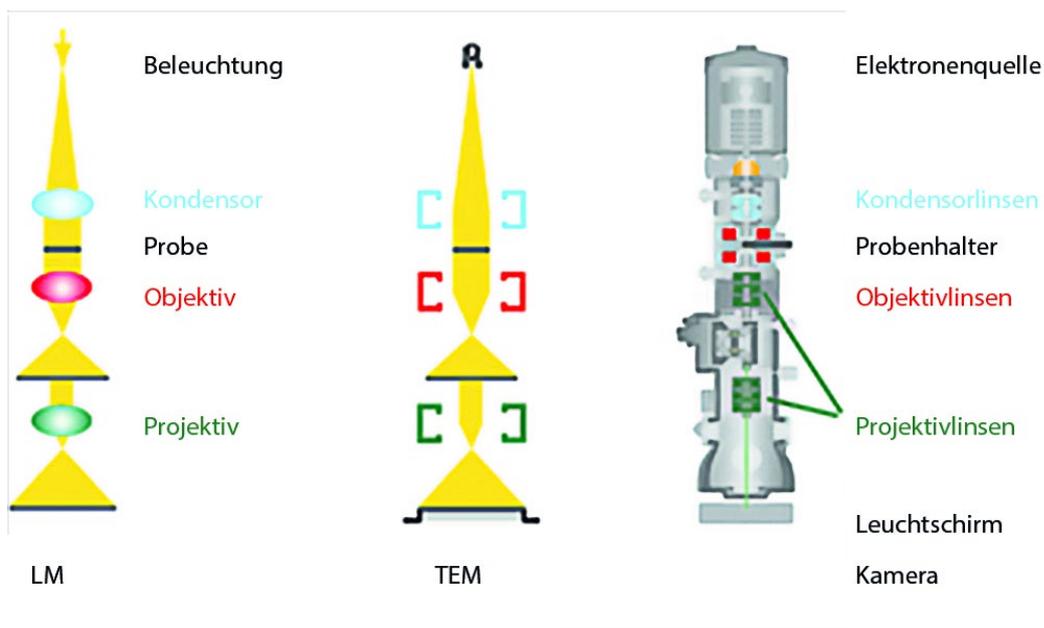


Abbildung 11 Darstellung der Transmissionselektronenmikroskopie im Vergleich zum Lichtmikroskop Links schematischer Aufbau eines Lichtmikroskops zum Vergleich. Mitte schematische Darstellung des TEM und rechts Aufbau eines TEM.¹⁰⁹

Für die Abbildung 57 im Dunkelfeld wurde eine STEM-Einheit (Scanning Transmission Electron Microscope) eingesetzt, bei diesem Bauteil handelt es sich um eine Einheit, die das Bild wie beim Rasterelektronenmikroskop mit einem punktförmigen Strahl scannt.¹⁰⁹ Dieses System wird in Kapitel 3.6 näher beschrieben.

3. METHODEN

Zur Probenvorbereitung für TEM-Bilder mit PMMAHA wurde die Probe auf ein Kupfer-Grid mit der Maschenweite von 300 µm der Firma Plano GmbH pipettiert und an der Luft getrocknet. Bei PLGA-Partikeln wurde nach dem Pipettieren der wässrige Überstand mit einem Stück Filterpapier entfernt und um den Kontrast zu erhöhen, die Probe mit einer 2 % (m/m) Lösung Uranylacetat angefärbt. Nach 30 Sekunden wurde das überschüssige Uranylacetat entfernt und die Probe bis zum Trocknen auf ein Filterpapier gelegt. Beide Probenarten wurden vor dem Auftragen 1 zu 9 mit MiliQ Wasser verdünnt.

Für die Aufnahmen wurde ein Tecnai 12 Transmissionselektronenmikroskop (FEI, Beschleunigungsspannung: 120 kV, Elektronenquelle: LaB6 BIO-TWIN Kathode) mit einer 4K CCD Kamera benutzt (Tietz). Für Dunkelfeldaufnahmen im STEM Mode wurde am Tecnai F20 mit einer Beschleunigungsspannung von 200kV der Firma FEI gemessen. Letztere Aufnahmen und Aufnahmen der SPIONs wurden von Frau Kirchhoff am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz aus dem Arbeitskreis Lieberwirth erstellt.

3.6 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE (SEM)

Abbildungen mit dem SEM wurden von Herrn ██████ im Arbeitskreis ██████ vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz erstellt. Die Auswertung der erhobenen Daten wurde eigenständig durchgeführt.

Wie in Kapitel 3.5 erwähnt, wird in einem Rasterelektronenmikroskop die Probe mit einem stark gebündelten Elektronenstrahl gerastert. Hierbei wird die Probe von einem Strahl punktuell getroffen und dieser bewegt sich in parallel verlaufenden Linien mit kleinsten Abständen in einem vorher definierten Bereich. Durch einen Detektor wird die Menge an abgelenkten Elektronen so Punkt für Punkt erfasst und zu einem gesamten Bild zusammengestellt

Wie beim TEM werden Elektronen extrahiert und durch eine Spannungsquelle in Richtung der Probe beschleunigt.¹⁰⁹ In Abbildung 12 kann der schematische Aufbau einer SEM samt der Beschreibung der einzelnen Bauteile genauer betrachtet werden.¹⁰⁹

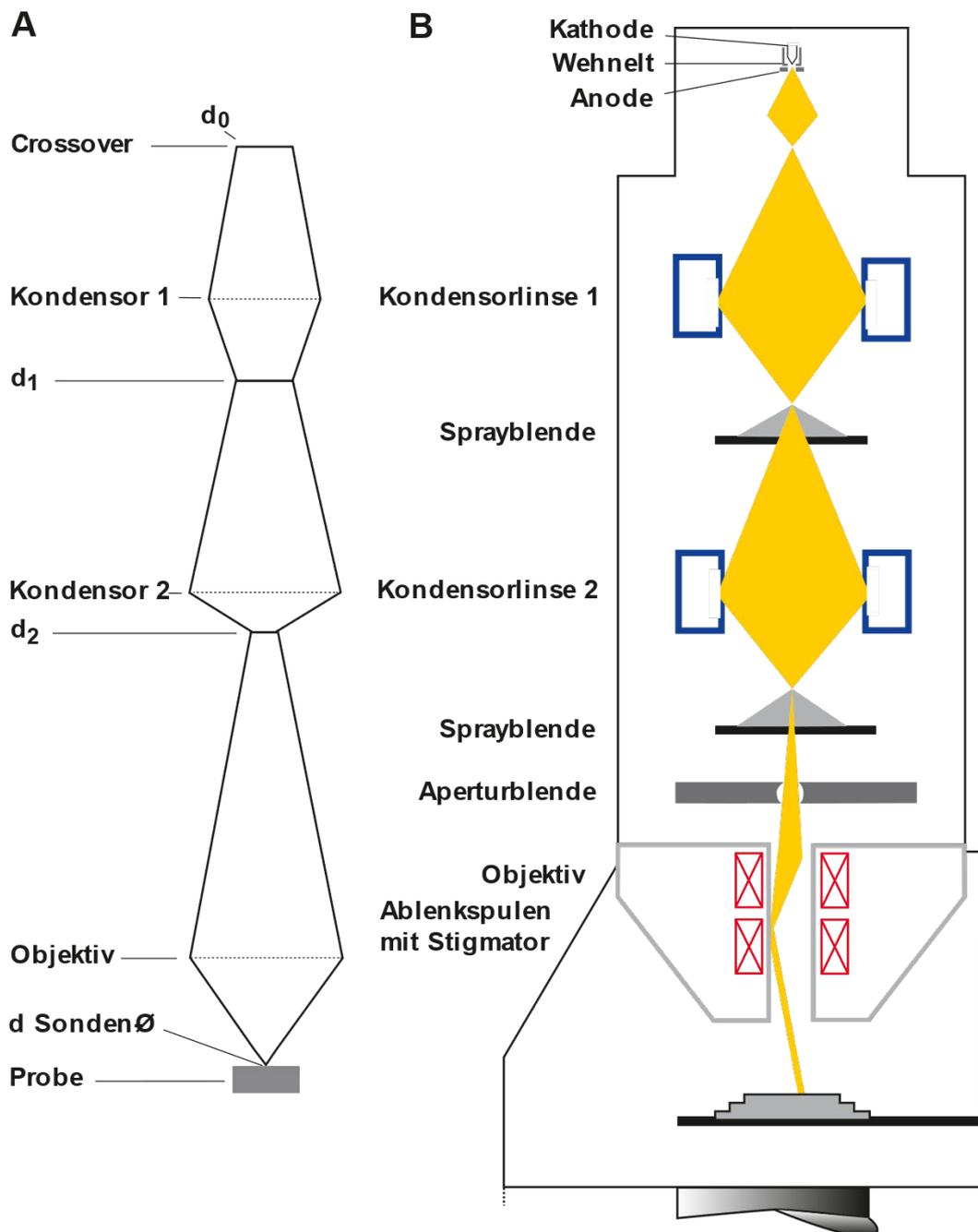


Abbildung 12 Schematischer Aufbau eines SEM¹⁰⁹

Für die Versuche wurden die Polymerpartikel 1 zu 9 mit MilliQ Wasser verdünnt und auf ein Silicium Wafer pipettiert. Daraufhin wurden sie zur Erhöhung des Kontrasts mit einer dünnen Goldschicht überzogen und im SEM platziert. Für die Aufnahmen wurde ein

3. METHODEN

Hitachi SU8000 (HHT, Krefeld) und ein Leo 1530 GEMINI (ZEISS Oberkochen) verwendet. Die Aufnahmen wurden erstellt von Herrn Gunnar Glasser vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung aus dem Arbeitskreis Lieberwirth.

3.7 SYNTHESE VON RHODAMIN B MIT PLGA

Für Versuche am Fluoreszenzmikroskop wurde PLGA mit Rhodamin B kombiniert. Die Synthesevorschrift stammt von Lababidi, Sigal et al.¹¹⁰ Für die Versuche wurden folgende Mengen an Chemikalien benutzt:

Tabelle 2 Verwendete Ausgangsstoffe für die Synthese von Rhodamin B-gelabelten PLGA.

Edukte	Masse [g/mol]	Molarverhältnis der Edukte	n [μmol]
PLGA RG 502 H	7000 - 17000	1.0	50
Rhodamin B	479,01	1.1	55
DCC	206,33	1,5	75
DMAP	122,17	0,1	5

Zunächst wurde Rhodamin B in 25 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit Dicyclohexylcarbodiimid eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt, um die Carbonsäure von Rhodamin B zu aktivieren. Nach der Aktivierung wurden weitere 25 mL

Dichlormethan, in denen PLGA und 4-(Dimethylamino)pyridin gelöst war, hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt, damit die Reaktion möglichst vollständig ablaufen konnte. Um die Reaktion nach Ablauf der Zeit zu unterbrechen, wurde 1 mL Wasser hinzugegeben. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum mit einem Rotationsverdampfer entfernt und das überschüssige Wasser durch Dekantation entfernt.

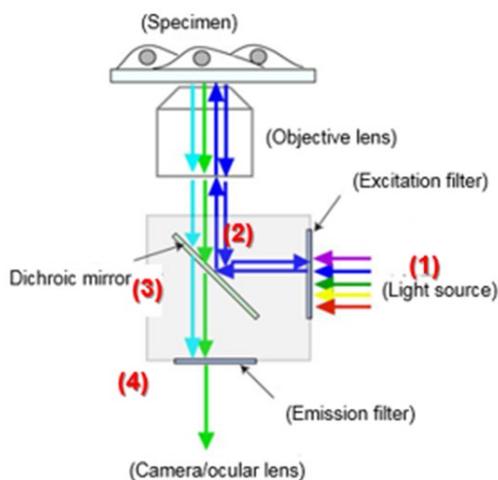
Zum Aufreinigen des Fluoreszenz-gelabelten Polymers wurde es in 20 mL Aceton aufgelöst und mit 20 mL Ethanol gefällt. Bei 20.000 g wurde die Dispersion für 20 min zentrifugiert. Der Überstand, der eine stark rosa Färbung besaß, wurde verworfen. Die Aufreinigungsschritte wurden 5-mal wiederholt, bis keine Färbung im Lösungsmittel mehr zu sehen war. Als letzten Schritt wurde das Polymer-Pellet erneut am Rotationsdampfer unter Vakuum bis zum vollständigen trocknen gestellt, um letzte Lösemittelreste zu entfernen. Das Endprodukt bildete einen pinken, voluminösen Schaum.

3.8 FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird sich zunutze gemacht, dass man bestimmte Moleküle mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen kann und diese fluoreszierenden Moleküle das Licht mit einer anderen Wellenlänge wieder abgeben. Trifft ein Photon mit einer definierten Wellenlänge und somit mit einer bestimmten Energie auf Moleküle, werden deren äußere Elektronen in ein energiereicheres und vorher unbesetztes Orbital versetzt. Beim Zurückversetzen des Elektrons in seinen ursprünglichen Zustand entstehen Photonen mit einer höheren Wellenlänge als die des anregenden Lichts, sie sind energieärmer. Dabei werden die Elektronen vom angeregten S₀-Zustand der äußeren Elektronenschale in den angeregten S₁-Zustand versetzt und umgekehrt. Dieses Verhalten nennt sich Stokes Verschiebung.

3. METHODEN

Durch das Benutzen verschiedener Filter können in einem Objekt unterschiedliche Strukturen gezeigt werden, um sie vom Hintergrund hervorzuheben. Man regt also einen fluoreszierenden Farbstoff mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge oder einem Wellenlängenspektrum an und filtert dieses Licht bei der Bildgebung heraus. Somit werden die Photonen für die Exzitation (Anregung) nicht im Bild gesehen. Die Emission (Abgabe) von Photonen bildet sich jedoch deutlich auf dem Bild ab.¹¹¹ in Abbildung 13 ist der Aufbau eines solchen Fluoreszenzmikroskops schematisch erklärt. Das Licht aus einer Lichtquelle wird in einem bestimmten Bereich durch einen Exzitationsfilter gefiltert und über einen dichroitischen Spiegel zur Probe geleitet. Nachdem die Probe durch das Licht angeregt wurde und es mit einer höheren Wellenlänge wieder abgibt, trifft das emittierte Licht erneut auf den Spiegel. Licht mit einer ähnlichen Wellenlänge, wie der zum Anregen des Moleküls, wird dabei erneut gespiegelt, während der Spiegel für Licht mit einer höheren Wellenlänge durchlässig ist. Letztendlich wird das emittierte Licht ein letztes Mal durch einen Emissionsfilter geleitet, um den Wellenlängenbereich so gering wie möglich zu halten.



TexasRed

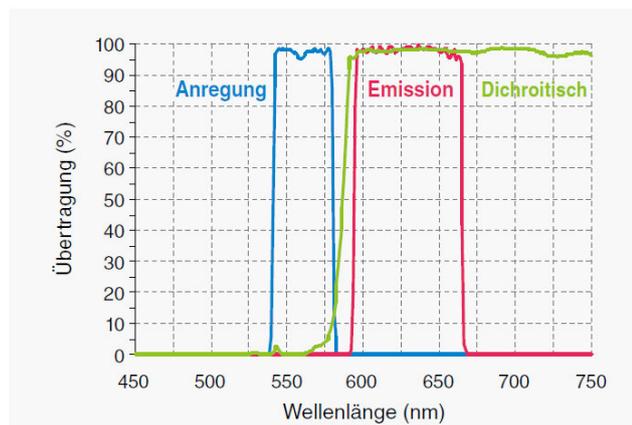


Abbildung 13 A) schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops. B) Wellenlängen für den Filter Texas red, der zum Detektieren von Rhodamin B benutzt wurde.

Für die Versuche wurde ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Keyence Model BZ 8000 benutzt. Die Darstellung von Curcumin wurde mit Licht des Wellenlängenspektrums von $470 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ angeregt und ein Filter verwendet, der für Wellenlängen $535 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$ durchlässig war. Der dichroitische Spiegel filterte Licht unter 495 nm aus der Emission heraus. Für Rhodamin-B wurde Licht im Bereich $560 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ zum Anregen verwendet und ein Filter, der durchlässig für Emissionen bei $630 \text{ nm} \pm 60 \text{ nm}$ war. In diesem Fall konnte Licht mit einer Wellenlänge über 595 nm den Spiegel passieren.

Für die Versuche wurde mit Rhodamin-B gelabeltes PLGA genutzt und Partikel nach der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Methode hergestellt. Es wurden nur Partikel hergestellt und mikroskopiert, die mit Curcumin hergestellt wurden. Für die Versuche wurde ein Tropfen der Probe auf einen Objektträger pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde ohne weitere Abdeckung die Messung vorgenommen.

3.9 DYNAMISCHE DIFFERENZKALORIMETRIE DSC

Die Differenzkalorimetrie (Abbildung 14) ist eine Weiterentwicklung der Differenz-Thermoanalyse. Bei beiden Methoden wird der Temperaturunterschied zwischen zwei Proben gemessen und aufgezeichnet. Zu diesem Zweck werden zwei Thermoelemente benutzt, auf denen jeweils ein Tiegel sitzt. In einem Tiegel befindet sich die Probe mit der zu analysierenden Substanz. Im anderen ist eine Referenzsubstanz enthalten oder er wird leer vermessen. Die Thermoelemente und die Tiegel befinden sich in einem Ofen, der beide Proben möglichst gleichmäßig aufheizt und/oder abkühlt. Registriert wird die Temperaturdifferenz der beiden im jeweiligen Verlauf. Als Referenz sollte ein Material gewählt werden, das beim Erhitzen keine thermischen Anomalien aufweist sowie keinen Phasenübergang. Der Unterschied zwischen DSC und DTA liegt in der Geometrie der Kammer und der Möglichkeit, die aufgenommene Wärmemenge pro Zeit zu erfassen. Ändert sich z. B. der Aggregatzustand der Probe, indem sie schmilzt, wird die Probe im Falle eines Polymers am Glasübergangspunkt nicht so stark erhitzt wie die Referenz. So

3. METHODEN

lassen sich thermische Ereignisse wie Glasübergang, Schmelzpunkt, Kristallisation oder Zersetzung temperaturabhängig feststellen. Ein großer Vorteil dieser Methode ist es, dass man nur wenige Milligramm eines Stoffes für eine erfolgreiche Messung benötigt.

112,113

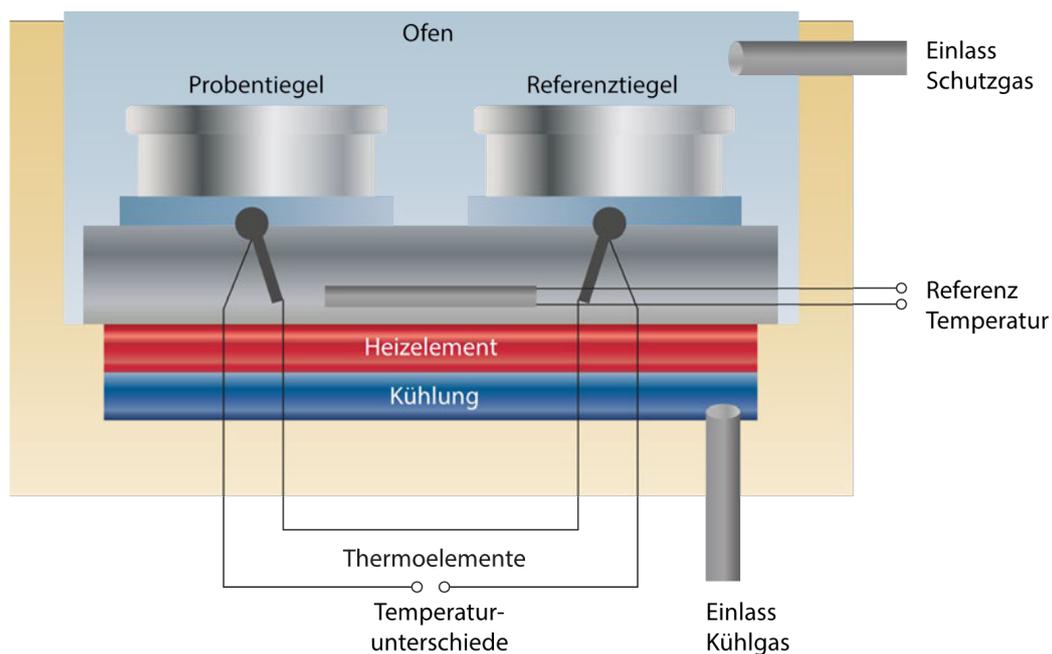


Abbildung 14 Beispielhafter Aufbau einer DSC

In dieser Arbeit wurde eine DSC benutzt, um die Glasübergangstemperatur von PLGA Nanopartikeln zu bestimmen. Als Glasübergangstemperatur bezeichnet man die Temperatur, bei der ein Polymer anfängt in einen zähflüssigen Zustand zu wechseln.¹¹⁴ Dafür wurden die in 3.3.1 beschriebenen Proben nach dem Aufreinigen gefriergetrocknet und in Tiegeln abgewogen. Eine DSC der Firma Thermofischer Modell Star 1 wurde verwendet. Für die Messung wurden Proben zur Vorbereitung zunächst von 10 °C auf 70 °C mit 10 K/min erhitzt, um die Polymere zu schmelzen und den gesamten Boden des Tiegels mit der Probe zu bedecken. Anschließend wurde die Probe 2 min bei 70 °C gehalten und ebenfalls mit einer Geschwindigkeit von 10 K/min wieder auf 10 °C abgekühlt. Daraufhin begann die eigentliche Messung mit einer Starttemperatur von 10 °C und endete bei 300 °C. Die Temperatursteigerung wurde ebenfalls bei 10 K/Min durchgeführt

3.10 MAGNETSYSTEM FÜR NIEDERFREQUENTEN IMPULSE

Das Magnetsystem für die Versuche wurde von Herrn Dr. [REDACTED] vom Max-Planck-Institut für Chemie in Mainz gebaut und für die Freisetzungsversuche zur Verfügung gestellt. Die Freisetzungsversuche wurden eigenständig durchgeführt und ausgewertet.

Um eine Freisetzung von Curcumin aus den magnetischen PLGA-Nanopartikeln zu bewirken, wurde ein eigens konstruiertes Magnetsystem entwickelt und gebaut. (Abbildung 15 und 16) Eine Stromquelle wurde an zwei MOS-FET (Metall-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistor) der Firma Reichelt (Typ IXFN360N15T2)¹¹⁵ angeschlossen, die über einen Stromkreis verbunden waren. In diesem Stromkreis waren mehrere Kondensatoren in Reihe geschaltet. Auf der einen Seite waren es 36 Kondensatoren der Firma WIMA (Model MKP 1)¹¹⁶ mit einer Kapazität von 1000 pF bis 47 µF. Diese waren verbunden mit einem weiteren Kondensator der Firma ROE (IEC Typ 1) mit einer Kapazität von 2200 µF. Auf der anderen Seite wurde ein einzelner Kondensator der Firma Kemet (Model C4DE) mit einer Kapazität von 220 µF verwendet. Diese Kondensatoren bildeten mit einem selbstgewickelten Magneten einen elektrischen Schwingkreis. Der Magnet bestand aus mehreren Lagen Transistorblechen und wurde mit einem 2-poligen Stromkabel 55-mal umwickelt. Die beiden Transistoren wurden angesteuert von einem Gate-Treiber der Marke Texas Instruments (Model UCC21520DWR)¹¹⁷, der beiden Transistoren abwechselnd Be- oder Entladungssignale sendete. Der Controllerchip erhielt sein Signal von einem Voltcraft Universal System MS-9150 Impulsgenerator. Es wurden Rechtecksignale in einer Frequenz von 400 Hz für die Versuche abgegeben. Dieser Wert erklärt sich durch die Resonanzschwingung des Schwingkreises und wird im Resultate-Teil näher beleuchtet. Der Controller wurde durch ein Netzgerät der Firma Conrad Electronic (Model PS-303 D) mit einer Spannung von 12 V versorgt. Dieses Netzteil lieferte ebenfalls den Strom für die beiden Lüfter, die die Probe während der Versuche kühlten. Zum Überwachen der Spannung wurde ein Oszilloskop 1740A (Hewlett Packard) an beide Enden des Schwingkreises parallelgeschaltet. Der Strom für den Schwingkreis wurde geliefert von einem Netzgerät der Firma Aim TTi (Model CPX400DP) und wurde an beide Anschlüsse des Kondensators ROE (IEC Typ 1) geschaltet. Die Stromzufuhr wurde auf 20 V eingestellt und die Stromstärke pendelte sich während der Versuche auf ungefähr 3 A ein.

3. METHODEN

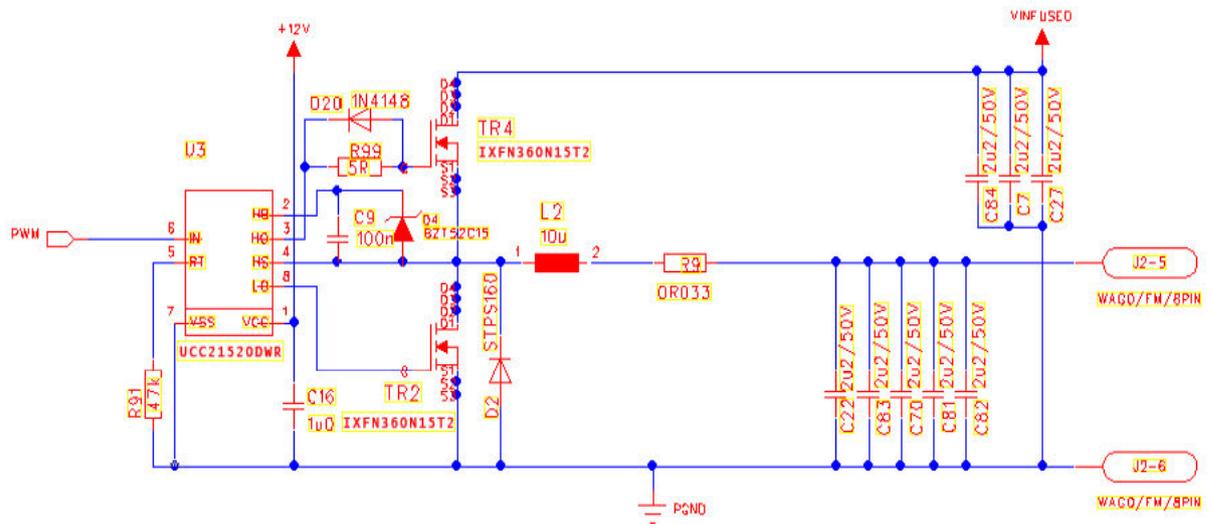


Abbildung 15 prinzipieller Schaltplan der Magnetschaltung

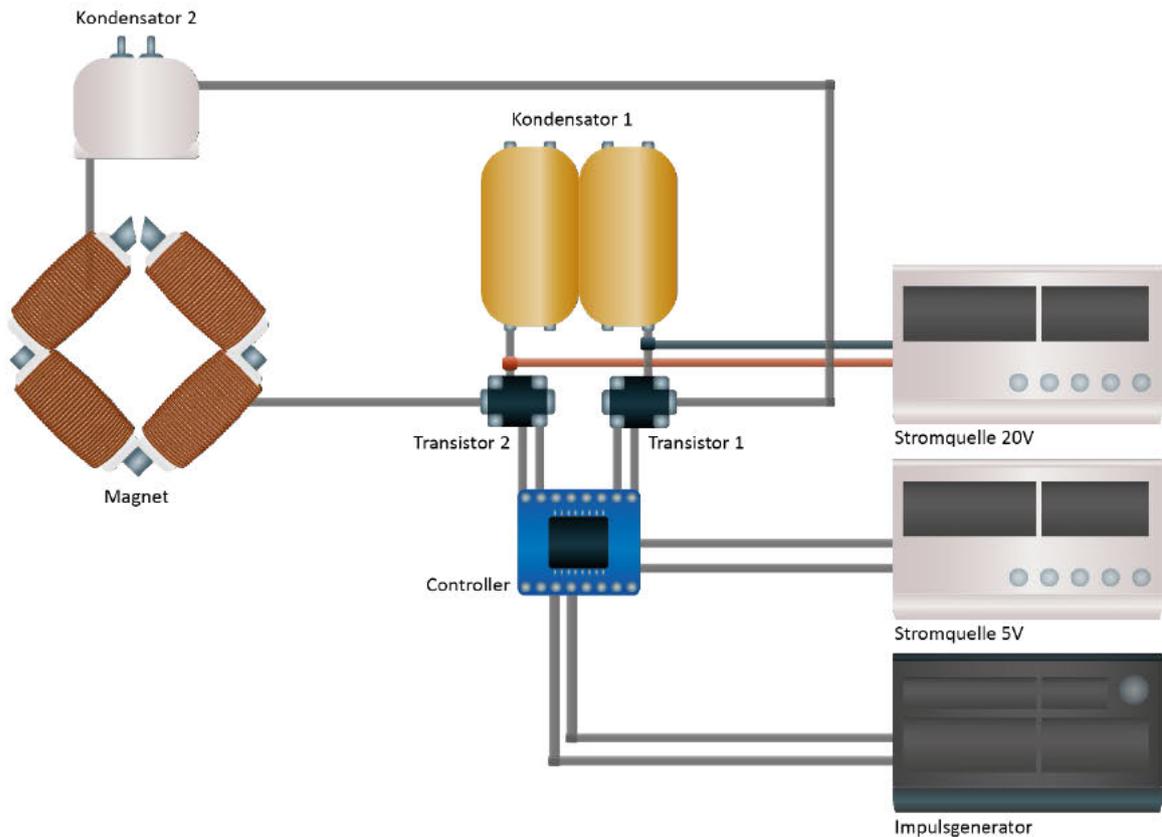


Abbildung 16 vereinfachte graphische Darstellung der Schaltung des Megnetsystems

Die in 3.3.1 beschriebenen Partikel wurden für die magnetischen Freisetzungsversuche eingesetzt. Die Partikel wurden 1 zu 3 mit einer 2 % (m/V) Natriumlaurylsulfat Lösung verdünnt, um die Löslichkeit von Curcumin zu verbessern. Zur Erhöhung der Viskosität wurde bestimmten Proben zusätzlich 2 % (m/V) Hydroxyethylcellulose beigefügt. Dies sollte einer verbesserten Freisetzung dienen, indem die Partikel sich in einem trägeren äußeren Medium mit geringerer Geschwindigkeit bewegen. Anschließend wurden die Proben, um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewährleisten, aus derselben Stammsuspension in 6 Teile aliquotiert. 3 dieser Proben wurden für 30 min im magnetischen Impulssystem einem inhomogenen Magnetfeld ausgesetzt, 3 wurden unbehandelt vermessen. Bei einem anderen Ansatz wurden die Proben zusätzlich zum Natriumlaurylsulfat im Magneten mit einem Rührwerk der Firma IKA Model RW 15 mit Halterung gedreht, um den Impulsen eine Gegenkraft entgegenzustellen. Dabei sollten die Partikel durch die Zentripetalkraft an den äußeren Rand des Probenbehälters gedrückt werden, um somit die Krafteinwirkung des Magneten auf immobilisierte Partikel zu simulieren. In diesem Fall wurden die Blindproben ebenfalls mit dem Rührgerät gedreht, aber ohne den Magneten zu benutzen.

Zum Vergleich wurden Partikel mit einer Größe von 200 nm mit Natriumlaurylsulfat und Hydroxyethylcellulose wie beschrieben vermischt und für 30 min in einem 30 °C warmen Wasserbad erhitzt.

3.11 FLUORESZENZ MESSUNGEN

Für Fluoreszenzmessungen bei den durchgeführten Freisetzungsversuchen wurde ein Tecan Reader (TECAN infinite F200) mit einem Monochromator benutzt. Die Proben wurden mit Licht der Wellenlänge 423 nm angeregt und die Emission wurde bei 525 nm gemessen. Die Proben wurden, nachdem sie dem Magneten ausgesetzt waren, bei 14.000 rpm für 20 min zentrifugiert und der Überstand in 96 Well Plates der Firma Greiner pipettiert. Alle Proben wurden zeitlich so vorbereitet, dass sie nach dem

3. METHODEN

Zentrifugieren für insgesamt 2 Stunden einschließlich der Zeit in der Zentrifuge und im Magneten in Kontakt mit der Lösung aus Natriumlaurylsulfat waren. Um ein Ausbleichen der Proben zu verhindern, wurden sie so gut wie möglich vor Licht geschützt, indem die Greiner Platten seitlich und am Boden lichtundurchlässig waren und direkt nach dem Pipettieren lichtgeschützt mit Aluminiumfolie abgedeckt wurden.

3.12 MTT-ASSAYS

Die Messung und die Analyse der Daten mit dem MTT-Assay wurden von Matthias [REDACTED] im Arbeitskreis [REDACTED] m Universitätsklinikum Mainz durchgeführt.

Der MTT Assay wurde erstmals von Mosmann im Jahr 1983 vorgestellt. Bei dieser Art der Viabilitätsbestimmung wird die Viabilität einer Zellkultur anhand der Konzentration von Formazan-Abbauprodukten des Substrates 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) gemessen. Der leicht gelbe Ausgangsstoff MTT wird in Zellen zu einem dunkelblauen Abbauprodukt durch mitochondriale Enzyme verarbeitet. Die Konzentration dieses Abbauprodukts steigt linear mit der metabolischen Aktivität lebender Zellen über die Zeit an und wurde nach 4 Stunden bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch bestimmt.¹¹⁸ Durch das Enzym Succinat-Dehydrogenase wird die Substanz in den Mitochondrien lebender Zellen metabolisiert und kann so selektiv für die Bestimmung der Viabilität der Zellen verwendet werden.¹¹⁹

Für die Zellviabilitätstests wurden verschiedene Partikel zu Milzzellen aus Mäusen in den Konzentrationen 1 mg /mL, 0,5 mg /mL, 0,1 mg /mL, 0,05 mg /mL und 0,01 mg /mL pipettiert. Getestet wurden PMMA, PMMA-HA 5%, PMMA-HA 10 % und PLGA. Als zytotoxische Negativkontrolle wurde eine 10 % DMSO Lösung in Wasser verwendet und als Standard Zellen ohne Partikel- und DMSO-Zusatz. Die Viabilität wurde anhand der mitochondrialen Aktivität bestimmt. Die Konzentrationen wurden für jede Partikelart in technischen Triplikaten gemessen.

In 96 Well Zellkulturplatten wurden 100 µl einer Stammsuspension aus 10^7 murinen Milzzellen pro ml eingesetzt. Anschließend wurden die Partikelsuspensionen und DMSO wie oben beschrieben hinzugegeben. Am nächsten Tag wurde die metabolische Aktivität, wie vom Hersteller (Promega, Madison, Wi) angegeben, gemessen und ausgewertet.

3.13 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Messung und die Analyse der Daten mit dem MTT-Assay wurden von Matthias [REDACTED] im Arbeitskreis [REDACTED] [REDACTED] m Universitätsklinikum Mainz durchgeführt.

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, bei der Zellen in einem konstanten Strom aus Medium, meistens PBS-Puffer, an einem Detektor vorbeigeführt werden. Die Zelltypen können durch dynamische Lichtstreuung, Fluorochrome oder auch Metalle markiert werden und anschließend, je nach Gerät, anhand ihrer Größe, ihres Gewichts, der Granularität oder der Wellenlänge ihrer Fluoreszenz voneinander getrennt werden. Um dies im Fall der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie zu erreichen, werden die Zellen in der Pufferflüssigkeit in einer engen Kapillare mit langsamer Fließgeschwindigkeit gepumpt, während die Kapillare von mehreren Lasern durchstrahlt wird. Zellspezifische Oberflächenproteine werden zuvor mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert. Dadurch lassen sich je nach Wellenlänge Zellen in Gruppen aufteilen. Um sie möglichst in der Mitte des Stromes zu halten, wird die Zellsuspension von oben in das Medium geleitet. So werden, abhängig von der Fließgeschwindigkeit, die Zellen möglichst einzeln am Laser vorbeigeführt. Die abgestrahlte Fluoreszenz wird mit einem Detektor gemessen und so eine bestimmte Wellenlänge einem dazugehörigen Antikörper zugeordnet. Die

3. METHODEN

Zellen werden anschließend anhand des Signals aufgeteilt und ihre Größe mit der Messung der dynamischen Lichtstreuung erfasst.¹²⁰

Für die Versuche wurden 3 Ansätze durchgeführt und ausgewertet. Einerseits wurde das Protein CD19 in Milzzellen mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert, um B-Zellen zu erfassen. Im zweiten Ansatz wurde aus Knochenmark alle Ly6G-positive neutrophile Granulozyten detektiert. Zur Generierung größerer Zahlen an dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen wurden Knochenmarks-Progenitorzellen mit GM-CSF für eine Woche kultiviert.¹²¹ Beide Zelltypen wurden durch den Nachweis von CD11c, das nur von DC exprimiert wird, differenziert.

PMMA Partikel wurde wie oben beschrieben mit Curcumin markiert und für die Durchflusszytometrie verwendet. Partikel mit 0 % MAHA und 5% MAHA, welche auch in 3.12 benutzt wurden, wurden bei diesen Versuchen genutzt, um die Aufnahme der Partikel in verschiedene Arten von Immunzellen zu beobachten. Für die Versuche wurden die Zellen (Milzzellen, Knochenmarkszellen, knochenmarksabgeleitete DC und Makrophagen) einen Tag mit den Partikeln versetzt und am Folgetag mit Antikörpern inkubiert. Nach Zugabe der Antikörper wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit einem Farbstoff versehen, der durch Zellmembranen von toten Zellen diffundieren kann, jedoch nicht von lebenden Zellen aufgenommen wird (Fixable Viability Dye, FVD). Nach einem letzten Waschgang wurden die Zellen per Durchflusszytometrie vermessen und anhand der Signale unterteilt.

Bei der angewendeten Gating-Strategie wurden mithilfe von zeitgleichen Messungen der dynamischen Lichtstreuung zuerst alle Signale aussortiert, die zu klein für lebende Zellen waren und wahrscheinlich auf Bruchstücke schließen ließen. Anschließend wurden Zell-Agglomerate aussortiert. Dann wurden alle Signale von toten Zellen entfernt, indem nur Zellen ohne FVD-Färbung berücksichtigt wurden.

Da die isolierten Zellen, insofern sie Partikel aufgenommen haben, auch Curcumin enthielten, konnte abschließend eine Aussage über die Aufnahme von Partikeln in die verschiedenen Zelltypen getroffen werden. In Abbildung 17 ist das Gating für DC und Makrophagen exemplarisch dargestellt.

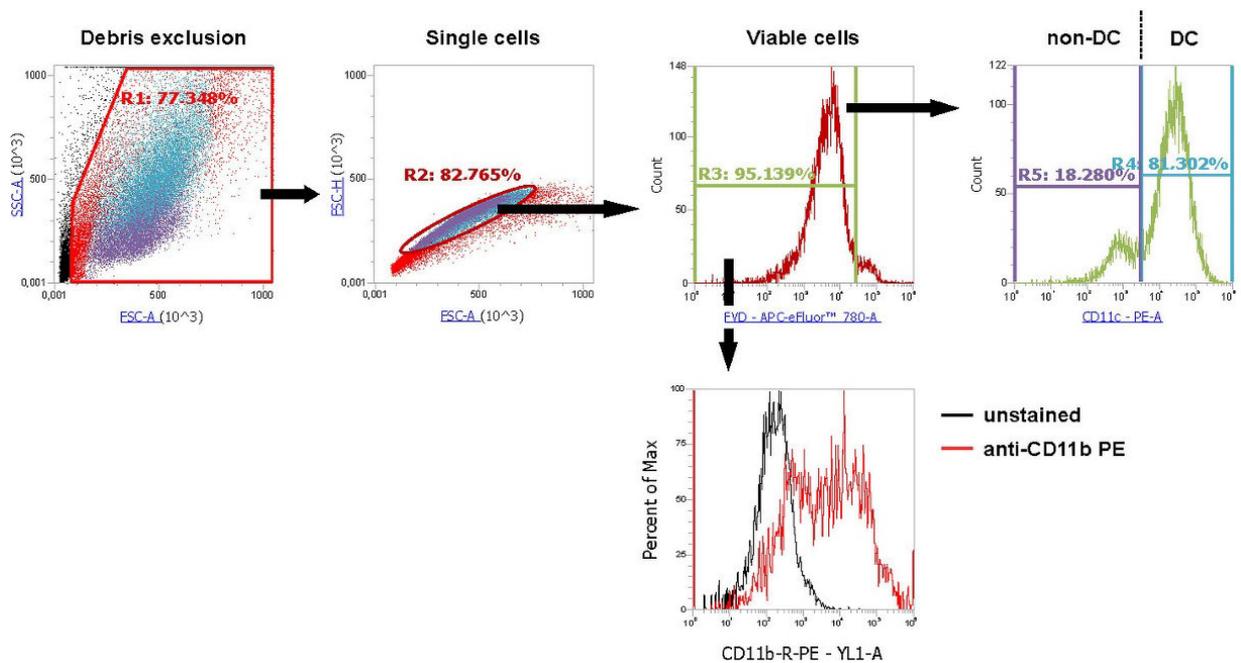


Abbildung 17 Aufteilungsstrategie für die Leukozyten am Beispiel von BMDC.

Zunächst wurden Zellbruchstücke, Zellaggregate und tote Zellen (FVD positive) entfernt. In diesem Beispiel wurden $CD11c^+$ Zellen den dendritischen Zellen zugeordnet, während $CD11c^-$ Zellen zu den Makrophagen zählen.

3.14 GEHALTSBESTIMMUNG VON INKLUDIERTEN EISENPARTIKELN

Die Eisenbestimmung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Jennifer [REDACTED] aus dem Arbeitskreis [REDACTED] -Chemie- an der Johannes Gutenberg-Universität in Kooperation durchgeführt.

Die Eisenbeladung wurde über den Eisenkomplexbildner Ferrozin bestimmt. Als ersten Schritt wurden die Partikel lyophilisiert und gewogen. Damit die Partikel und die Polymerhülle möglichst effizient zersetzt werden konnten, wurden 1,9 mg der Probe mit 2 mL Salpetersäure (50 %Vol) für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Natronlauge genutzt, um die Lösung zu neutralisieren. Mit einem Ferrozin-Kit der Firma Bioanalytic GmbH (006502-6001), wurde das Eisen in den Proben komplexiert und gegen einen Eisenstandard photometrisch gemessen. Hierfür wurden 100 µL der Proben mit 500 µL Acetatpuffer versetzt, dieser enthielt außerdem Ascorbinsäure zur Reduktion von Eisen (III) zu Eisen (II). Zur Komplexierung wurden 20 µL der Ferrozinlösung verwendet. Die Messungen wurden bei 25 °C mit einem UV/VIS Detektor JASCO V-630 durchgeführt. Es wurden ganze Spektren aufgenommen und das Absorptionsmaximum bei 562 nm für die Berechnung genutzt. Zur Berechnung der Konzentration wurden folgende beiden Gleichungen verwendet:

$$\Delta E_{SB} = E_S - E_B$$

$$c(Fe) = \Delta E_{SB} \cdot \frac{1,4 \text{ mg L}^{-1}}{E_{CAL}}$$

Hierbei ist E_S die Absorption in der Probe und E_B die Messung einer Referenz ohne Eisen. $c(Fe)$ beschreibt die zu ermittelnde Konzentration an Eisen. E_{cal} ist die Absorption des Eisenstandards unter gleichen Bedingungen. $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ ist ein vom Hersteller vorgegebener Wert, der im Bezug zur Referenz steht.

4 ERGEBNISSE NIEDERFREQUENTE FREISETZUNG AUS PLGA-NANOPARTIKELN

4.1 EIGENSCHAFTEN VON SUPERPARAMAGNETISCHEN EISENOXID NANOPARTIKELN

Die Bilder des Transmissionselektronenmikroskops sind in Abbildung 18 zu sehen. Bei näherem Betrachten kann man die Struktur der Eisenoxidpartikel genauer beobachten. Die gitterförmigen Verbünde können bei der vergrößerten Abbildung genau gesehen werden und zeigen, dass die Synthese zu mehr oder weniger gleichmäßigen runden Partikeln geführt hat, die einen strukturierten Aufbau besitzen, den man in dieser Form von Kristallen kennt.¹²²

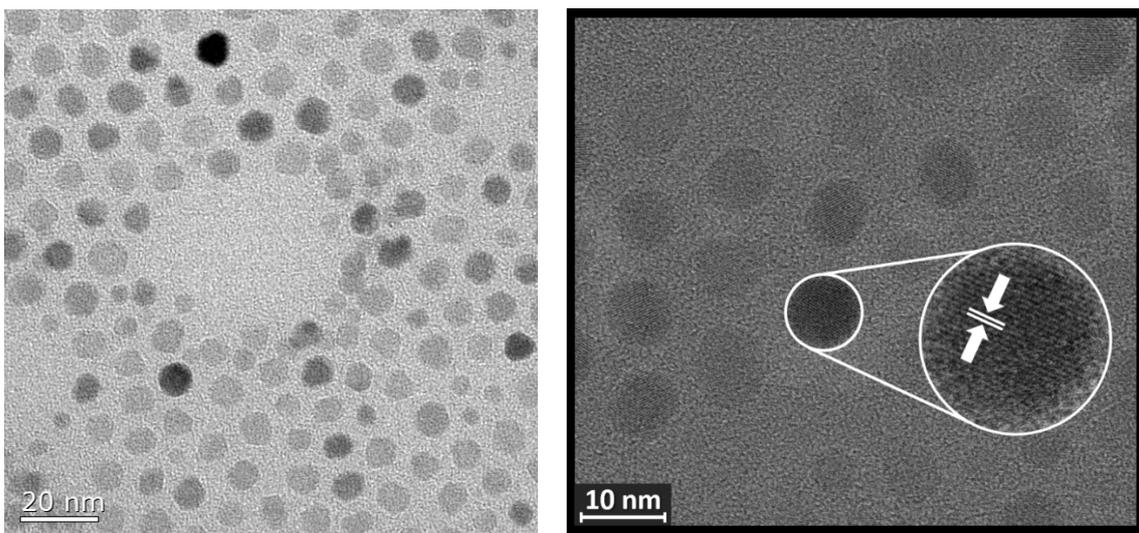


Abbildung 18 TEM-Aufnahme von eigens hergestellten SPIONs mit einer Ölsäure Ummantelung. Die Partikel wurden zur Größenbestimmung direkt als Suspension in Chloroform getrocknet und vermessen. (Die linke Abbildung wurde zur Bestimmung der Größenverteilung verwendet)

Gezeigt werden Eisenoxidnanopartikel im Transmissionselektronenmikroskop. Links bei einer Skalierung von 20 nm zur Übersicht. Rechts mit einer Skalierung von 10 nm. Bei erhöhter Vergrößerung kann die Kristallstruktur erkannt werden. Der Verlauf des Kristallgitters wird durch die beiden weißen Linien verdeutlicht.

Die Größenanalyse der SPIONs wird in Abbildung 19 dargestellt und zeigt den Durchschnitt der gemessenen Partikel. Da keiner der Werte 20 nm übersteigt, besitzen diese Partikel wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben nur eine magnetische Domäne und sollten

superparamagnetische Eigenschaften besitzen, insofern sie magnetisierbar sind. Zudem ist die Größenverteilung sehr gleichmäßig und unterschreitet an keinem Punkt 4 nm oder übersteigt 11 nm. Da alle vollständig abgebildeten Partikel für die Analyse gemessen wurde, ist davon auszugehen, dass die SPIONs fast ausschließlich in diesem Größenbereich zu finden sind.

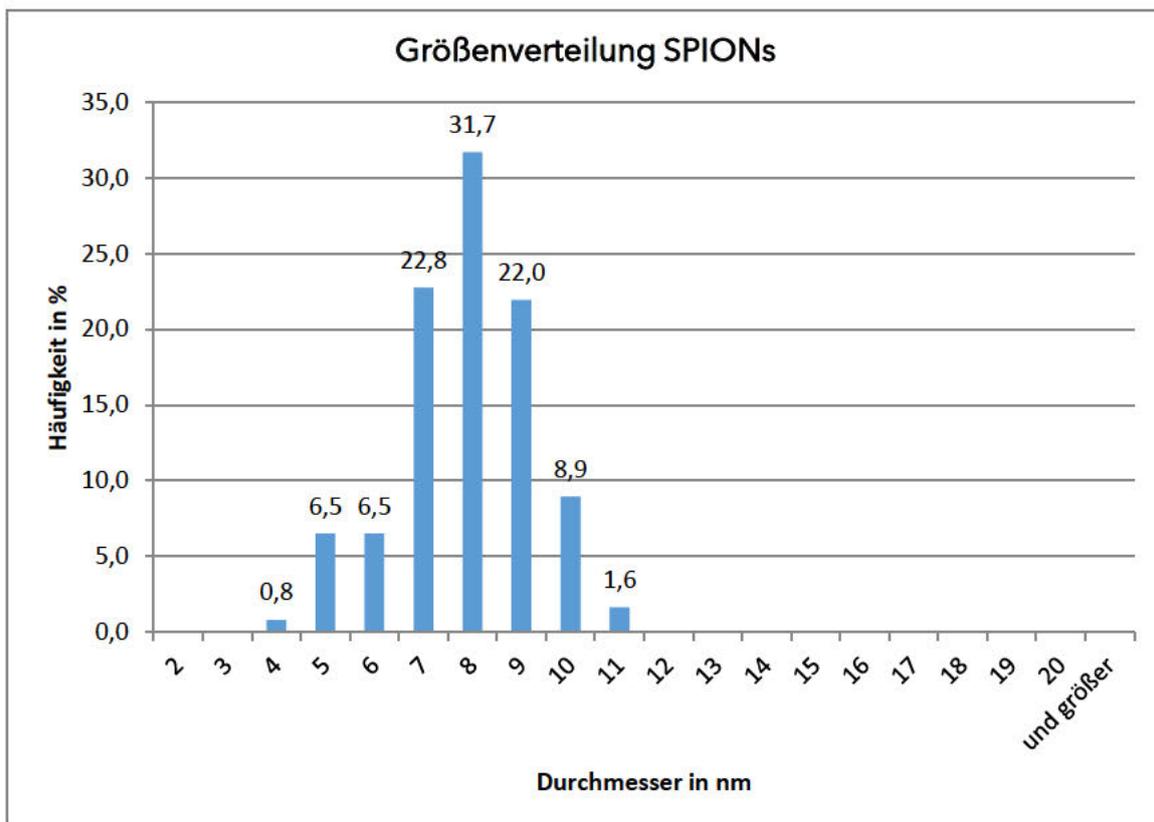


Abbildung 19 die Größenverteilung der SPIONs in Prozent in Bezug auf ihre Größe in nm (Aufgerundet).

Die superparamagnetischen Eigenschaften der Eisenoxidpartikel wurden anhand einer VSM Messung bewiesen. Abbildung 20 zeigt den Verlauf der Magnetisierung. Nach einer anfänglichen Plateauphase (Kurve in orange), in der keine nennenswerte Magnetisierung erfolgt, da das Magnetfeld noch zu schwach für einen sichtbaren Effekt ist, steigt der Wert rapide an. Mit steigender Magnetfeldstärke wird ein erneutes Plateau erreicht, das entsteht, indem die Partikelmagnetisierung ab einem bestimmten Punkt gesättigt ist und auch bei stärkerem Magnetfeld nicht weiter steigt. Bei rückläufiger magnetischer Feldstärke (blaue Punkte) ist keine Hysterese zu verzeichnen. Die magnetischen

Eigenschaften sinken auch nach anfänglicher Magnetisierung mit denselben Werten wieder ab.

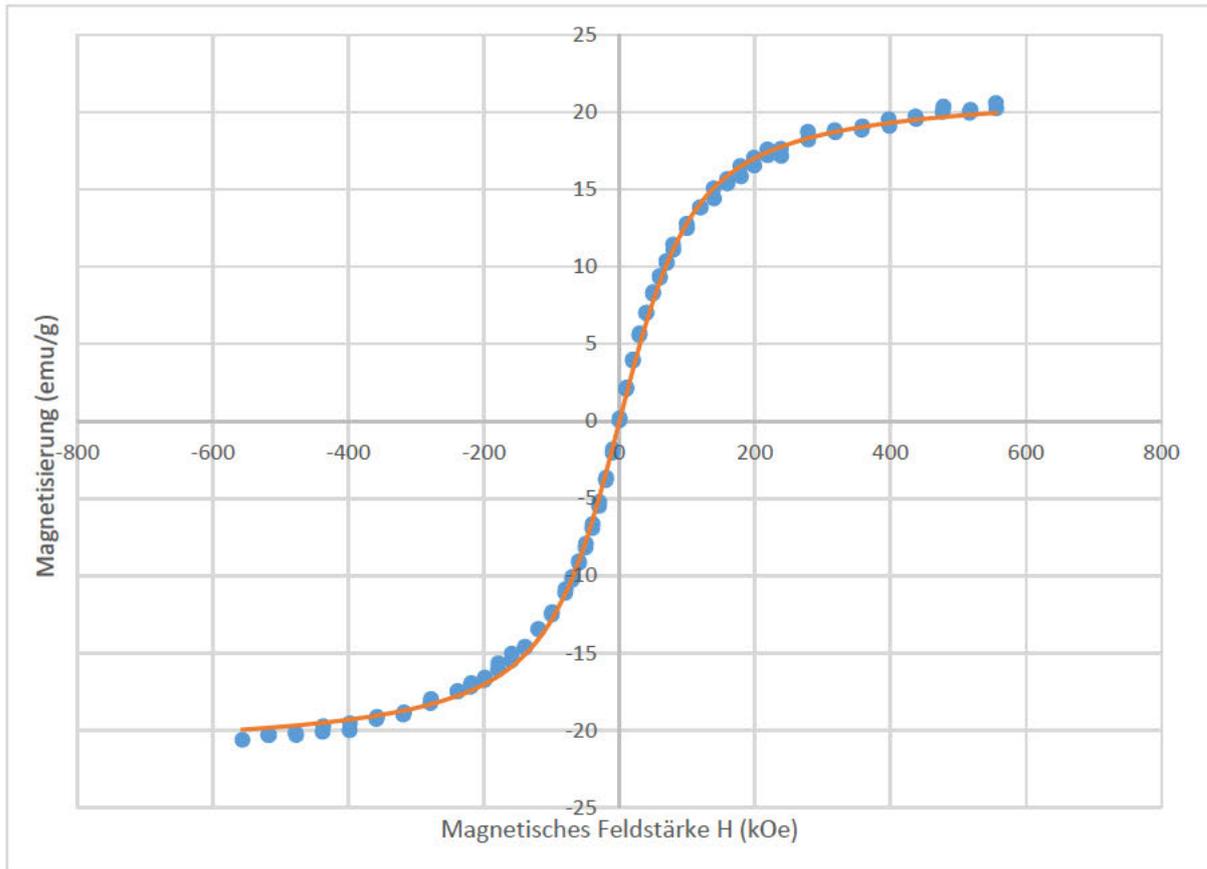


Abbildung 20 Die Langevin-Funktion der VSM Messung.

Gezeigt wird die Magnetisierung der Partikel bei steigender Feldstärke und die Entmagnetisierung mit sinkender Feldstärke. Das Fehlen einer Hysterese kann deutlich beobachtet werden.

4.2 CHARAKTERISIERUNG VON PLGA-NANOPARTIKELN

4.2.1 GRÖßENBESTIMMUNG DURCH DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG

Tabelle 3 Daten aus den DLS-Messungen der PLGA-Partikel „Standard“ im Durchschnitt. Partikel, die mit einer 2 % PVA-Lösung hergestellt wurden mit Ihren unterschiedlichen Beladungen im Vergleich.

Standard	Durchmesser	PDI
Blank Ø	213,0 ± 6,1	0,089 ± 0,019
Iron Ø	257,5 ± 7,8	0,104 ± 0,027
Curcumin Ø	220,4 ± 3,6	0,076 ± 0,018
Iron + Curcumin Ø	241,6 ± 8,9	0,093 ± 0,024

Tabelle 4 Daten aus den DLS-Messungen der PLGA-Partikel „BIG“ im Durchschnitt. Partikel, die mit einer 1 % PVA-Lösung hergestellt wurden mit Ihren unterschiedlichen Beladungen im Vergleich.

Big	Durchmesser	PDI
Blank Ø	395,3 ± 11	0,049 ± 0,032
Iron Ø	528 ± 21,1	0,08 ± 0,056
Curcumin Ø	379,1 ± 14,6	0,026 ± 0,016
Iron + Curcumin Ø	439,7 ± 31,7	0,072 ± 0,043

Tabelle 3 und 4 zeigen die Größenbestimmung und den Polydispersitätsindex der hergestellten Partikel. Zu sehen sind die verschiedenen hergestellten Polymerpartikelarten und die beiden unterschiedlichen Größen. Mithilfe der Tabellen kann geschlussfolgert werden, dass der Einsatz von SPIONs bei der Partikelherstellung einen Einfluss auf die Größe der Partikel hat. In beiden Fällen haben wir eine deutliche Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers bei Proben mit Eisen und einer Kombination aus Eisen und Curcumin. Auffällig ist, dass die Beladung mit Curcumin keinen großen Unterschied auf die Größe der Partikel hat. Die Durchmesser steigen bei einer Kombination aus beiden jedoch nicht stärker als durch die reine Eisenbeladung. Bei der Größenverteilung zeigt sich sogar ein leichter Trend zu gleichmäßigeren Partikelgrößen, wenn Curcumin eingesetzt wird. Reines Eisenoxid hingegen verschlechtert die Verteilung, die Kombination aus beiden befindet sich wie bei den Durchschnittsgrößen zwischen den Werten der anderen beladenen NP. Reine PLGA-Partikel hingegen zeigen einen größeren Polydispersitätsindex als Partikel mit Curcumin. Diese Daten zeigen ebenfalls, dass Curcumin einen stabilisierenden Einfluss auf die Gleichmäßigkeit der Größen hat. Auffällig ist die Tatsache, dass der PDI bei den größeren Partikeln niedriger und damit besser ist als bei den Kleineren.

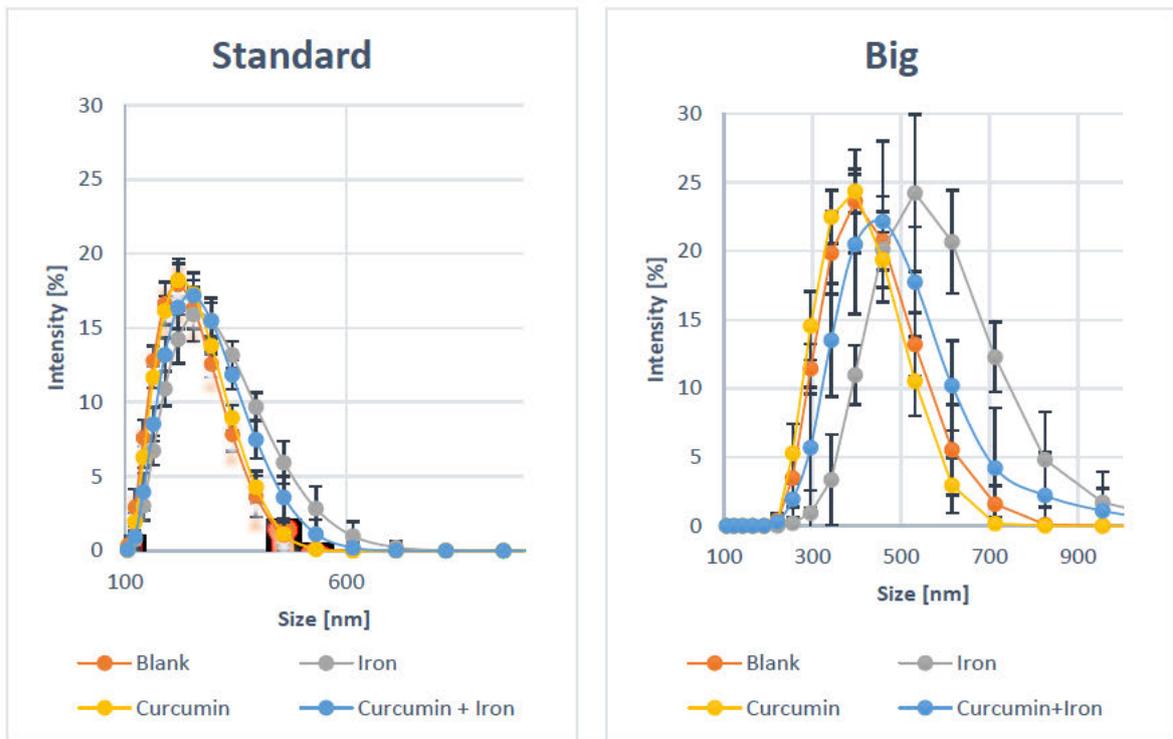


Abbildung 21 A DLS Daten aus Tabelle 4 und 5 als Größenverteilung dargestellt. Streulichtintensität gegen Partikelgröße

A.) Daten der Partikel mit 2% PVA. B.) Partikel mit 1% PVA.

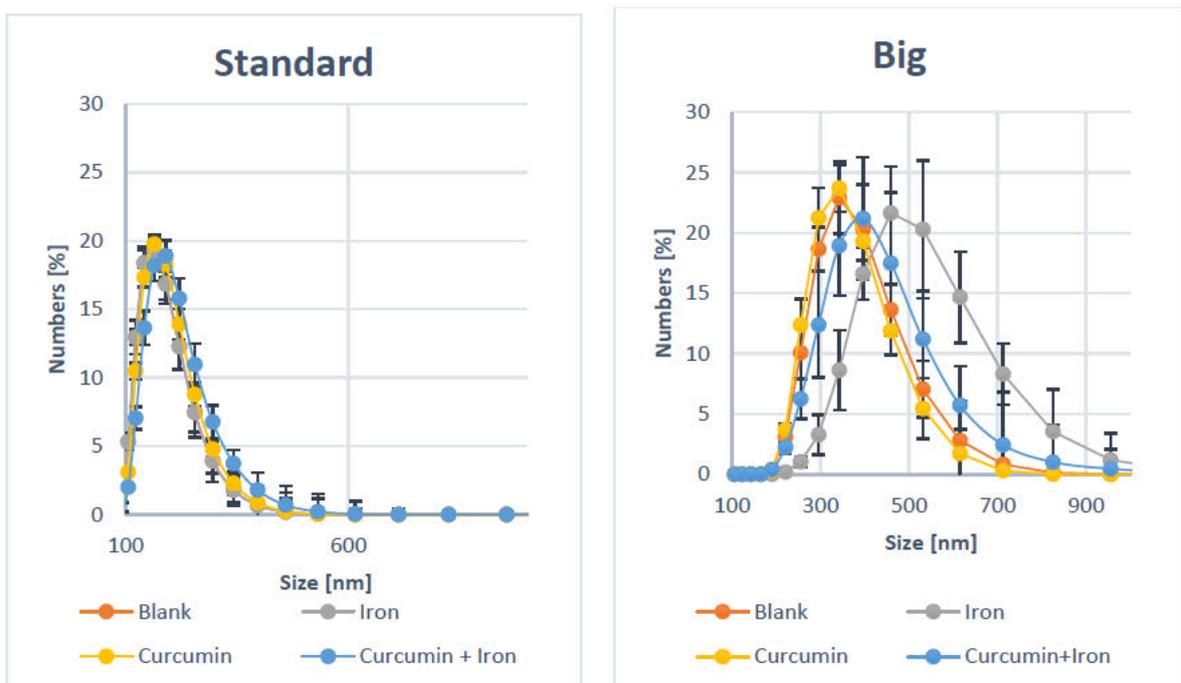


Abbildung 21 B DLS Daten aus Tabelle 4 und 5 als Größenverteilung dargestellt. Partikelanzahl gegen Partikelgröße

4.2.2 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER PLGA-PARTIKEL

4.2.2.1 PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 1 % PVA LÖSUNG (STANDARD)

Auf den Bildern in Abbildung 22 A und B sind Partikel zusehen, die in ihrer Herstellung auch in der PVA Konzentration denen von Shi, Thum et al.¹⁰⁷ nachempfunden sind. Die Partikel besitzen eine runde Form und weisen untereinander ähnliche Größen auf. Dies deckt sich mit den Daten aus den DLS-Messungen, in denen eine Größenverteilung von ca. 200 nm zu sehen war. Betrachtet man die Verteilung der DLS-Daten, sind Partikelgrößen zwischen 100 nm im Minimum und einige wenige mit einer Größe über 500 nm zu sehen. Die Aufnahmen zeigen ähnliche Größen und untermauern die Messungen mit der dynamischen Lichtstreuung.

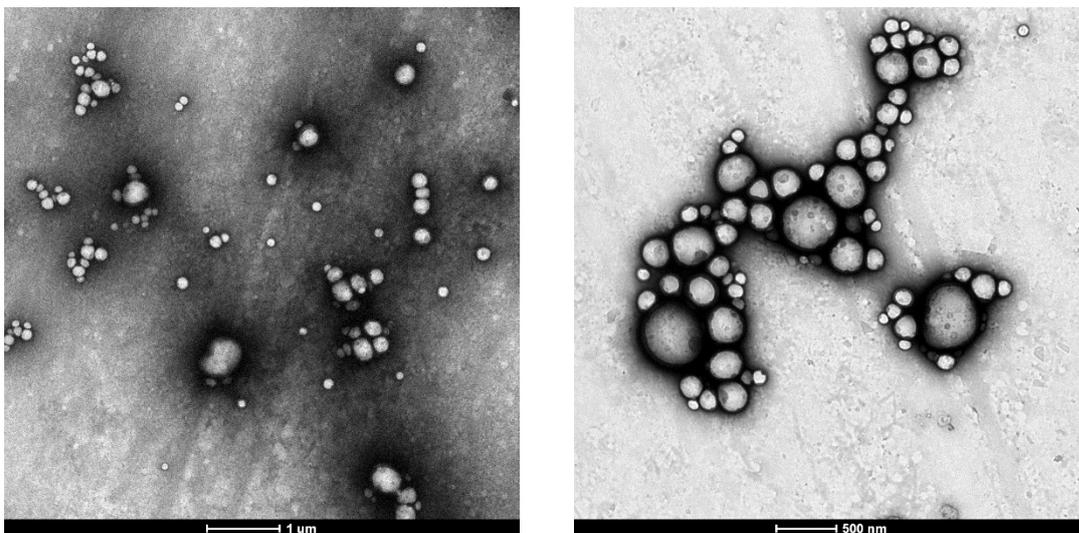


Abbildung 22 PLGA-Partikel mit Uranylacetat gefärbt und mit Eisenoxidpartikeln beladen.

A) links mit einer Skalierung von 1 µm B) rechts mit einer Skalierung von 500 nm

Bei genauerer Betrachtung (Abbildung 23) erkennt man, dass die SPIONs auf der Oberfläche der Partikel lokalisiert sind. Wären Partikel im Inneren eingeschlossen, würde man viele von ihnen unscharf in der Tiefe sehen können. Dort sind sie durch ihre hohe Elektronendichte und somit ihrem hohen Kontrast als schwarze Punkte erkennbar. Es zeigt sich, dass sich die hydrophoben Eisenoxidpartikel als Cluster auf den Partikeln

zusammenlagern. Die Partikel verteilen sich, abhängig vom Volumen der Trägerpartikel, vergleichsweise uniform auf die einzelnen Träger. Man kann beobachten, dass sich auf den größeren Partikeln auch mehr SPIONs befinden.

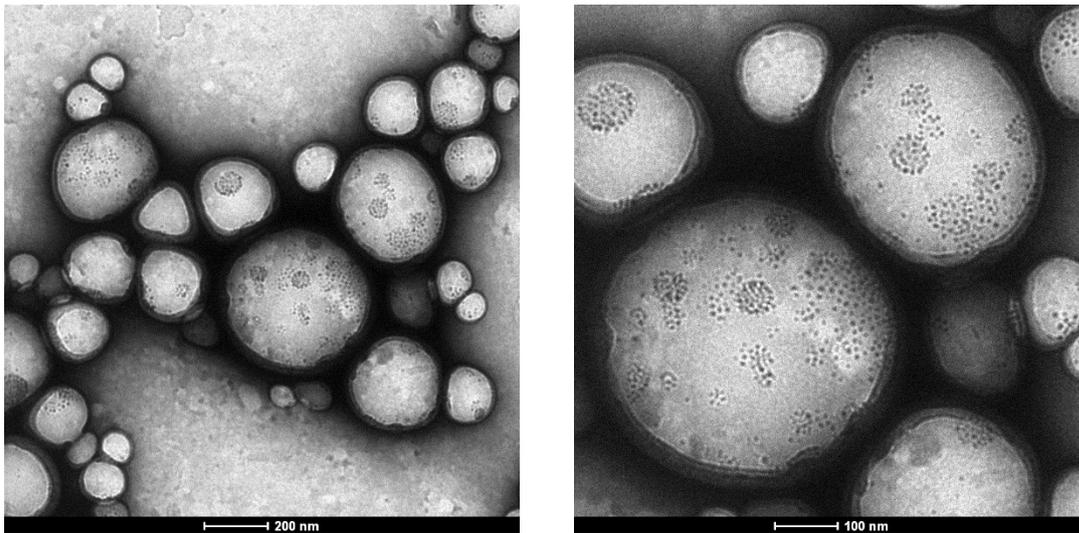


Abbildung 23 Eine nähere Betrachtung der Partikel aus Abbildung 22 B)

Verbünde an SPIONs verteilt auf PLGA Partikeln. Links A) bei einer Skalierung von 200 nm rechts B) Bei einer Skalierung von 100 nm.

Ähnliche Beobachtungen lassen sich bei den Partikeln mit Curcumin, Eisenoxid und einer 2 % PVA-Lösung machen. (Abbildung 24) Die Partikel sind rund und gleichmäßig geformt, außerdem sind die Größen ähnlich verteilt wie bei den Partikeln, die nur mit Eisenoxid hergestellt wurden. Größere Partikel kommen jedoch seltener vor. Auch dies deckt sich mit den Daten aus der DLS, bei denen die Größenverteilung mit Curcumin mit einem PDI von $0,093 \pm 0,024$ nicht so stark streut, im Vergleich zum PDI der mit Eisen beladenen Partikel $0,104 \pm 0,027$.

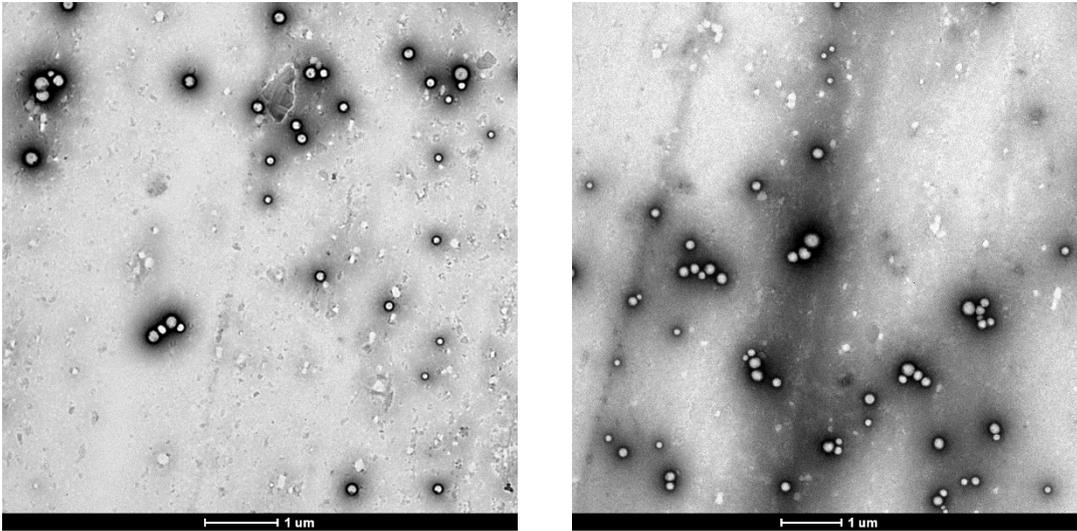


Abbildung 24 A) und B) PLGA-Partikel mit Uranylacetat angefärbt und mit Eisenoxid und Curcumin beladen. Beide mit einer Skalierung von 1 µm.

Benutzt man eine höhere Vergrößerung, (Abbildung 25) sind die Bilder auch hier ähnlich zu den Aufnahmen ohne Curcumin. Die Partikel zeigen Eisenoxid, das sich in kleinen Clustern auf den Partikeln befindet. Die Verteilung des Eisens wird durch das Curcumin nicht beeinflusst. Weitere Unterschiede oder Auffälligkeiten sind ebenfalls nicht festzustellen.

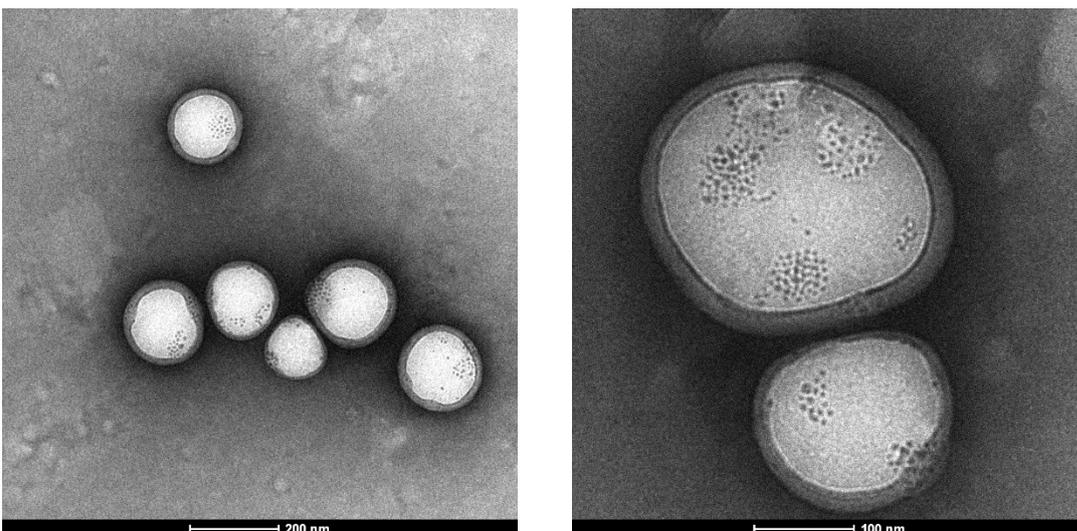


Abbildung 25 Eine nähere Betrachtung der Partikel aus Abbildung 24.

Cluster an SPIONs verteilt auf PLGA-Partikeln. Links A) bei einer Skalierung von 200 nm rechts B) Bei einer Skalierung von 100 nm.gmai

4.2.2.2 PLGA-PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 1% PVA-LÖSUNG

Durch Senken der PVA-Konzentration um 1 Prozent wurden Partikel mit einem größeren Durchmesser hergestellt. (Abbildung 26) Die Oberflächenspannung der einzelnen Partikel stieg beim Homogenisieren an, daraus resultierten in der Emulsion beim Herstellungsprozess größere Tröpfchen und somit größere Partikel beim Aushärten. Die Bilder des Transmissionselektronenmikroskops bestätigen diesen theoretischen Ansatz. Auch hier formen sich aufgrund der geochemischen Struktur Sphären. Die Cluster an SPIONs lassen sich nun durch ihre Größe schon bei niedriger Vergrößerung und einer Skalierung von einem Mikrometer erkennen. Auch die Größenverteilung deckt sich mit den Daten der DLS. Die Partikelgrößen bewegen sich alle auf einem ähnlichen Niveau und zeigen keine Unregelmäßigkeiten in Form von Ausreißern.

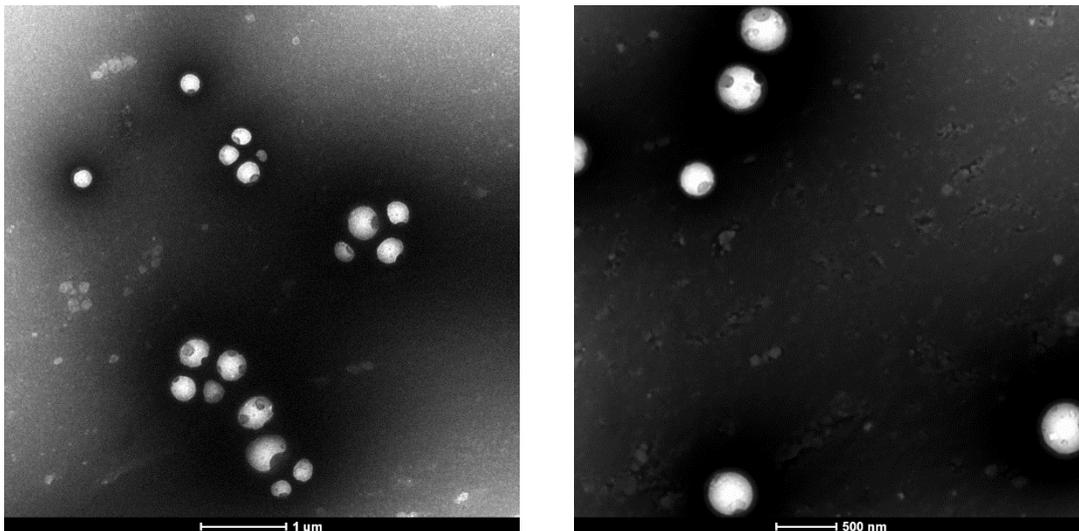


Abbildung 26 PLGA-Partikel mit Uranylacetat gefärbt und mit Eisenoxidpartikeln beladen.

A) links mit einer Skalierung von 1 µm B) rechts mit einer Skalierung von 500 nm Als schwarze Flecken in den Partikeln sind SPIONs erkennbar.

Auch bei näherem Hinsehen (Abbildung 27) zeigen sich keine Auffälligkeiten bei den größeren Partikeln. Die Cluster werden erwartungsgemäß größer und die Beladung mit Eisenoxid pro Partikel sichtlich höher. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass dies

durch das höhere Volumen der Partikel und somit durch die Aufteilung der SPIONs auf eine geringere Anzahl von Partikeln der Fall ist.

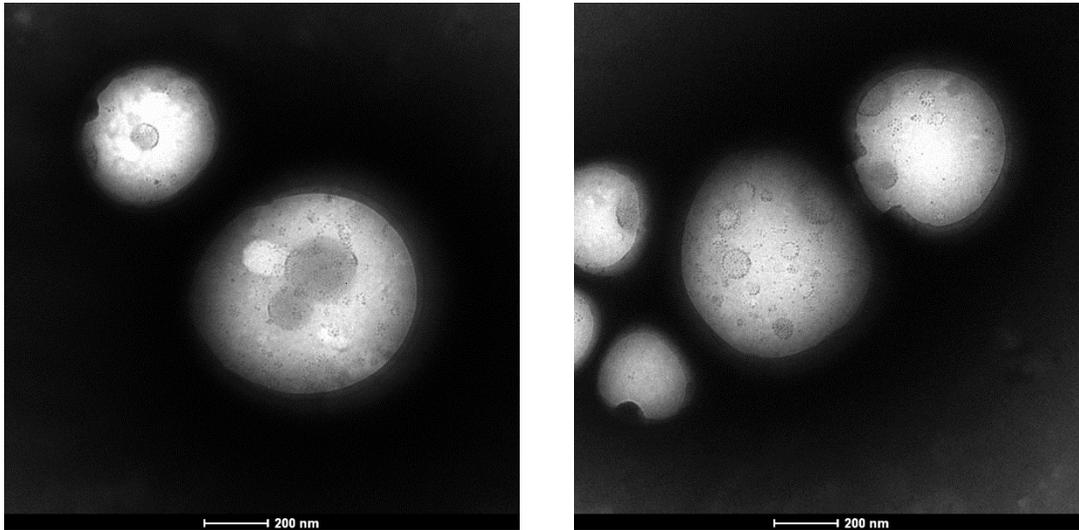


Abbildung 27 Eine nähere Betrachtung der Partikel.

Cluster von SPIONs verteilt auf PLGA-Partikel. Beide mit einer Skalierung von 200 nm.

Bei größeren Partikeln (Abbildung 28) hat Curcumin, abgesehen von einer leicht verbesserten Verteilung, keinen Effekt auf die Form der Sphären. Auch vergrößert (Abbildung 29) zeigt sich das gleiche Verhalten wie bei den kleineren Partikeln, das Curcumin scheint keine Auswirkungen auf die Form oder die Beladung mit Eisenoxid zu haben.

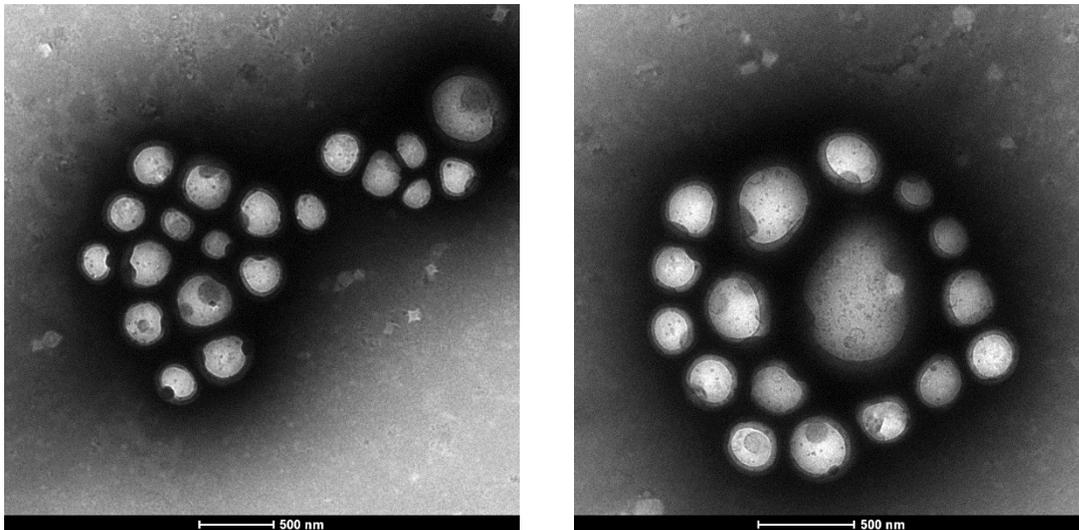


Abbildung 28 PLGA-Partikel mit Uranylacetat gefärbt und mit Eisenoxid und Curcumin beladen. Beide mit einer Skalierung von 500 nm.

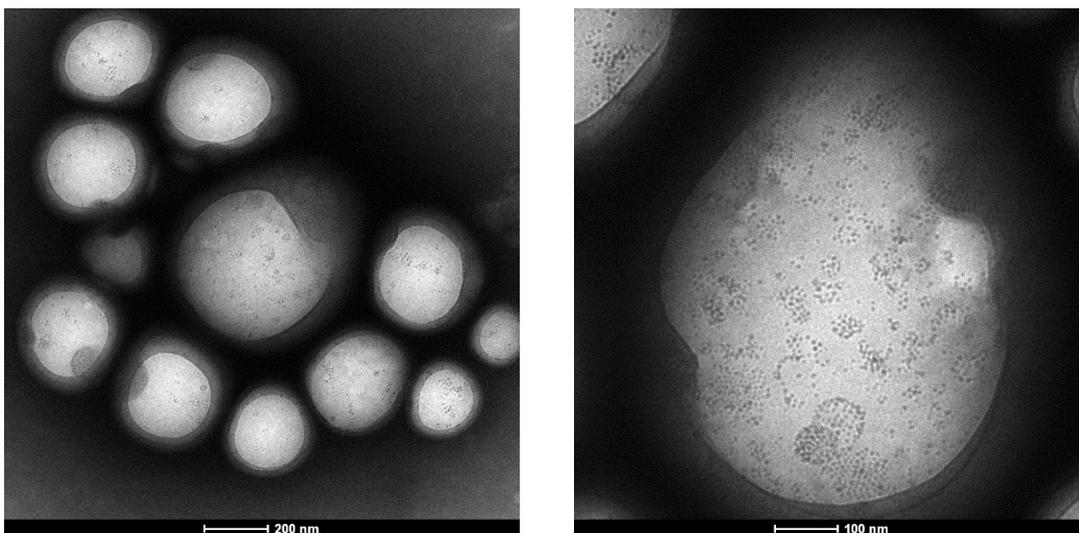


Abbildung 29 Eine nähere Betrachtung der Partikel.

Cluster von SPIONs verteilt auf PLGA-Partikel. A) links mit einer Skalierung von 200 nm B) rechts mit einer Skalierung von 100 nm

4.2.3 RASTERELEKTRONENMISKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON PLGA-PARTIKELN

4.2.3.1 PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 2 % PVA LÖSUNG (STANDARD)

Die Charakterisierung der Partikel durch das Transmissionselektronenmikroskop konnten durch die Aufnahmen des Rasterelektronenmikroskops bestätigt werden. Diese Aufnahmen sollten zeigen, dass sich Eisen außerhalb der Partikel befindet und die sphärische Form der Partikel endgültig bestätigen. Wie vorausgesagt handelt sich bei den Partikeln um kugelförmige Objekte. (Abbildung 30) Der Einschluss von Curcumin hat in diesem Zusammenhang nur einen geringen Einfluss auf die äußere Erscheinung der Partikel. Die Oberfläche von unbeladenen und curcuminhaltigen Partikeln ähneln sich stark und zeigen nur leichte Abweichungen und Unregelmäßigkeiten bei Letztgenanntem. Der Einfluss des Eisenoxids scheint hier deutlich stärker zu sein. Die hohe Menge an Eisenoxid bewirkt sichtbare Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche und lässt die Partikel nicht vollkommen sphärisch wirken. Der gleichzeitige Einsatz von Curcumin und Eisen hat ebenso einen ungünstigen Effekt auf die runde Form. Nichtsdestotrotz sind es annähernd runde Partikel, die als einzelne Partikel vorliegen. Außer einer leichten Tendenz in den Abbildungen 30 F und H sind die NP nicht miteinander verschmolzen oder zeigen sonstige Anzeichen von Agglomeration. Da die Partikel keine Brüche aufweisen, handelt es sich hier um Vollpartikel ohne Hohlraum.

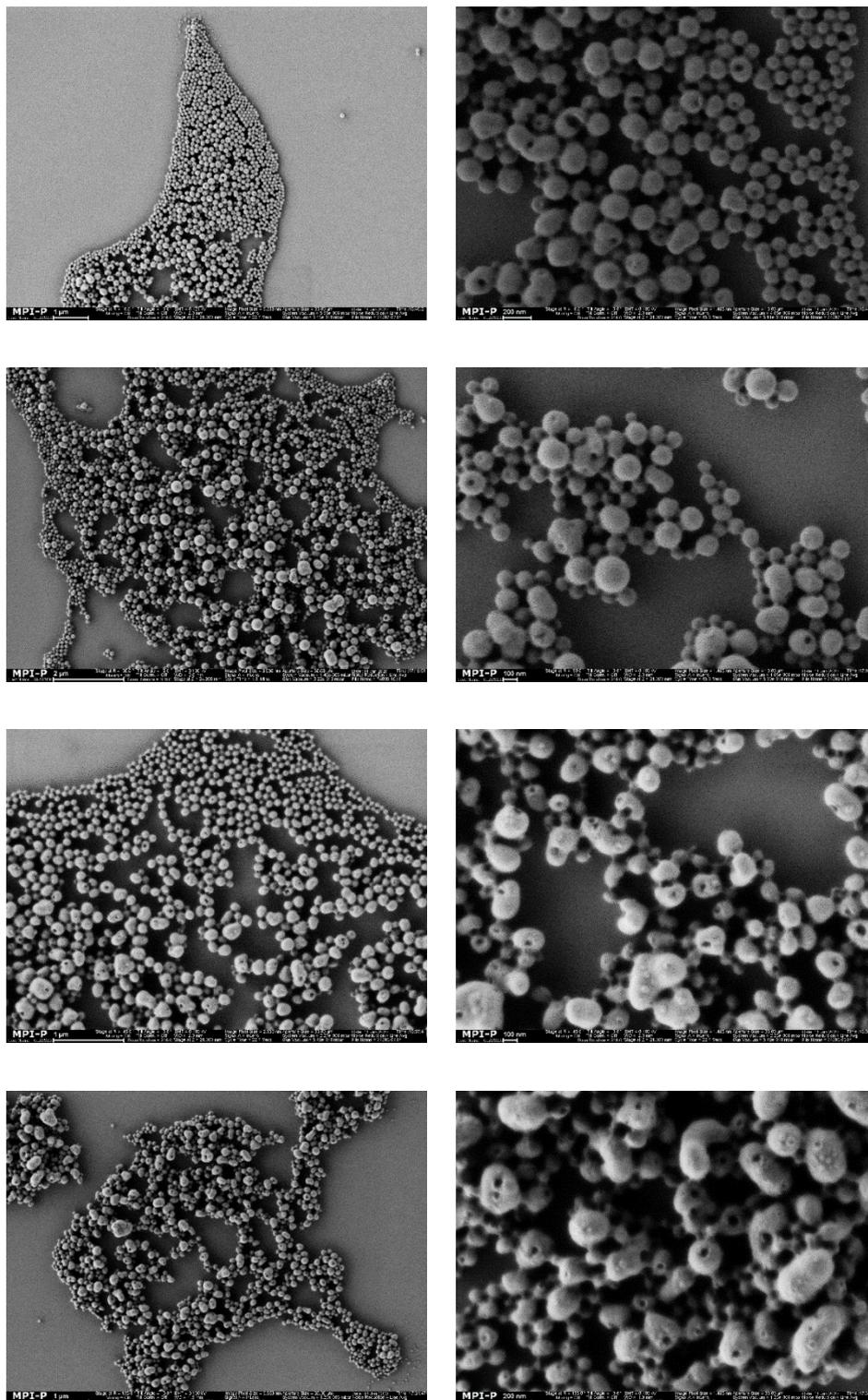


Abbildung 30 SEM-Aufnahmen der PLGA Partikel mit 2 % PVA.

A) und B) PLGA-Partikel mit Standard Größe ohne Beladung. C) und D) PLGA-Partikel mit Standard Größe beladen mit Curcumin. E) und F) PLGA-Partikel mit Standard Größe beladen mit Eisenoxid. G) und H) PLGA-Partikel mit Standard Größe beladen mit Curcumin und Eisenoxid.

4.2.3.2 PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 1 % PVA LÖSUNG (BIG)

Bei den größeren Partikelarten lässt sich der Einfluss der Beladung noch etwas deutlicher sehen. (Abbildung 31) Die Auswirkungen der Beladung auf die Partikelform sind noch besser erkennbar. Wie auch bei den vorherigen Aufnahmen hat Curcumin fast gar keinen Einfluss auf die Oberflächen. Jedoch ist eine leichte Faltenbildung auf den Partikeln feststellbar. Beim Verwenden von Eisenoxid zeichnet sich das Eisenoxid deutlich auf der Partikeloberfläche ab. Man kann bei genauerer Betrachtung sogar runde punktförmige Verformungen erkennen. Diese scheinen sich sogar kreisrund anzuordnen. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um die hydrophoben Eisenoxidpartikel handelt, die sich nach dem Verdampfen des Ethylacetats an der Oberfläche der Partikel ablagern. Viele Partikel haben runde Einstülpungen an ihrer Oberfläche, für deren Häufigkeit noch keine Erklärung gefunden werden konnte. Für Polymer Partikel ist es normal, dass sie beim Herstellprozess „bursten“ und solche Löcher entstehen.¹²³ Warum sie jedoch so oft auftreten, muss noch geklärt werden. Jedoch könnte dieses Phänomen daran liegen, dass die Partikel bei längerer Bestrahlung mit dem Elektronenstrahl anfangen zu schmelzen oder die Wärmekapazität durch einen hohen Eisengehalt steigt.

4 ERGEBNISSE NIEDERFREQUENTE FREISETZUNG AUS PLGA-NANOPARTIKELN

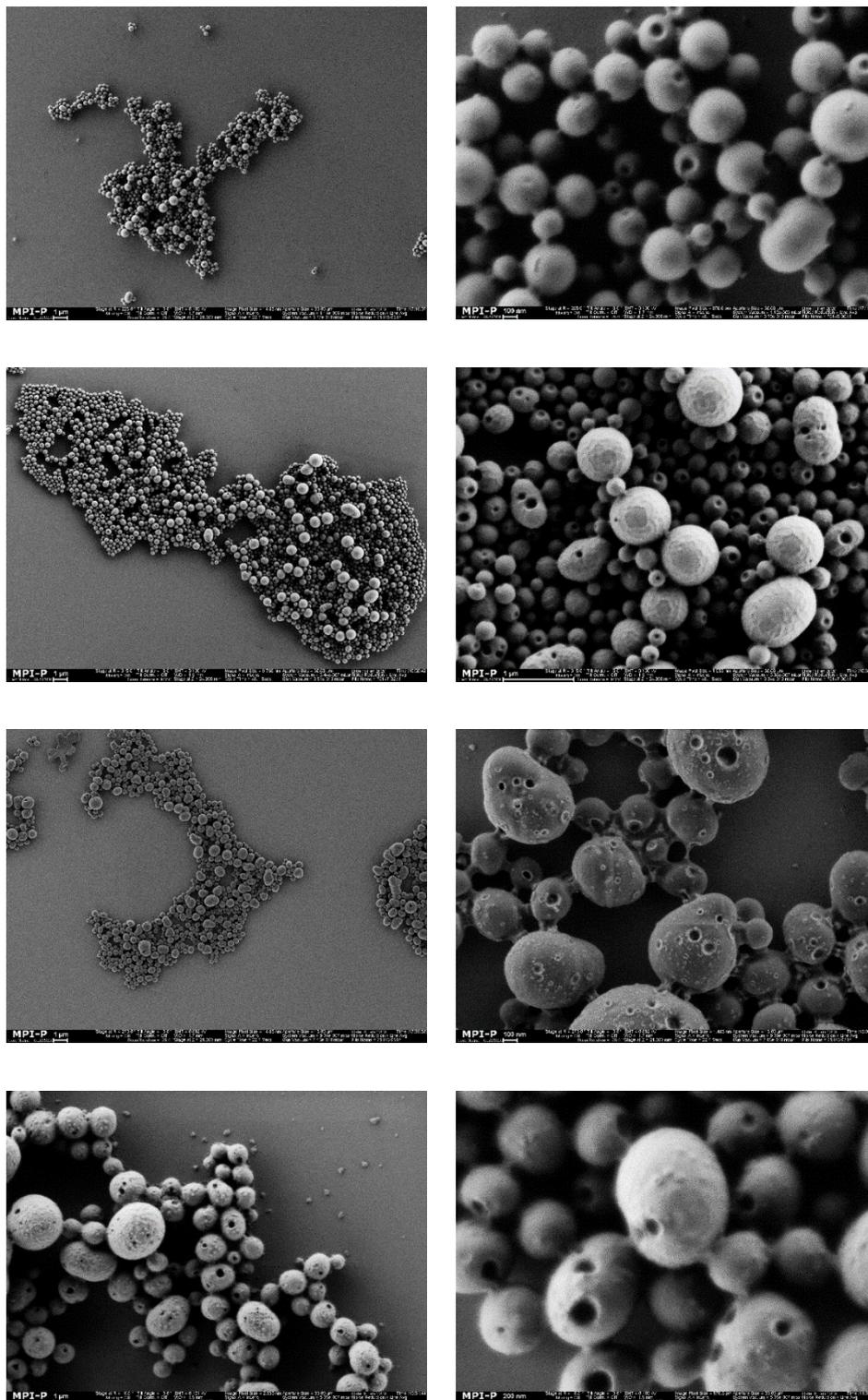


Abbildung 31 SEM-Aufnahmen der PLGA Partikel mit 1 % PVA. A) und B) Größere PLGA-Partikel ohne Beladung. C) und D) Größere PLGA-Partikel beladen mit Curcumin. E) und F) Größere PLGA-Partikel beladen mit Eisenoxid. G) und H) Größere PLGA-Partikel beladen mit Curcumin und Eisenoxid.

4.2.4 FLORESZENZMIKROSKOPIE

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass sich Curcumin fast ausschließlich in den Partikeln befindet. In den Aufnahmen kann man sehen, wie die Proben einzeln mit den jeweiligen Wellenlängen angeleuchtet wurden, oder einfach mit normalem Licht aller Wellenlängen. Auf anderen Aufnahmen wurden die Bilder der Fluoreszenzanregung übereinandergelegt, um Co-Lokalisationen von Rhodamin auf den gelabelten Partikeln und Curcumin im Inneren der Partikel besser darzustellen. Dadurch wäre ein Einschluss von Curcumin in den Partikeln erwiesen.

4.2.4.1 PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 2 % PVA LÖSUNG (STANDARD)

Auf den Aufnahmen in Abbildung 32 sind Partikel dargestellt, die nur mit Curcumin und mit 2 % PVA-Lösung hergestellt wurden. Die Bilder zeigen, dass die Partikel eine Emission bei einer Wellenlänge von $535 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$ (links oben) und einer Wellenlänge von $630 \text{ nm} \pm 60 \text{ nm}$ (rechts oben) besitzen. Die Fluoreszenz muss also von Curcumin (535 nm) bzw. von Rhodamin B (630 nm) stammen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Floreszenzen an den gleichen Stellen zu finden sind. In der Darstellung der überlagerten Bilder in Abbildung 32 D wird es besonders ersichtlich, da es sich um übereinander gesetzte Bilder zu jeweils 50 % handelt. Durch das Mischen der Farben Grün und Rot entsteht eine orangene Farbe, anhand derer man Stellen erkennen kann, bei denen beide Fluoreszenzfarbstoffe an der gleichen Stelle emittieren. Die Aufnahmen in C.) zeigen die gleiche Szenerie ohne Fluoreszenz und bestätigen, dass es sich hierbei um die besprochenen Partikel handelt. Die Bilder in Abbildung 32 wurden ausgewählt, da es die Einzigen waren, in denen sich ein Unterschied darstellen ließ. Hier zeigt sich, wie es aussieht, wenn Curcumin und Rhodamin B an verschiedenen Stellen zu finden wären. Auf Bild B.) ist die Struktur im grauen Kreis nicht zu erkennen. Es handelt sich also um einen Partikel aus reinem Curcumin, der nicht eingeschlossen wurde. Die restlichen Strukturen lassen sich in der anderen Abbildung wiederfinden. An dieser Stelle sei erwähnt, dass dieser Partikel eine Ausnahme darstellt und während der Messungen

kaum Fragmente zu finden waren, die nicht in den Partikeln eingeschlossen wurden. Die Mehrheit war, wie in den darauffolgenden Aufnahmen zu sehen, immer an der gleichen Stelle lokalisiert. Gelöstes Curcumin ist in der Trägerflüssigkeit nicht zu erwarten, da es sich um reines Wasser handelte bei einem pH-Wert nahe 7 und die Löslichkeit von Curcumin bei diesem pH-Wert verschwindend gering ist¹²⁴.

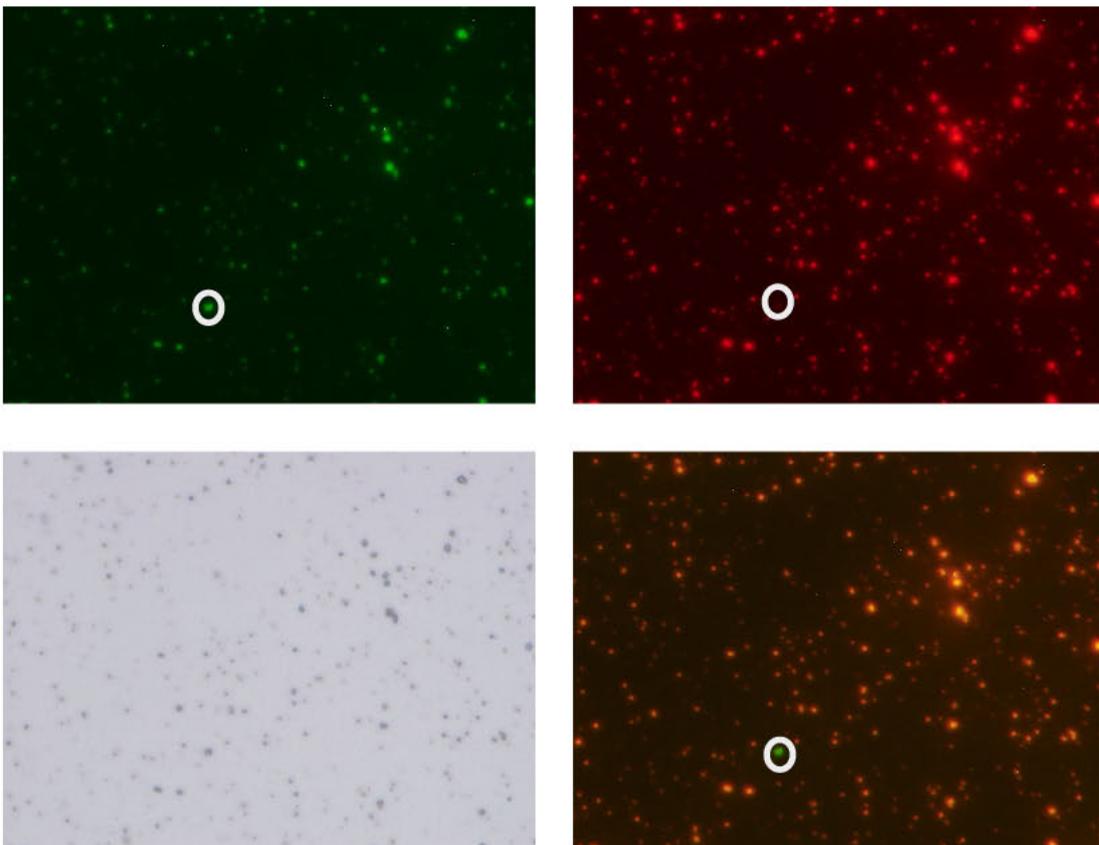


Abbildung 32 Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin B-gelabelten PLGA-Partikeln beladen mit Curcumin und hergestellt in einer 2 % PVA-Lösung.

A.) Licht mit einer Wellenlänge von $470 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ wurde genutzt und die Emission wurde gefiltert bei einer Wellenlänge von $535 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$ B.) Licht mit einer Wellenlänge von $560 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ wurde genutzt und die Emission wurde gefiltert bei einer Wellenlänge von $630 \text{ nm} \pm 60 \text{ nm}$ C.) Normale mikroskopische Aufnahme ohne Filter und mit Licht aller Wellenlängen. D.) Digitale Überlagerung der Aufnahmen A.) und B.) zu jeweils 50 %.

Die Beladung dieser Partikelart mit Eisen hatte keinen Einfluss auf den Einschluss. (Abbildung 33) Es ergab sich dasselbe Bild wie bei reinem Curcumin. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich sehr gut lokalisieren und bilden bei überlagerten Bildern einen Einschluss ab, bei dem sich kein Curcumin in wässriger Lösung außerhalb der Partikel befindet. Aufnahmen mit weißem Licht zeigen auch hier an den gleichen Stellen Partikel.

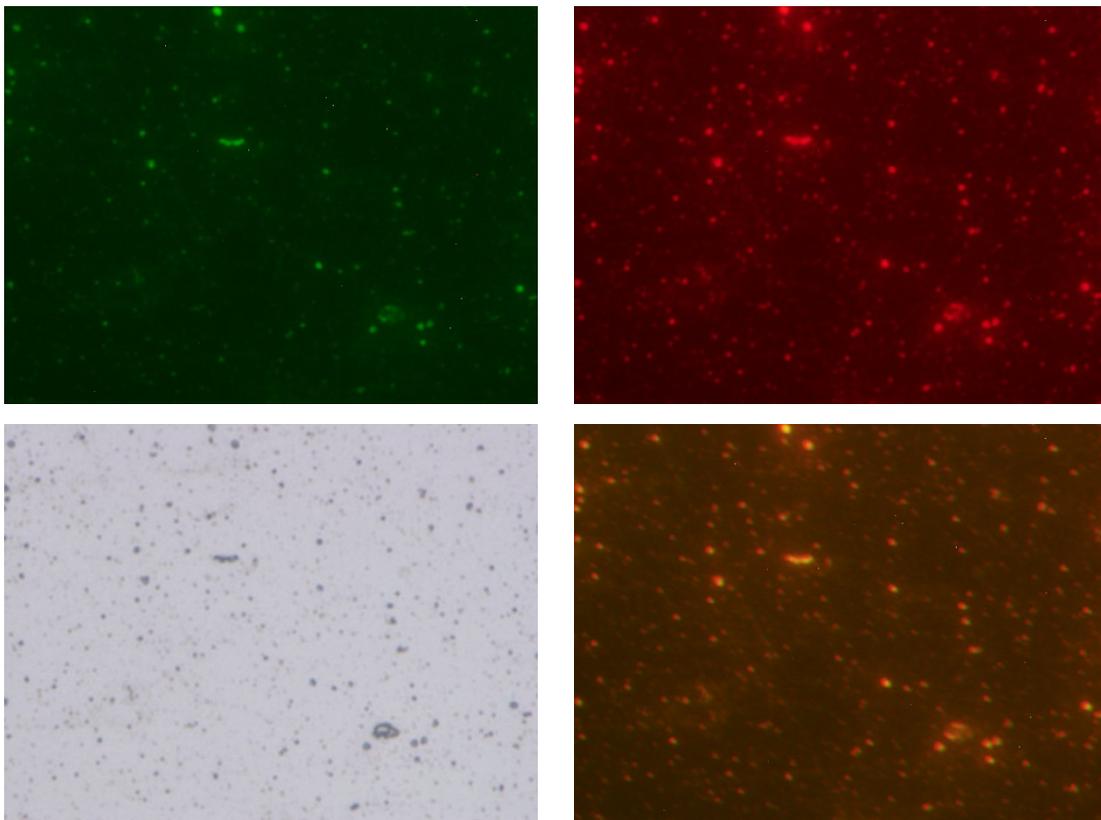


Abbildung 33 Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin B-gelabelten PLGA-Partikeln beladen mit Curcumin und SPIONs und hergestellt in einer 2% PVA-Lösung

A.) Licht mit einer Wellenlänge von $470 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ wurde genutzt und die Emission wurde gefiltert bei einer Wellenlänge von $535 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$ B.) Licht mit einer Wellenlänge von $560 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ wurde genutzt und die Emission wurde gefiltert bei einer Wellenlänge von $630 \text{ nm} \pm 60 \text{ nm}$ C.) Normale mikroskopische Aufnahme ohne Filter und mit Licht aller Wellenlängen. D.) Digitale Überlagerung der Aufnahmen A.) und B.) zu jeweils 50 %.

4.2.4.2 PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 1 % PVA LÖSUNG (BIG)

Die Aufnahmen der größeren Partikel (Abbildung 34) zeigen das gleiche Verhalten. Auch hier sieht man bei den Aufnahmen die Emission an den gleichen Punkten. Es gibt keine Hinweise für ausgetretenes Curcumin aus den Partikeln. Die größeren Durchmesser und damit die größeren Volumina im Vergleich zur Oberfläche haben, wie auch bei den SPIONs, keinen Einfluss auf den Einschluss der hydrophoben Ladung.

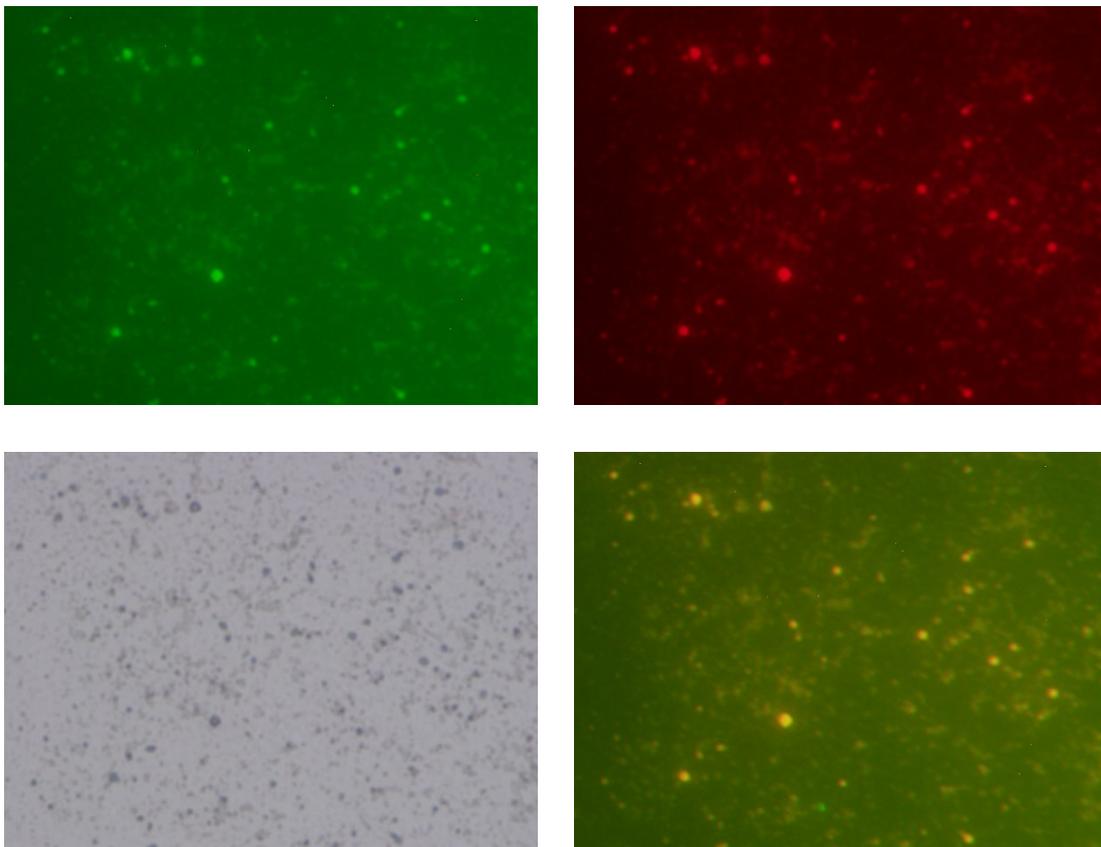


Abbildung 34 Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin B-gelabelten PLGA-Partikeln beladen mit Curcumin und hergestellt in einer 1% PVA-Lösung

A.) Licht mit einer Wellenlänge von $470 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ wurde genutzt und die Emission wurde gefiltert bei einer Wellenlänge von $535 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$ B.) Licht mit einer Wellenlänge von $560 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ wurde genutzt wobei die Emission bei einer Wellenlänge von $630 \text{ nm} \pm 60 \text{ nm}$ gefiltert wurde C.) Normale mikroskopische Aufnahme ohne Filter und mit Licht aller Wellenlängen. D.) Digitale Überlagerung der Aufnahmen A.) und B.) zu jeweils 50 %.

Auch bei einer zeitgleichen Beladung von Curcumin und SPIONs in den größeren Partikeln lässt sich kein Unterschied zu den Partikeln ohne Eisen erkennen. (Abbildung 35) Das Curcumin ist auch hier in den Partikeln eingeschlossen und zeigt kein Bestreben, in das äußere Medium zu diffundieren.

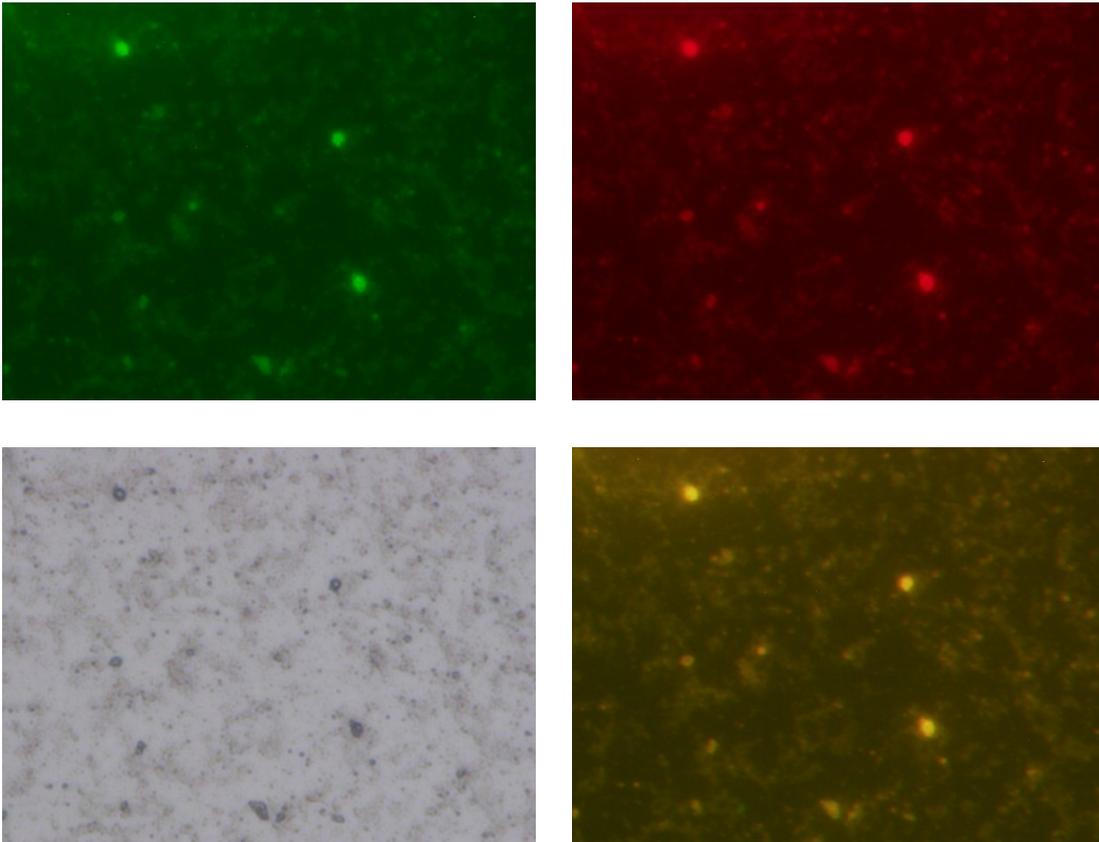


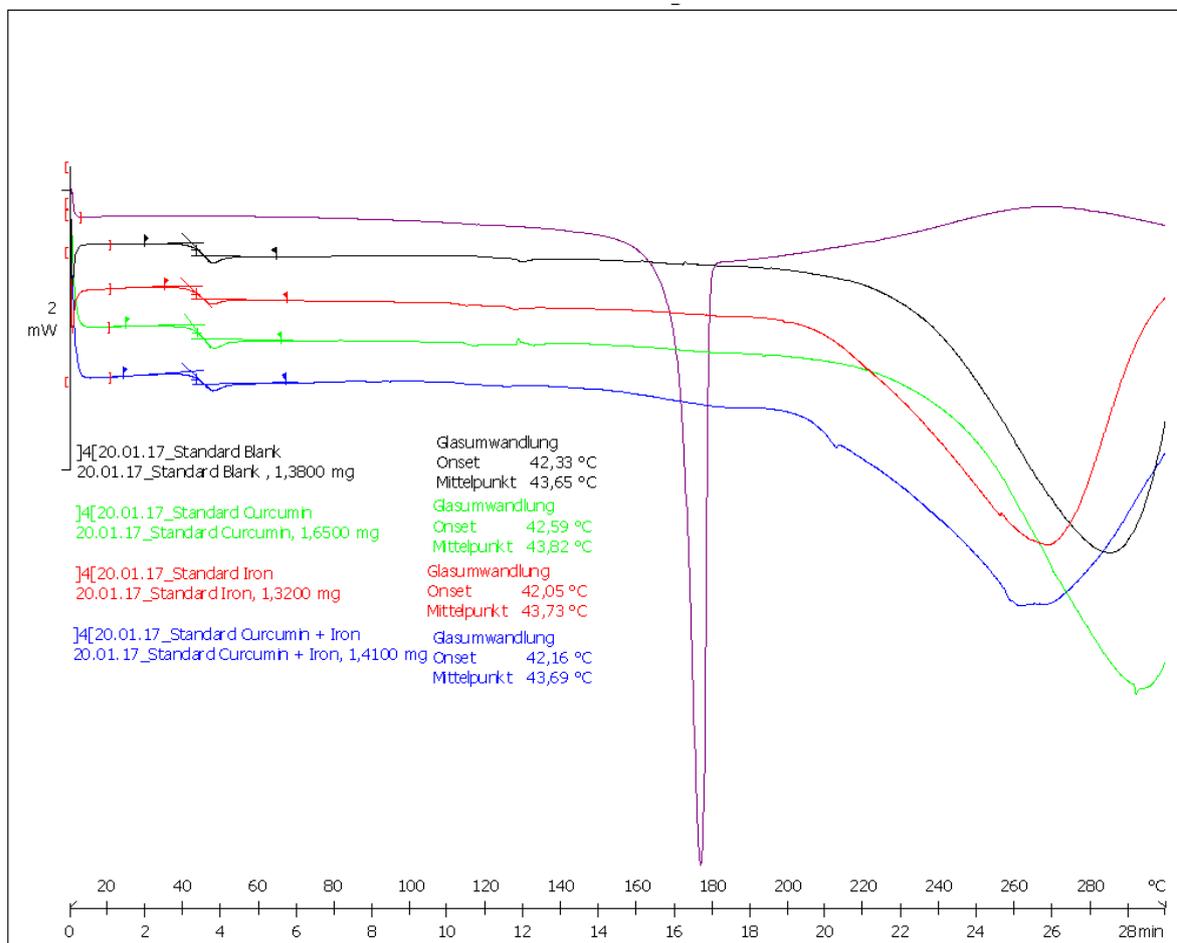
Abbildung 35 Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin B-gelabelten PLGA-Partikeln beladen mit Curcumin und SPIONs und hergestellt in einer 1% PVA-Lösung.

A.) Licht mit einer Wellenlänge von $470 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ wurde genutzt und die Emission wurde gefiltert bei einer Wellenlänge von $535 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$ B.) Licht mit einer Wellenlänge von $560 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ wurde genutzt wobei die Emission bei einer Wellenlänge von $630 \text{ nm} \pm 60 \text{ nm}$ gefiltert wurde C.) Normale mikroskopische Aufnahme ohne Filter und mit Licht aller Wellenlängen. D.) Digitale Überlagerung der Aufnahmen A.) und B.) zu jeweils 50 %.

4.2.5 DYNAMISCHE DIFFERENZKALORIMETRIE (DSC) .42.5

4.2.5.1 PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 2 % PVA LÖSUNG (STANDARD)

Die Differentialkalorimetrie wurde verwendet, um den Einfluss der Beladung auf die Glasübergangstemperatur zu ermitteln. Erwartungsgemäß entstehen Unterschiede bei den einzelnen Messungen, diese sind aber nicht bei der Glasübergangstemperatur zu beobachten. Erst bei der Zersetzung des Polymers hat das Eisen einen Einfluss auf das Verhalten des Gemisches bei Temperaturen deutlich über 200 °C.



AK Biopharmazie+ Pharmazeutische Technologie: METTLER STAR® SW 10.00

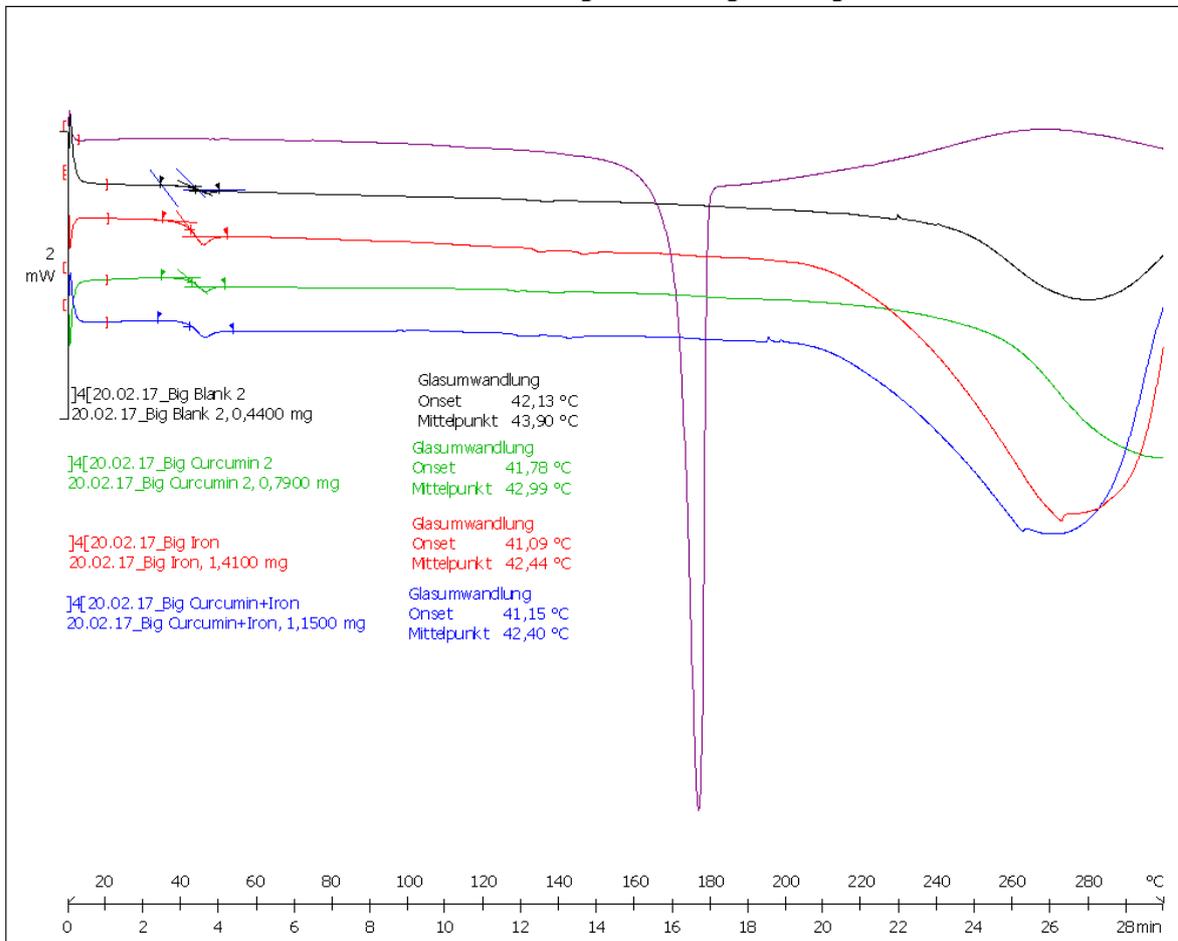
Abbildung 36 Differentialkalorimetrie der Proben „Standard“

Von reinem Curcumin (Lila Kurve) sowie von reinen PLGA Partikeln in der Größe „Standard“ (schwarze Kurve), Partikeln mit Curcumin (grüne Kurve), Partikeln mit SPIONS (rote Kurve) und gemischt (blaue Kurve)

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Messungen aus der DSC dargestellt. Alle Glasübergangstemperaturen, ob mit oder ohne SPIONs bzw. Curcumin bewegen sich auf einem sehr ähnlichen Level. Die Glasübergangstemperatur von reinen PLGA-Partikeln liegt bei 42,33 °C, die anderen Partikelarten befinden sich ebenfalls bei knapp über 42 °C und zeigen somit ein sehr ähnliches Verhalten. Sie ähneln auch stark den Werten von PLGA Mikropartikeln aus der Literatur, die bei sachgemäßer Lagerung bei 41 °C liegen.¹²⁵ Die Zersetzungstemperatur jedoch setzt mit der SPION Beladung früher ein. Die Erklärung für dieses Phänomen könnte in der hohen Wärmekapazität und dem hohen Schmelzpunkt von Eisen liegen.¹²⁶ Bei den mit SPIONs beladenen Partikeln beginnt der Zersetzungsprozess ungefähr 20° früher und findet auch bei einer niedrigeren Temperatur seinen Höhepunkt. Curcumin mit einem Schmelzpunkt, der in der Literatur mit 176-178 °C beschrieben wird¹²⁷ und dies in den Messungen zeigte, wurde vergleichend demselben Versuchsaufbau unterzogen. Aber auch Curcumin (lila Kurve) und die damit erhöhte Masse im Partikel hatte keinen Einfluss auf die Glasübergangstemperatur.

4.2.5.2 PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 1 % PVA LÖSUNG (BIG)

Wie auch bei den vorhergehenden Versuchen änderte sich das Verhalten der Proben bei dieser Messung nicht durch die gestiegene Größe. (Abbildung 37) Die Eigenschaften beim Erhitzen bleiben weitestgehend gleich und der Einfluss auf die Glasübergangstemperatur ist sehr gering. Weder beim Einsatz von SPIONs noch bei Curcumin und auch nicht bei einer Kombination beider Stoffe. Eine leichte Verringerung der Glasübergangstemperatur von ungefähr einem Grad lässt sich feststellen, aber diese scheint bei Curcumin und SPIONs gleichermaßen vorhanden zu sein und kann somit nicht mit den Eigenschaften der Beladung in Verbindung gebracht werden.



AK Biopharmazie+ Pharmazeutische Technologie: METTLER STAR^e SW 10.00

Abbildung 37 Differentialkalorimetrie der Proben „Big“

Von reinem Curcumin (Lila Kurve) sowie von reinen PLGA Partikeln in der Größe „Big“ (schwarze Kurve), Partikeln mit Curcumin (grüne Kurve), Partikeln mit SPIONs (rote Kurve) und mit beidem (blaue Kurve)

4.3 MAGNETSYSTEM UND FREISETZUNGSVERSUCHE

4.3.1 DAS NIEDERFREQUENTE IMPULSMAGNETSYSTEM

Für die Freisetzungsversuche mit dem Magnetischen System musste zuerst mit einem Oszilloskop eine Impulsgeschwindigkeit gefunden werden, die die höchste magnetische Kraft erzeugt. Wie in Kapitel 1.6 beschrieben, ist es dafür wichtig, die Frequenz zu finden, in der das magnetische System in Resonanz schwingt. Dieser Theorie folgend ist dieser Zustand erreicht, wenn die Kondensatoren durch die Impulse wieder voll aufgeladen werden, bevor ihnen Zeit bleibt, die Spannung schlagartig zu entladen.

In Abbildung 38 A.) sieht man den Verlauf der Spannung bei einer Frequenz von 50 Herz. Steuert man das magnetische System zunächst mit einem kurzen Signal von 0,5 Millisekunden an, was einer viertel Amplitude entspricht, kann man es anschließend bei gewünschter Dauer in einem Zustand mit höherer Spannung ausklingen lassen und umgekehrt. In diesem Fall wurde eine Zeit von 40 Millisekunden für einen vollständigen Impuls ausgewählt. Man sieht deutlich, wie die Eigenfrequenz des Schwingkreises als kleinere Ausschläge auf dem Plateau sichtbar ist. Obwohl ein Wechsel der Grundspannung erfolgt, pendelt der Stromkreis trotzdem in kleineren Amplituden auf dem jeweiligen Niveau. Diese kleinen Amplituden entsprechen der Resonanzfrequenz und wenn diese getroffen wird, entlädt sich der Kondensator immer vollständig. Die Unterschiede in der Helligkeit des angezeigten Signals entstehen durch den Unterschied in der Bildrate zwischen der Kamera und des Oszillators.

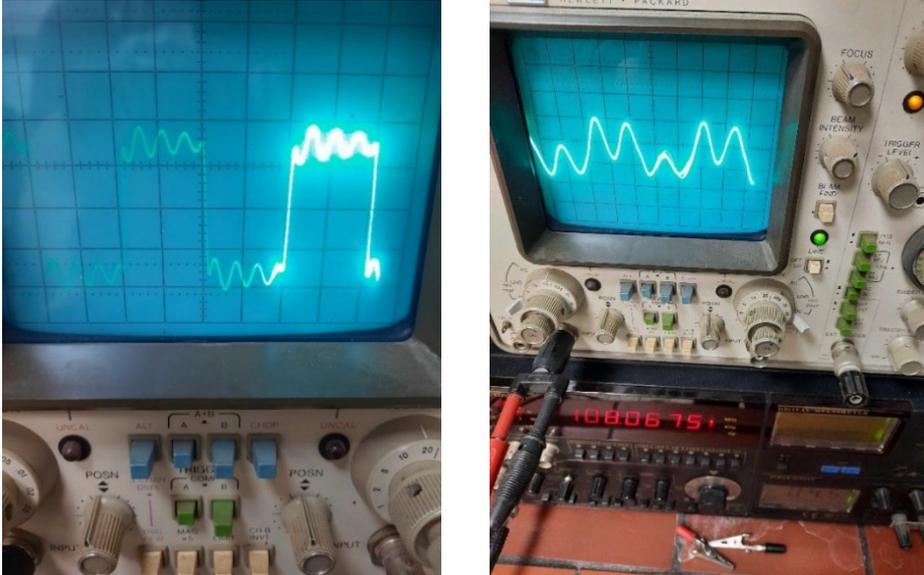


Abbildung 38 Der Oszillator angeschlossen an das magnetische Impulssystem

Bei einer Frequenz von A.) 50 Hz mit einem kurzen Vorimpuls über einen programmierten Arduino. B.) bei einer Frequenz von 108 Hz mit einem Impulsgenerator. Die Eigenfrequenz des Schwingkreises kann in Abbildung A deutlich auf dem oberen Plateau erkannt werden. Ebenso beim Ausschwingen folgend auf höchsten Ausschlag zu Beginn des Impulses.

Wird das Impulssystem bei einer zu niedrigen Frequenz mit einem einfachen Rechtecksignal z. B. durch den Impulsgenerator angesteuert, entstehen Unregelmäßigkeiten im Signal, da die Kondensatoren nicht vollständig geladen werden und sie noch Zeit zum nachträglichen Ausschwingen haben. So entstehen sichtbare Spannungsunterschiede wie in Abbildung 38 B.).

Wird die Frequenz erhöht, entstehen zuerst einzelne Impulse wie Abbildung 39 A.). Die Kondensatoren werden noch nicht vollständig geladen und es gibt Kapazitäten, um die Spannung zu erhöhen. Doch an diesem Punkt bleibt nicht genügend Zeit für ein anschließendes Ausschwingen. Die Signale sind noch schwach, haben aber eine gleichmäßige Form. Dies führt auch zu einem gleichmäßigen An- und Abstieg der magnetischen Feldstärke.

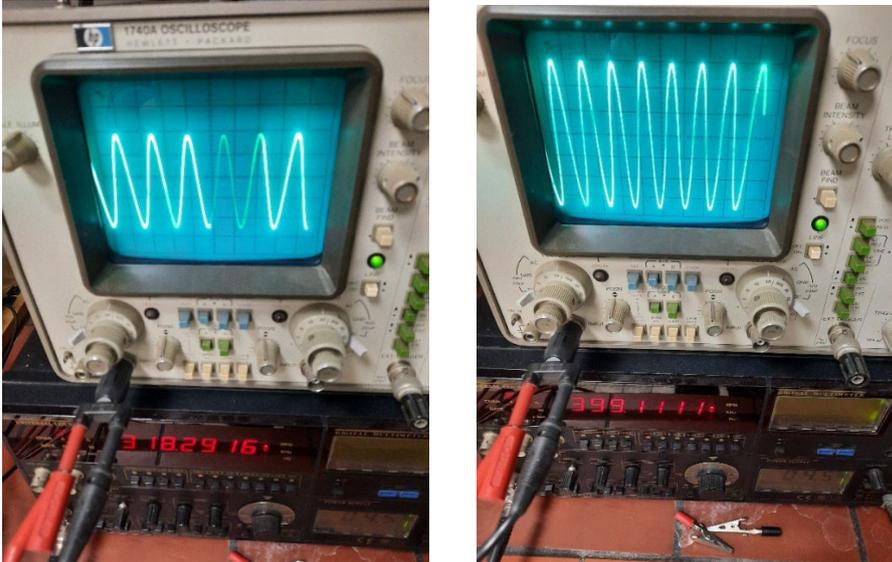


Abbildung 39 Der Oszillator angeschlossen an das magnetische Impulssystem

Bei einer Frequenz von A.) 318 Hz mit einem Impulsgenerator. B.) bei einer Frequenz von 399 Hz mit einem Impulsgenerator.

Nach weiterer Frequenzsteigerung kommt man bei diesem Schwingkreis immer näher an den Resonanzbereich des Schwingkreises und damit an den Höhepunkt der magnetischen Kraft, wie in Abbildung 39 B.) abgebildet. Hier zu sehen ist die optimale Anregung von Feld und Strom bei der Eigenfrequenz des Systems. Erhöht man dennoch weiter die Frequenz, entstehen zunächst Störungen (in unserem Fall bei 458 Hz) und anschließend bricht das Signal bei 480 Hz zusammen. Auch bei schnelleren Impulsen wird es nicht wieder stabil. Dies zeigt sich in Abbildung 40. Dort ist zu sehen, wie die Spannung beginnt, Interferenzen zu zeigen und anschließend auf ungefähr ein Fünftel zusammenbricht.

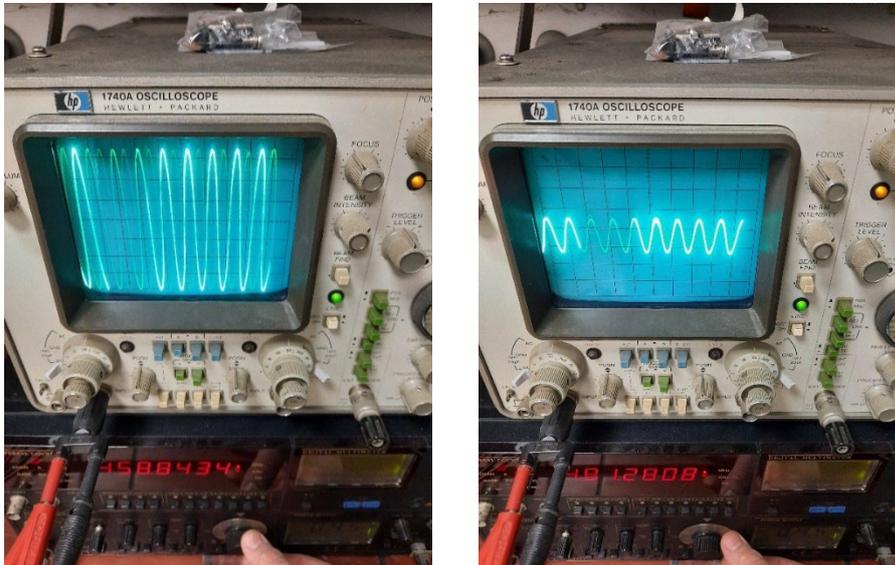


Abbildung 40 Der Oszillator angeschlossen an das magnetische Impulssystem

Bei einer Frequenz von A.) 458 Hz mit einem Impulsgenerator. B.) bei einer Frequenz von 481 Hz mit einem Impulsgenerator.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass mit einer Frequenz von 400 Hz gearbeitet werden sollte. Indem man das System nicht bei voller Leistung betrieb, wollte man unnötigen Stress und Störungen der elektrischen Bauteile vermeiden. Gleichzeitig wurde 400 Hz als ausreichend genug erachtet, um Spannungsspitzen von 130 V innerhalb von einer Millisekunde zu erreichen und damit der gewünschten Resonanz so nahe wie möglich zu kommen.

Die Induktivität der Spule wurde gemessen und zeigte einen Wert von $620 \mu\text{H}$ auf. Die Kapazität der Kondensatoren schlug mit $220 \mu\text{F}$ zu Buche. Diese Werte beschreiben die Induktivität der Spule und die Kapazität des Kondensators. Sie sind erforderlich, um die magnetische Stärke des Impulssystems und dessen Resonanzfrequenz zu bestimmen. Setzt man diese Werte in die Formel für die Resonanzfrequenz aus Kapitel 1.6 ein, entsteht folgend Gleichung:

$$w_0 = \frac{1}{2\pi\sqrt{L \cdot C}}$$

$$\frac{1}{2\pi\sqrt{0,00062H \cdot 0,00022F}} = 430,93Hz$$

Über die Berechnung mithilfe der in 1.6 angegebenen Gleichung kann die gemessene Resonanzfrequenz bestätigt werden, bei der die Spannungsspitzen bei über 400 Hz am höchsten waren und bei höherer Frequenz einen Zusammenbruch der Spannung bewirkten.

In Abbildung 39 B.) kann man die Spannungsänderung abhängig von der Zeit betrachten. Dabei entspricht der Abstand zwischen zwei vertikalen Linien einer Spannung von 20 V und ein Kästchen horizontal einem Wert von 2 Millisekunden. Man erkennt, dass sich die Spannung in einer 1 Millisekunde um 120 V ändert. Diese kann man in folgende Gleichung einsetzen:

$$I = \frac{\Delta Q}{\Delta t}$$

Sie besagt, dass die Änderung der Ladung pro Zeit gleich dem Strom beim Entladen des Kondensators ist⁹¹ Wobei die Ladung Q in einem Kondensator als Produkt der Kapazität C und der Spannung U definiert wird, wie in der nächsten Zeile dargestellt.

$$Q = C * U$$

Diesen Zusammenhang können wir verwenden und erhalten folgend Formel:

$$I = \frac{C * \Delta U}{\Delta t}$$

Da wir die Kapazität des Kondensators bereits kennen und die Änderung der Spannung pro Zeit gemessen haben, kann man diese Werte und die Kapazität des Kondensators zum Bestimmen der Stromstärke benutzen:

$$I = \frac{220\mu F \cdot 120V}{1ms} = 26,4A$$

Diese Rechnung zeigt, dass während einer Spannungssteigerung von 1 Millisekunde von 0 zu 120 V ein Strom von 26,4 A durch den Magneten fließt. Um weitere Berechnungen zu ermöglichen, musste die Permeabilitätszahl berechnet werden, um im letzten Schritt die magnetische Flussdichte zu bestimmen. Hierfür wird folgende Formel angewandt⁵²:

$$L = \frac{\mu_0 \cdot \mu_r \cdot N^2 \cdot A}{l}$$

Bei dieser Formel kann man die Induktivität bestimmen, indem wir die Permeabilitätszahl (μ_r) mit der magnetischen Feldkonstante (μ_0), dem Quadrat der Windungszahl (N) und der Querschnittsfläche des Magneten (A) multiplizieren und dieses Produkt teilen durch die Länge der Magnetspule (l). Lösen wir diese Formel nach μ_r auf, erhalten wir die folgende Gleichung und können für μ_r das Ergebnis von 140,6 berechnen.

$$\mu_r = \frac{L \cdot l}{\mu_0 \cdot A \cdot N^2} = \frac{0,00062H \cdot 0,25m}{4\pi \times 10^{-7} \frac{Vs}{Am} \cdot 0,00029m^2 \cdot 55^2} = 140,60$$

Das Produkt ist die Permeabilitätszahl und somit dimensionslos. Das Magnetfeld wird also um den Faktor 140 durch den inneren Eisenkern verstärkt. Es ist anzumerken, dass diese Zahl ohne den Luftspalt deutlich höher wäre und dieser durch die gemessenen Werte in die Berechnung mit einfließt. Nun können wir diesen Wert für die Bestimmung der magnetischen Flussdichte verwenden.⁹¹ Wie in Kapitel 1.6 erklärt, wird die magnetische Feldstärke über die Stromstärke, die Windungszahl, die Permeabilitätszahl, die magnetische Feldkonstante und die Länge des Magneten definiert. Dadurch ergibt sich folgende magnetische Flussdichte in Tesla [T].

$$B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot H = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \frac{I \cdot N}{l} = 4\pi \times 10^{-7} \frac{Vs}{Am} \cdot 140,6 \cdot \frac{26,4A \cdot 55}{0,25m} = 1,026 T$$

Diese Berechnung macht deutlich, dass in Resonanz eine magnetische Flussdichte von 1,026 Tesla entsteht. Dieser Wert bezieht sich auf die höchste magnetische Flussdichte und wird am unteren Ende des inhomogenen Magnetfeldes höher sein als am oberen Ende, an dem die Schenkel des Magneten weiter voneinander entfernt sind.

4.3.2 FREISETZUNGSVERSUCHE IM MAGNETISCHEN IMPULSSYSTEM

Die Versuche für die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln wurden den oberen Berechnungen und Beobachtungen zufolge mit einem Impulsgenerator der Stärke von ungefähr einem Tesla durchgeführt. Die Partikel wurden wie beschrieben in 2 Gruppen aus derselben Stammsuspension aufgeteilt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu haben. Jedoch erzielte keiner der Versuche, wie ausführlich in Kapitel 4.3.2.1 dargestellt, den gewünschten Erfolg. Keiner der durchgeführten Ansätze zeigte eine Steigerung der Freisetzung von Curcumin in das umliegende Medium. Die Ergebnisse werden in diesem Kapitel vorgestellt.

4.3.2.1 PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 2 % PVA LÖSUNG (STANDARD)

Im ersten Versuch wurden die Partikel mit einer Natriumlaurylsulfat Lösung versetzt und ohne weitere Zusätze oder mechanische Hilfen vermessen. Eine graphische Darstellung erfolgt in Abbildung 41. Die Freisetzung aus den Blindproben wurde zur besseren Veranschaulichung immer als 100 % dargestellt und die Proben im Magneten dazu in Relation gesetzt. Die Freisetzung in den verschiedenen Medien und mit der mechanischen Zusatzbelastung variierte stark. Es ist sehr deutlich zu sehen, dass die magnetischen Impulse keinen Effekt auf die Freisetzung haben. Es ist keine Freisetzungsteigerung zu erkennen. Der Unterschied zwischen beiden Proben betrug 0,19 Prozent, wobei das Signal ohne magnetische Impulse höher war. Das durchschnittliche Fluoreszenzsignal lag in diesem Fall bei 4442,7 mit Magneten und bei 4451 ohne den Magneten.

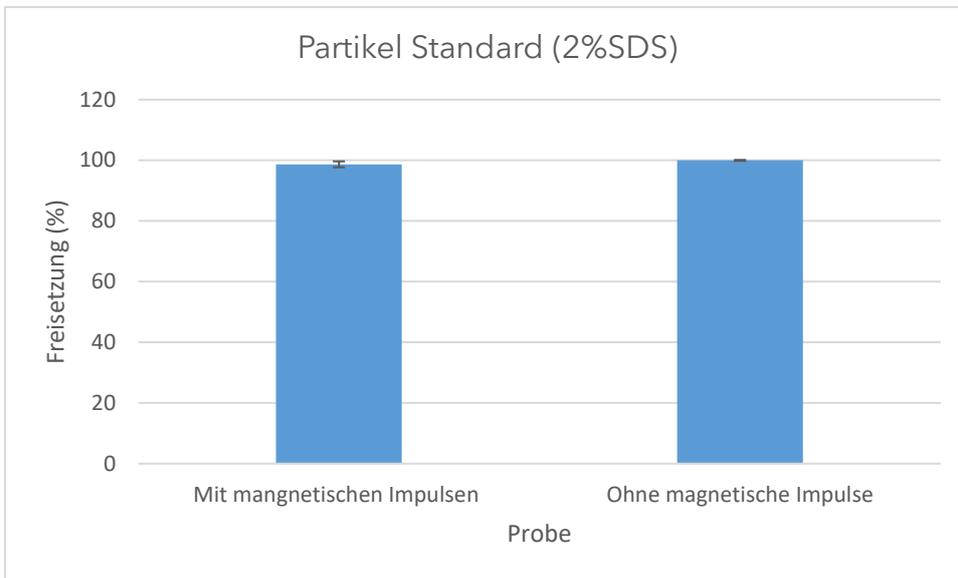


Abbildung 41 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat in Wasser.

Ein ähnliches Bild bot sich ebenfalls beim zusätzlichen Einsatz von Hydroxyethylcellulose. (Abbildung 42) Die Freisetzung war im Magnet zwar 5 % höher, aber die Standardabweichung selbst war bei beiden Gruppen bei ungefähr 6 %. (Mit Magnet 6,2 %, Ohne 5,8 Prozent). Das Fluoreszenzsignal hatte einen Wert von 3428,3 mit Magneten und 3273,7 ohne den Magneten. Es liegen somit nicht signifikante Unterschiede vor.

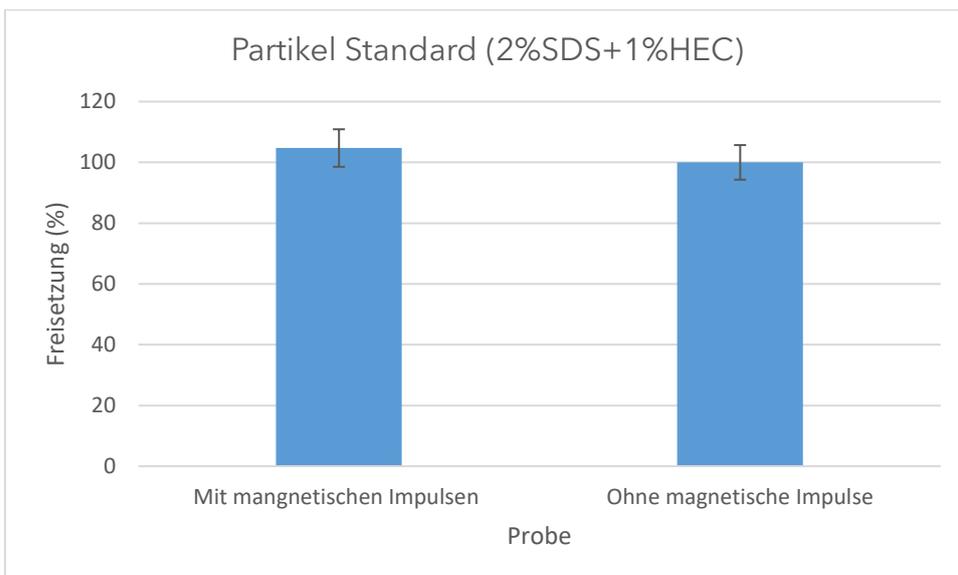


Abbildung 42 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat und 1 % Hydroxyethylcellulose in Wasser.

Ebenfalls zeigten die Daten der zusätzlich in Drehung befindlichen Proben, keine nennenswerten Unterschiede (Abbildung 43). Außer einer nicht signifikanten aber leicht erhöhten Freisetzung bei den Proben im Magneten von 4,5 %, zeigten sich Standardabweichungen mit 2,8 % beim Magneten und ebenfalls 2,8 ohne den Magneten. Bei diesem Versuch konnten Fluoreszenzen von 3085,7 mit Magnet und 2953 ohne den Magneten gemessen werden.

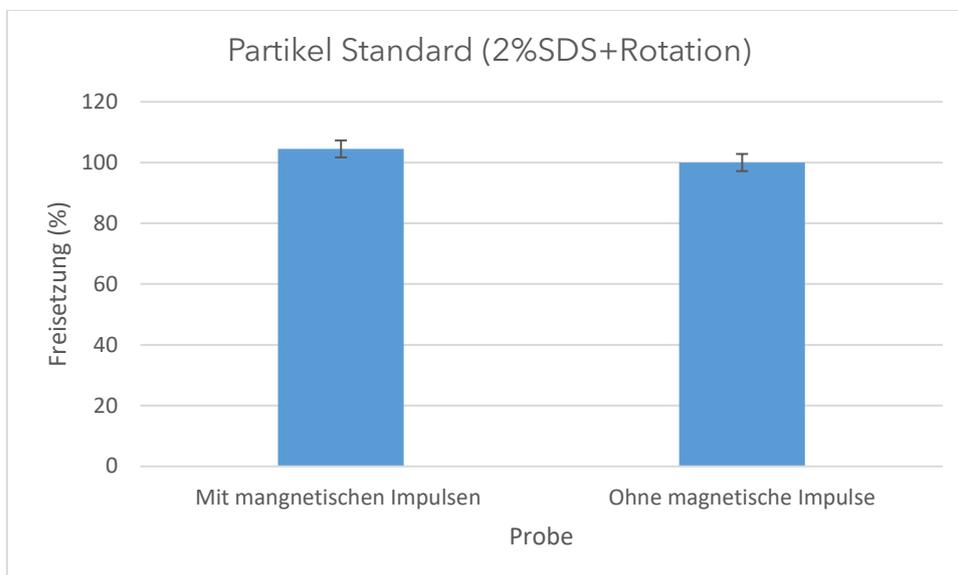


Abbildung 43 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat in Wasser. Die Partikel wurden zusätzlich über dem Magneten gedreht.

4.3.2.2 PARTIKEL HERGESTELLT MIT EINER 1 % PVA LÖSUNG (BIG)

Die Daten der Versuche mit größeren Partikeln brachten trotz höheren Volumens und höherer Eisenbeladung keine Vorteile gegenüber den kleineren Partikeln. Die größeren Partikel wurden auf die gleiche Weise behandelt und die gleichen Zusätze wurden benutzt, um die Freisetzung zu begünstigen. Abbildung 44 zeigt den Vergleich mit und ohne den Magneten bei einer Lösung aus Natriumlaurylsulfat. Auch hier konnte eine 5,8 % höhere Freisetzung beobachtet und eine Standardabweichung von 4,7 % mit Magneten und 4,4% ohne den Magneten gemessen werden. Die absoluten Werte betragen in diesem Fall 1149,7 mit Magneten und 1086,7 ohne.

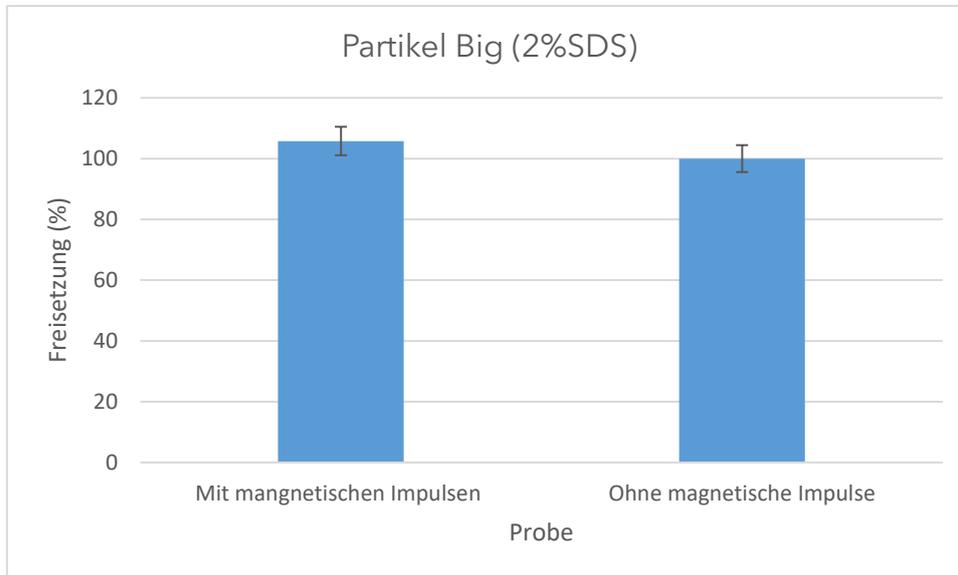


Abbildung 44 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat in Wasser.

Auch eine Viskositätserhöhung änderte nichts an dem Freisetzungverhalten. (Abbildung 45) Zwar war die Freisetzung mit 110,9 % im Vergleich zur Blindprobe deutlich höher, aber dafür sanken auch die absoluten Werte der Fluoreszenz auf 513 im Magneten und 462,7 ohne den Magneten ab. Es waren somit die geringsten Werte, die gemessen wurden. Die Standardabweichung unterschied sich in diesem Fall vergleichend am stärksten mit 6,1 % beim Magneten und 1,8 % ohne den Magneten.

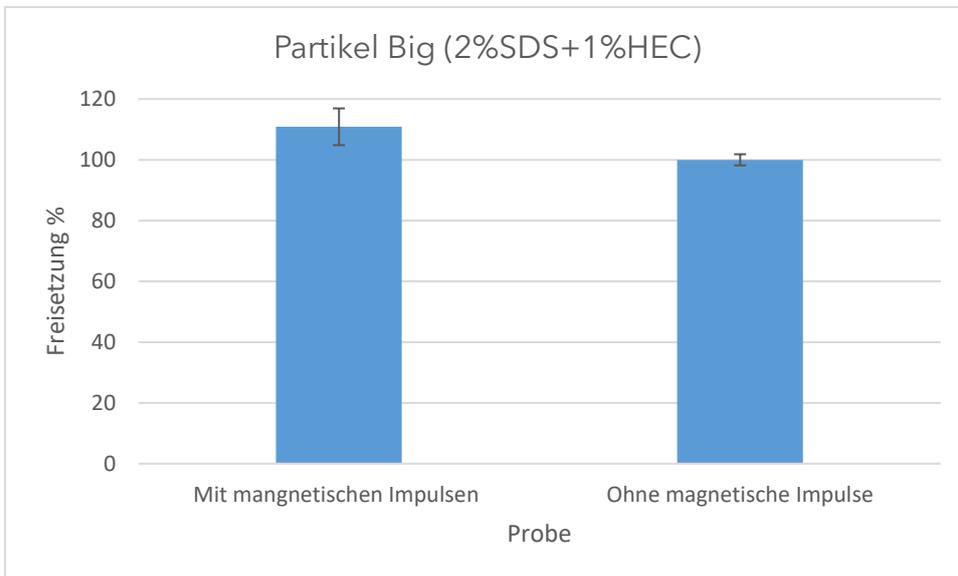


Abbildung 45 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat und 1 % Hydroxyethylcellulose in Wasser.

Eine zusätzliche Rotation um die eigene Achse bewirkte auch keinen größeren Effekt auf die Partikel. (Abbildung 46) In diesem Fall war zwar die Freisetzung um 8,3 % erhöht, aber auch hier waren die Gesamtwerte mit 1079,7 mit Magneten und 996,7 ohne Magnet sehr gering. Die Standardabweichung betrug mit Magneten 0,49% und ohne 4,19%.

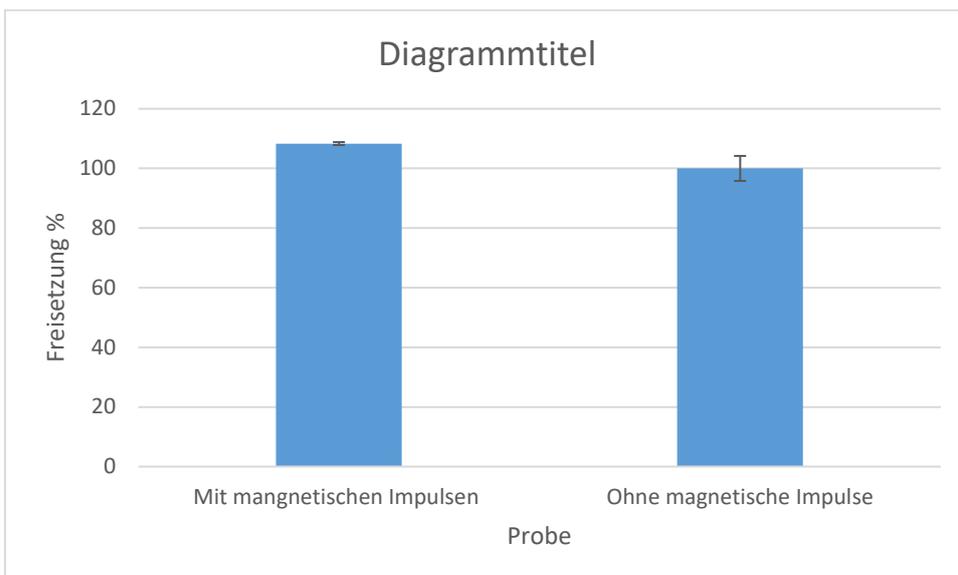


Abbildung 46 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat in Wasser. Die Partikel wurden zusätzlich über dem Magneten gedreht.

Da es, abgesehen vom ersten Freisetzungsversuch, einen Trend zu einer höheren Freisetzung mit dem Magneten gab, der aber unabhängig von der Konsistenz des Mediums oder der mechanischen Belastung des Systems auftrat, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. (Abbildung 47) Die Proben wurden in einer Lösung aus Natriumlaurylsulfat und Hydroxyethylcellulose suspendiert und in ein 30 °C warmes Wasserbad gelegt. Dieser Versuch wurde durchgeführt, da der Magnet eine große Menge an Wärme produzierte und über einen Lüfter gekühlt werden musste. Die Fluoreszenz des Mediums wurde anschließend gemessen. Die Freisetzung aus den Partikeln, die im Wasserbad erwärmt wurden, ist mit 113,1 % im Vergleich zur Blindprobe die Höchste.

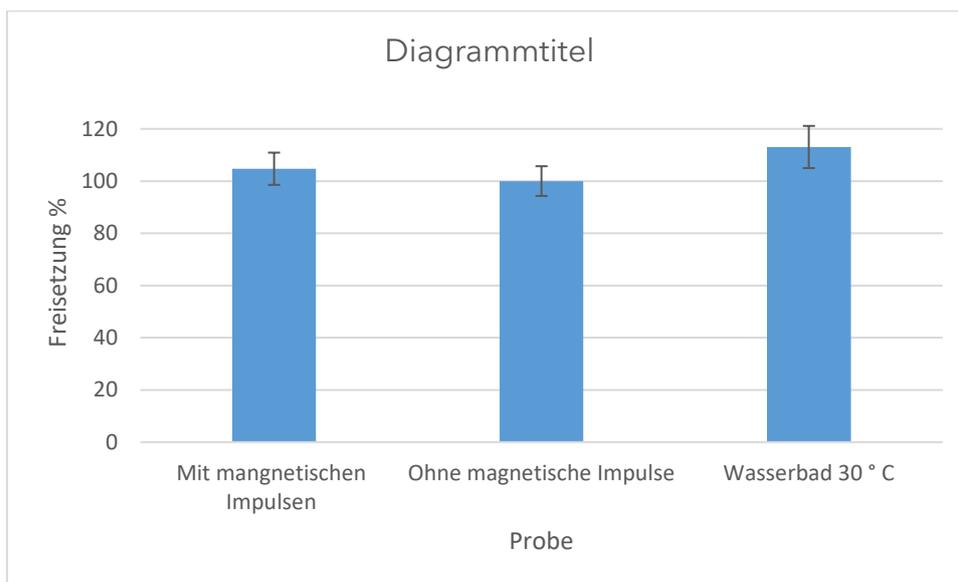


Abbildung 47 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat und 1 % Hydroxyethylcellulose in Wasser.

5 DISKUSSION DER FREISETZUNGSVERSUCHE MIT EINEM NIEDERFREQUENTEN MAGNETISCHEN IMPULSSYSTEM

Die superparamagnetischen Eisenoxidpartikel weisen eine einheitliche Größe und eine gute Verteilung auf. Bei höherer Auflösung lassen sich die kristallinen Strukturen erkennen, die auch in der ursprünglichen Veröffentlichung zur Synthese gezeigt wurden.⁸⁷ Ebenso wurden die superparamagnetischen Eigenschaften der SPIONs bewiesen. Die deutliche Magnetisierbarkeit, die allein durch das magnetische Feld und ohne Hysterese entsteht, zeigt, dass die Partikelsynthese erfolgreich war und das Produkt die gewünschten Eigenschaften aufweist.

In der dynamischen Lichtstreuung lassen sich die ersten Unterschiede bei den PLGA-Partikeln feststellen. Curcumin hat auf die Verteilung der Partikelgrößen einen positiven Einfluss und verbessert nicht nur sichtlich den PDI, sondern auch die Durchschnittsgrößen werden kleiner. Das bedeutet, dass Curcumin einen positiven Einfluss auf die Normalverteilung zu haben scheint und bei der Herstellung wie beim Aushärten der Partikel die Emulsion stabilisiert. Als mögliche Ursache für diese stabilisierende Funktion ist das Anlagern des hydrophoben Curcumins an der Oberflächeninnenseite der Partikel beim Aushärten denkbar. Da es sich wie durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegt, um Vollpartikel ohne Hohlraum handelt, könnte das Curcumin im Inneren einen stabilisierenden Kern bilden. Eisen hingegen verschlechtert diese Eigenschaften. Die Verteilung wird inhomogener und die Durchschnittsgrößen steigen bei beiden Partikelarten (Standard vs. BIG). Nichtsdestotrotz befinden sich alle Partikel in einem vergleichbaren Größenbereich, während der PDI mit unter 0,1 oder nur knapp darüber ein gutes Ergebnis darstellt und als hoch monodispers gilt.¹²⁸ Bemerkenswert bei dieser Methode ist auch, dass obwohl die Signalintensität mit der DLS gemessen wurde, die Verteilungen bei den größeren Partikeln gleichmäßiger ist. Es war zu erwarten, dass eigentlich große Partikel einen stärkeren Einfluss auf das Signal haben sollten. Aber auch hier sind die Unterschiede kaum bis nicht signifikant ausgeprägt, sodass die gezeigten Daten der DLS als gutes Ergebnis und als erfolgreiche Herstellung interpretiert werden können.

Die vorgestellten TEM-Bilder zeigen, dass es sich bei den magnetischen PLGA-Partikeln, um vorwiegend sphärische Strukturen handelt. Die SPIONs sind deutlich auf der Oberfläche zu erkennen und scheinen kleine Agglomerate außerhalb des PLGAs zu bilden. Mit diesen Aufnahmen ist die Affinität von Eisenoxid zur Oberfläche der PLGA-Sphären bewiesen. Hierbei spielt die Größe der Partikel keine Rolle. Man kann jedoch beobachten, wie die Menge an SPIONs größer wird, wenn das Volumen der Partikel ansteigt. Dies liegt an der Verteilung der gleichen Menge Eisen auf eine geringere Anzahl von Partikeln, die aber ein größeres Volumen besitzen. Die Methode hat eindeutig zeigen können, dass sich die gewählte Herstellungsmethode sehr gut für den Einsatz von mit Ölsäure ummantelten Eisenpartikeln eignet.

Die Bilder der Rasterelektronenmikroskopie hingegen zeigen ein recht diverses Bild. Obwohl Curcumin auf die Größe im DLS einen positiven Einfluss hat, sind die Unterschiede in der Form und der Oberfläche hier deutlich sichtbar. Bei beiden Größen lassen sich die gleichen Beobachtungen machen. PLGA ohne Beladung bildet die unauffälligsten Partikel. Zwar ist ihre Größenverteilung auf den ersten Blick etwas schlechter, aber ihre Oberfläche zeigt bei keinem System Auffälligkeiten. Durch Curcumin hingegen entsteht eine Art Faltenbildung. Es könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass es im Inneren der Partikel einen festen Kern bildet, der Einfluss auf die Oberflächenbeschaffenheit hat. Durch den hydrophoben Charakter von Curcumin wäre dies durchaus denkbar. Besonders bei der größeren Partikelvariante lässt sich dies beobachten. Bei Eisen hingegen zeigt sich die Ablagerung der Partikel an der Oberfläche sehr deutlich. Ob es sich hierbei um einige wenige oder die Mehrheit der SPIONs handelt, müsste wie bei Curcumin mit weiteren Versuchen belegt werden. Im Allgemeinen bilden sich durch das Verwenden von Eisen auf den Partikeln deutlich stärker Unregelmäßigkeiten ab. Diese Beobachtung deckt sich stark mit den Daten aus der dynamischen Lichtstreuung und den Beobachtungen aus der Transmissionselektronenmikroskopie. Curcumin hingegen bildet nach dem Trocknen außerhalb von PLGA keine Kristalle oder amorphe Strukturen aus. Abgesehen von einigen Unregelmäßigkeiten in der Form oder an der Oberfläche sind auch hier runde Partikel bei allen Herstellungsvarianten zu sehen. Die Bilder beweisen eine

standardisierte und wiederholbare Herstellung mit befriedigendem Ergebnis und einem nachweislichen Einschluss der Ladung in den Partikeln.

Die Fluoreszenzmikroskopie diente dem Nachweis des Einschlusses von Curcumin und konnte belegen, dass sich das Curcumin fast vollständig in den Partikeln befindet. Die Bilder mit den überlagerten Floreszenzen beweisen, dass Curcumin im Inneren der Partikel zu finden ist. Indem PLGA durch das fluoreszierende Rhodamin B markiert wurde, konnte das Polymer eindeutig mit Curcumin co-lokalisiert werden. Diese Versuche demonstrieren, dass Curcumin keine Bestrebungen besitzt, sich außerhalb der Partikel anzureichern.

Die Abbildungen der DSC können eine weitere Fragestellung klären. Sie dienen dazu, den Einfluss von Curcumin und Eisen auf die Glasübergangstemperatur zu ermitteln. Die Möglichkeit, dass die Beladung durch Curcumin oder durch SPIONs zu einer Veränderung dieser führen könnte, sollte ausgeschlossen werden. Im schlimmsten Fall hätten sie den Schmelzpunkt gesenkt und man hätte die Freisetzung durch die thermischen Veränderungen der Partikelwand nicht mehr vom reinen kinetischen Effekt unterscheiden können. Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass die Partikelarten sehr ähnliche Glasübergangstemperaturen aufweisen. Diese decken sich mit der Literatur und eine Absenkung der Glasübergangstemperatur konnte ausgeschlossen werden.¹²⁹ Die Beladung zeichnet sich erst bei der Zersetzungstemperatur deutlich ab und zeigt, dass sich das Eisenoxid erst bei hoher Temperatur bemerkbar macht. Beide Partikelgrößen beginnen mit Eisen deutlich früher mit der Zersetzung. Dies ist zwar ein weiteres Indiz für die gute Aufnahme von Eisen, hatte aber für die angestrebten Versuche keine Bedeutung. Ein Einfluss auf die Freisetzung im relevanten Temperaturbereich konnte hiermit ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst konnte mit diesen Methoden eine gelungene Herstellung von magnetischen PLGA-Partikeln mit und ohne den Einschluss von Curcumin gezeigt werden. Die Beladung, die Form, die Größe und die Größenverteilung entsprechen den Anforderungen für den Einsatz in einem Magnetimpulssystem.

Das Magnetsystem zeigte ebenfalls eine sehr gute Eignung für die Versuche. Die Messungen mit dem Oszilloskop konnten zeigen, dass der angestrebte Frequenzbereich mit unter 1000 Hz bei voller Stärke in Resonanz schwang. Die magnetische Stärke des Systems war ebenfalls auf sehr hohem Niveau und entsprach rechnerisch dem Wert eines Teslas. Somit war das Magnetfeld um das Zehnfache höher als z. B. die Systeme, die Nappini et al. für magnetische Liposomen mit einem ähnlichen Versuchsaufbau benutzt haben.¹³⁰

Offen bleibt die Frage wie es um die Verteilung der Ölsäure im magnetischen Partikel bestellt ist. Leider geben die Bilder der beladenen PLGA-Partikel keinen Aufschluss darüber, ob die Ölsäure, die zum Ummanteln der SPIONs verwendet wurde, nach dem Herstellprozess weiterhin als Hülle vorhanden ist. Es besteht ebenso die Möglichkeit, dass die Ölsäure sich in der Polymermatrix des PLGAs verteilt hat. SANS-Messungen könnten in diesem Zusammenhang wichtige Daten liefern, um diese Fragestellung zu klären.

Obwohl die PLGA-Partikel und auch das Magnetsystem gut für die Versuche geeignet waren, konnten keine großen Erfolge erzielt werden. Die schlechte Löslichkeit von Curcumin wird einen Teil zum Problem beitragen. Zum Beispiel wurde die Freisetzung von Curcumin aus PLGA in anderen Veröffentlichungen über 25 Tage gemessen. Trotz des Einsatzes von Tensiden musste ein hoher Zeitaufwand betrieben werden, um die Freisetzungskinetik darstellen zu können.¹³¹ Die reine Auflösungs geschwindigkeit könnte so niedrig sein, dass sogar, wenn der Magnet einen Effekt hat, dieser kaum ins Gewicht fällt. Die Kinetik der Curcumin Auflösung könnte in diesem Fall der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein. Die Option PLGA-Partikel mit hydrophilen Stoffen zu beladen, um dieses Problem zu umgehen, wurde in Betracht gezogen. Jedoch zeigen PLGA Partikel keinen guten Einschluss von solchen Stoffen. Während der Herstellung kommt es zu einem großen Verlust an Material, da die hydrophilen Bestandteile sich vor dem Aushärten im äußeren Medium verteilen.¹³² Außerdem stellt man sich in diesem Fall einem weiteren Problem und zwar, dass die initiale Freisetzung bei hydrophilen Wirkstoffen deutlich höher ist.¹³³ Die Zeit, die es benötigt, um das Lösemittel zu entfernen, würde höchstwahrscheinlich schon ausreichen, um einen

Großteil des Wirkstoffes vor Versuchsbeginn zu verlieren. Dies ist unter anderem der Grund, warum die Löslichkeit im äußeren Medium nicht erhöht werden darf und ist ein weiteres Problem des Systems.

Auch andere Einflüsse könnten der Grund für die mangelnde Freisetzung sein. Zum einen wäre hier die Eigenbewegung der Partikel zu nennen. Denn Nanopartikel bewegen sich im flüssigen Medium nach dem Prinzip der brownischen Molekularbewegung.¹³⁴ Durch die hohe Eigengeschwindigkeit der Nanopartikel könnte die kinetische Energie auf den Partikel seinen Einfluss verlieren. Ebenso könnte die Magnetisierung der Partikel durch das Eisen bei einem so geringen Volumen in einer Nanohülle nicht ausreichend sein. Der Effekt auf die Partikel könnte schlicht nicht zum Tragen kommen.

Eine weitere Möglichkeit, die zu einer mangelnden Freisetzung führen könnte, ist die zu geringe magnetische Suszeptibilität und damit verbunden auch eine zu geringe magnetische Permeabilität der SPIONs. Zwar haben andere Publikationen beruhend auf dem gleichen Prinzip eine ähnliche Magnetisierbarkeit im VSM zeigen können, jedoch beruhten ihre Formulierungen auf Lipiden und ihre SPIONs waren in der äußeren Hülle zwischen den einzelnen Lipidschichten eingeschlossen. Es ist denkbar, dass die magnetische Kraft des Magneten ausreichend war und das System eine höhere Kraft und damit auch eine gesteigerte Freisetzung mit besseren Eisenpartikeln hätte zeigen können. Im Versuch mit dem VSM kann man deutlich sehen, dass sobald eine magnetische Sättigung der Partikel eintritt, stärkere Magnetfelder die Magnetisierung der Partikel nicht mehr erhöhen können. Da somit die Partikel durch ihre eigene Magnetisierbarkeit beschränkt sind, hat ab einem bestimmten Punkt ein stärkeres äußeres Magnetfeld einen deutlich verringerten Effekt auf die Kraft, die zum Wirken kommt. Die magnetische Kraft nimmt mit einem stärkeren Magnetfeld nur noch proportional mit der Dipol Stärke und nicht mehr überproportional zu. Publikationen, die ebenfalls mit magnetischen Materialien gearbeitet haben wie z. B. Sanson, Diou et al.¹³⁵ verwendeten Maghemit- ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) Partikel. Jedoch konnte bei Ihnen schon auf den TEM-Bildern einen höheren Kontrast zwischen den einzelnen Partikeln gesehen werden. Sie wirken im Vergleich zueinander deutlich dunkler bzw. heller. Die Unterschiede in Ihrem

Kontrast entstehen dadurch, dass die Elektronen des Mikroskops im Magnetfeld abgelenkt werden, wie in Kapitel 3.5 anhand der magnetischen Blenden erklärt. Trifft ein Elektron auf einen Partikel, wird es mehr oder minder abgelenkt, je nach Polarisierung des Partikels. Dieser Effekt der unterschiedlichen Kontraste steigt mit einer höheren Suszeptibilität. Obwohl das von mir verwendete Magnetit eine bessere Magnetisierbarkeit hätte zeigen müssen, begründet durch die natürlichen Eigenschaften des Oxids selbst,¹³⁶ ist dies nicht eingetreten. Vielmehr scheint das Gegenteil der Fall zu sein. Die Ursache für diesen Umstand könnte an einer mangelnden Schutzatmosphäre aus Stickstoff bei der Synthese der Partikel liegen. Durch den Sauerstoffeinfluss auf das Material würden die SPIONs stärker oxidiert werden und wären folgend weniger magnetisierbar. Auch der Einsatz von zu viel Ölsäure, die in ihrer Funktion als hydrophober Mantel der Eisenpartikel die Gesamtmasse an magnetisierbarem Material verringert, muss in Betracht gezogen werden. Eine Kombination aus beidem wäre eine dritte Möglichkeit.

Allen voran scheint die unterschiedliche Lokalisation von Curcumin und Eisen ein Problem darzustellen. Es wurde angenommen, dass durch die schnelle Frequenz eine Zugkraft an der äußeren Hülle der Partikel entsteht, die ein Entweichen des Wirkstoffes vereinfacht. Da es sich um einen Vollpartikel ohne Hohlraum handelt, bei dem das Curcumin in Inneren eingeschlossen und das Eisen auf der Oberfläche angelagert ist. Jedoch konnte kein signifikanter Wirkstoffaustritt bewiesen werden, dementsprechend scheint diese Theorie falsch zu sein.

Betrachtet man die zuvor beschriebene langsame Freisetzung durch Curcumin, sollten folgende Punkte auch genauer beleuchtet werden. Zwar entstand eine um 5 - 8 Prozent erhöhte Freisetzung, aber von einem sehr geringen Wert. Die Freisetzungen von Curcumin aus PLGA-Partikeln wurden bereits mehrfach untersucht und mussten wie erwähnt über mehrere Tage gemessen werden.^{137,138} Deswegen ist davon auszugehen, dass ein Großteil des Curcumins in den Partikeln verblieben ist. Ebenfalls ist es möglich, dass die Sphären wie gewünscht beschädigt wurden, aber das hydrophobe Curcumin an der Oberfläche des ebenfalls hydrophoben PLGA haften blieb.

Des Weiteren variierte die Freisetzungserhöhung mehr mit der Größe der Partikel, blieb aber ungeachtet der äußeren Umstände gleich. Würde der reine kinetische Effekt des Magnetfeldes einen Einfluss auf die Freisetzung haben, müsste eine Viskositätserhöhung und die zentrifugale Gegenkraft auch Unterschiede in dieser bedeuten. Vielmehr scheint es wahrscheinlich, dass die geringe, immer gleichbleibende prozentuale Freisetzungserhöhung durch einen leichten Anstieg der Temperatur entstanden ist. Zwar wurden die Proben so gut wie möglich gekühlt, aber vollständige Abschirmung war durch den geringen Abstand von Probe zu Magneten nicht möglich. Ein größerer Abstand hätte eine starke Verminderung des Magnetfeldes bedeutet. Die Versuche mit dem Wasserbad zeigen deutlich, dass die Temperatur einen höheren Einfluss auf die Freisetzung hat. Leider ließ sich die Temperatur als möglicher Faktor nicht vollständig eliminieren. Hierfür hätte es eines Kühlsystems wie einer Wasserkühlung des Magneten benötigt, die bei diesen elektrischen Strömen nicht zur Verfügung stand.

Ausgehend von der Annahme, dass die Freisetzung durch den Magneten und nicht durch die Temperatur entstanden ist, müssen weitere Probleme in Betracht gezogen werden. Vlasova et al.⁹⁰ haben mit ihrem System eine Möglichkeit gefunden, eine Freisetzung von 80 % des gesamten Wirkstoffes innerhalb von 30 Minuten im niederfrequenten Magnetfeld zu erzielen. Außerdem konnten ihre magnetischen Liposomen die restliche Beladung an Farbstoff noch einen weiteren Tag ohne zusätzlichen Verlust halten. Im direkten Vergleich wäre das hier benutzte System viel ineffizienter und außerdem wäre eine Freisetzung über Zeit mit reinem PLGA nicht zu verhindern. Hinzu kommt, dass die Unterschiede in der Freisetzung in Bezug auf die schon vorhandene Curcuminmenge zu betrachten sind. Eine 5-prozentige Steigerung des passiven Austritts ist in Anbetracht des komplexen Aufbaus und der benötigten Energie nicht zu rechtfertigen. Das schon publizierte System hat trotz der Anfälligkeit von Liposomen im Organismus und dem schnellen Abbau¹³⁹ in allen anderen Belangen immense Vorteile. Der Versuch, die in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Vorteile von PLGA für ein solches System zu nutzen, hatte keinen Erfolg.

Fazit:

Für die weitere Forschung an der Freisetzung aus magnetischen Polymeren-Partikeln im niederfrequenten Magnetsystem sollte zunächst eine mangelnde magnetische Suszeptibilität der Partikel ausgeschlossen werden und unter Umständen andere Legierungen erprobt werden. Zudem könnte eine signifikante Freisetzung entstehen, indem man Curcumin und Eisen im Innern des Partikels zusammen einschließt. Durch die Verbesserung der inneren Struktur mit Wirkstoff (Curcumin) und Effektor (Eisenoxid) in der gleichen Domäne bzw. Phase könnte eine Freisetzung erzielt werden. Dies sollte bei weiteren Experimenten untersucht werden. Außerdem sollte durch SANS-Messungen der Verbleib der Ölsäure nach dem Herstellprozess abschließend geklärt werden. Auf der anderen Seite könnte an den Polymeren für den Einschluss geforscht werden. Für die Anwendung eines solchen Systems bedürfte es eines Polymers, das bioabbaubar wie PLGA ist. Es sollte eine hydrophile Beladung halten können, ohne diese über Poren abzugeben und spröde genug sein, damit die kinetische Energie aus den Magnetimpulsen Schäden in der Oberfläche bewirken kann. Zudem wären Mikropartikel durch ihren höheren Einschluss an magnetischem Material und einer deutlich langsameren Eigenbewegung eine weitere Möglichkeit, um die Effizienz eines solchen Systems zu steigern.

6 ERGEBNISSE HYDROXAMSÄUREN ALS KOMPLEXBILDNER IN POLYMERPARTIKELN

6.1 POLYMERCHARAKTERISIERUNG PMMA UND PMMA-HA

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird der zweite Teil der Dissertation behandelt und Polymerpartikel aus hydroxamsäurehaltigen Polymeren in Augenschein genommen.

Für die Polymercharakterisierung wurden die Molekulargewichte durch Größenausschlusschromatografie und die chemischen Eigenschaften über H-NMR, C-NMR und IR bestimmt. Eine detaillierte Beschreibung der Daten und der Auswertung der Messungen kann in Frau Dr. K■■■■ Dissertation eingesehen werden.¹⁴⁰ Es wurden 4 verschiedene Polymere für die Herstellung der Partikel benutzt, die zuvor im hiesigen Kapitel 3.3.2 Methoden und Materialien erläutert wurden. Die Eigenschaften der einzelnen Polymere sollen hier in aller Kürze vorgestellt werden.

PLGA wurde unter dem Handelsnamen Resomer 502 H bezogen. Bei Resomer 502 H handelt es sich um PLGA, welches zu 50% aus Lactid und zu anderen Hälfte aus dem Monomer Glycolid besteht. Die molare Masse der Polymere wird in einem Bereich von 7000 - 17 000 g/ mol angegeben.

PMMA wurde dankenswerterweise von Frau K■■■■ im Arbeitskreis■■■■ zu Polymeren mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 4910 g /mol synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Für P(MMA-co-MAHA) mit 5 und 10% HA-Anteil wurde ein durchschnittliches Molekulargewicht von 5280 und 4920 g/mol festgestellt. (Abbildung 49)

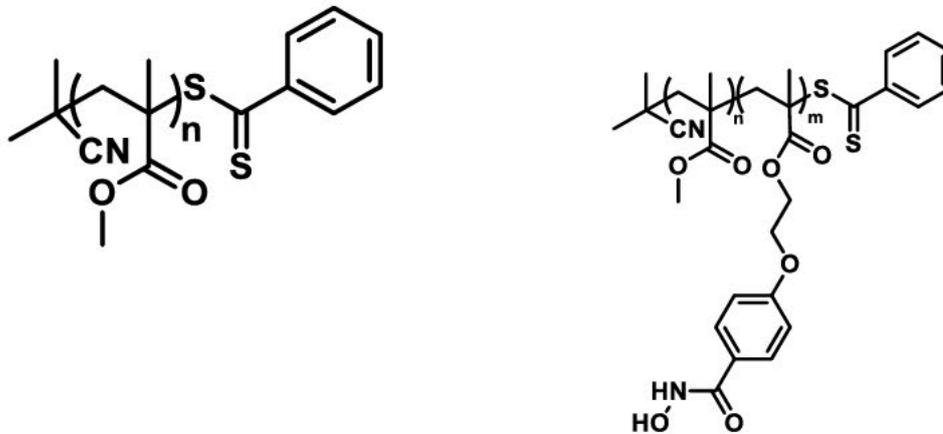


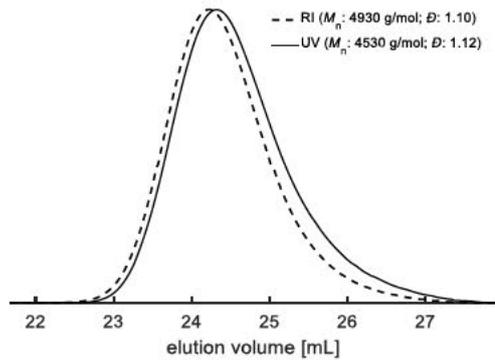
Abbildung 48 Links reines PMMA, wie es durch die Strukturanalyse bestätigt vorlag. Rechts Struktur von PMMAHA als modifiziertes Monomer.

Die beiden modifizierten Formen von PMMA besaßen beide Hydroxamsäuren als funktionelle Einheiten. Wobei eines mit 5% an modifizierten Monomeren synthetisiert wurde und eines mit 10%.

P(MMA)₄₉

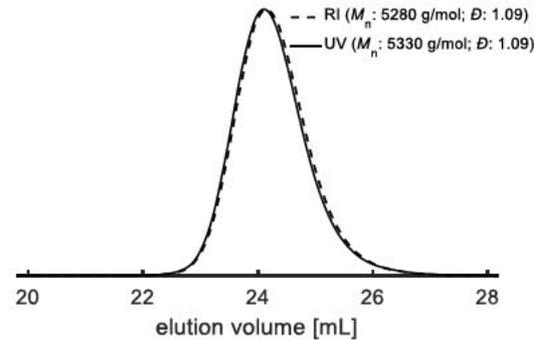
Probenbezeichnung: JK203

SEC: THF, PMMA calibration:

**P(MMA₄₅-co-MAHA₂)**

Probenbezeichnung: JK204E1D

mol%MAHA = 5%

**P(MMA₃₆-co-MAHA₄)**

Probenbezeichnung: JK201E1D

mol%MAHA = 10%

SEC: THF, PMMA calibration:

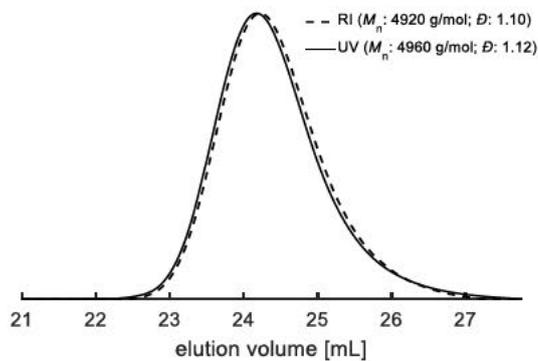


Abbildung 49. A.) Daten aus der Größenausschlusschromatographie für das Polymer 0 % HA. B.) Daten aus der Größenausschlusschromatographie für das Polymer 10 % HA. C.) Daten aus der Größenausschlusschromatographie für das Polymer 5 % HA.

6.2 GRÖßENBESTIMMUNG DURCH DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG

Die Partikel zeigen in der dynamischen Lichtstreuung ein ähnliches Größenprofil wie die zuvor beschriebenen PLGA-Partikel. (Tabelle 5) Die Durchmesser entsprechen den publizierten Werten aus der Literatur.¹⁰⁷ Jedoch ist die Größenverteilung schlechter als bei den vorherigen Versuchen aus Tabelle 3 und auch als die der ursprünglichen Quelle, welche als Vorlage für die Herstellung der PLGA-Partikel benutzt wurde. Trotzdem sind auch diese Werte auf die Durchmesser bezogen im anvisierten Bereich und die Verteilung immer noch in einem Rahmen, der allgemein als ausreichend für Nanomaterialien gilt.¹²⁸ Die verschiedenen Anteile an Hydroxamsäuren scheinen auf die Durchmesser der Partikel keinen Einfluss zu haben, aber die Größenverteilung wird mit höherem Anteil an MAHA diverser.

Tabelle 5 Die durchschnittlichen Partikeldurchmesser gemessen mit dynamischer Lichtstreuung der verschiedenen PMMA-Partikelarten. Angaben als hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersitätsindex.

PMMA Partikel	Durchmesser [nm]	PDI
0 % HA	211,6 ± 12,1	0,116 ± 0,055
5% HA	235,5 ± 5,2	0,137 ± 0,040
10% HA	209,8 ± 3,0	0,149 ± 0,032

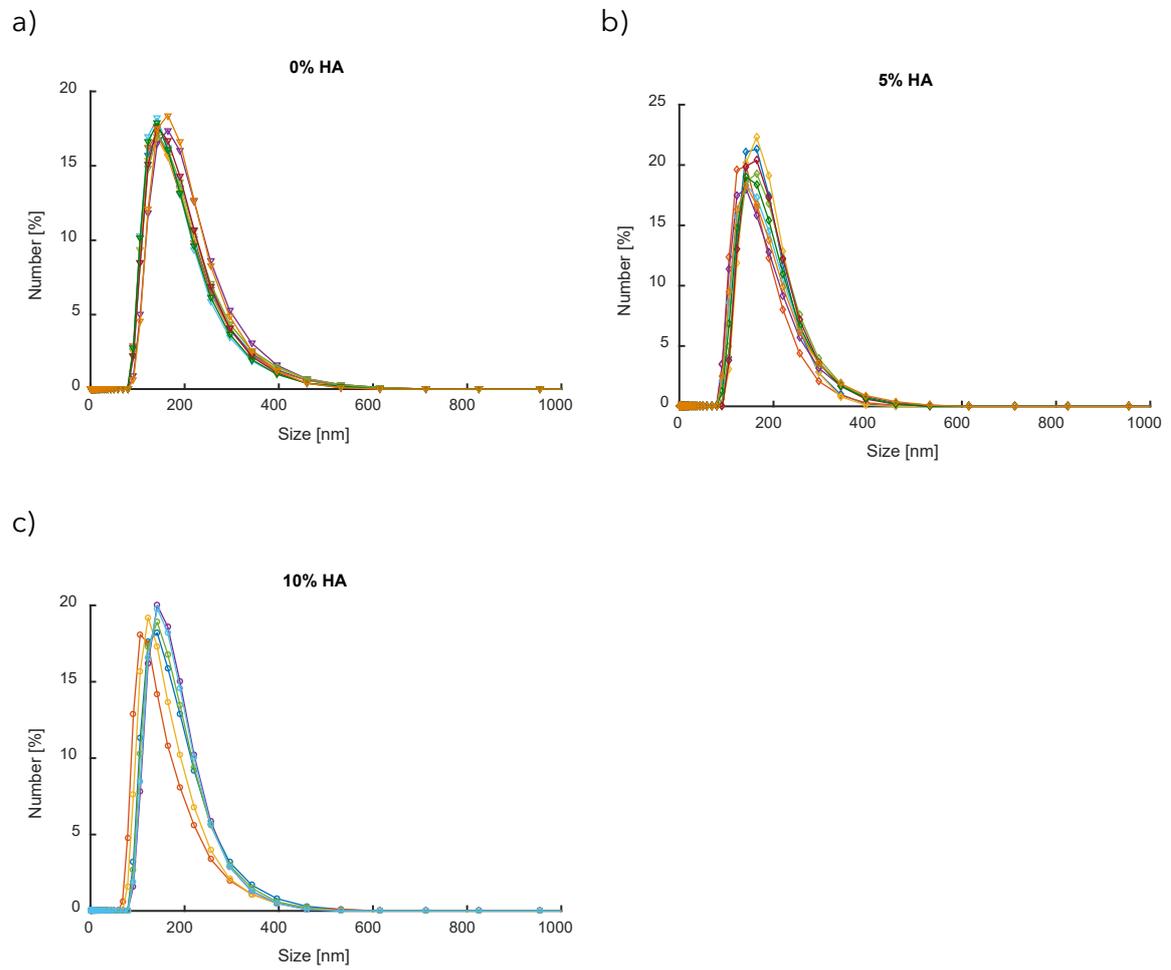


Abbildung 50 Größenverteilung der PMMA-Partikel. A) 0% HA (Hydroxamsäuremonomer) B) 5% HA C) 10% HA

6.3 RASTERELEKTRONENMISKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON PMMA- UND P(MMA-CO-MAHA)-PARTIKELN

Abbildung 51 zeigt die SEM Aufnahme der Partikel, die mit reinem PMMA hergestellt wurden. Die Form der Partikel zeigt runde Nanopartikel, die eine sehr gleichmäßige Form haben und keinerlei äußere Auffälligkeiten aufweisen, wie beispielsweise Faltenbildung oder ein oberflächliches zusammenschmelzen. Die Partikel zeigen sogar eine deutlich stabilere und ebenere Oberfläche im Vergleich zu den PLGA-Partikeln in Kapitel 4.2.3.1. In Anbetracht der Ergebnisse aus Kapitel 4.2.3 ist dies hervorzuheben, da dort mit dem Einschluss der SPIONS die Form der Partikel deutlich von den anderen Varianten abweicht. Dieser Effekt ist auf den Aufnahmen trotz eines Massenverhältnisses Eisen zu Polymer von 1 zu 10 nicht erkennbar. Das Verhältnis bei den zuvor angesprochenen PLGA-Partikeln lag hingegen bei 1 zu 25. Während die Aufnahmen gemacht wurde, konnte auch eine deutlich höhere Strahlentoleranz aller PMMA-Partikelarten gegenüber den PLGA-Partikeln beobachten werden. Dies zeigt sich wie angesprochen auch darin, dass bei den Aufnahmen kaum Unregelmäßigkeiten durch Schmelzprozesse zu sehen sind.

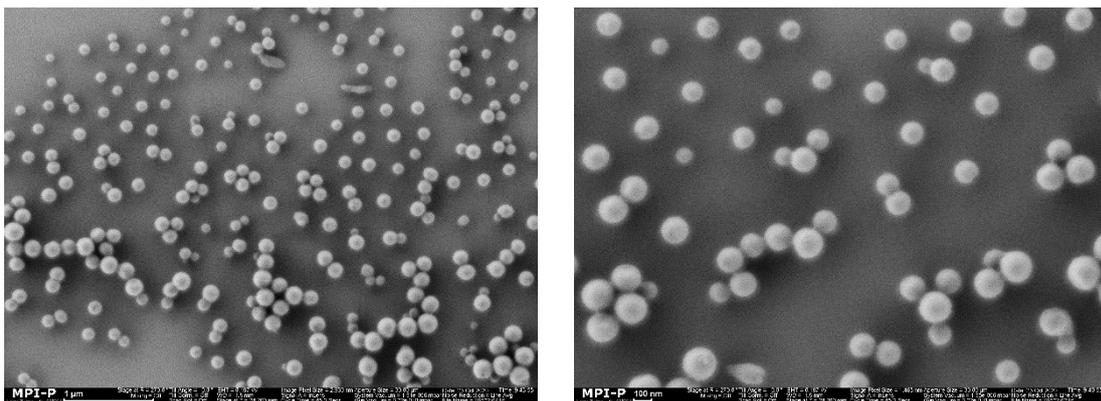


Abbildung 51 Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop von Nanopartikeln, hergestellt aus reinem PMMA A) mit einer Skalierung von 1 µm B) mit einer Skalierung von 100 nm.

Auch die Partikel mit 5 % Hydroxamsäureanteil (Abbildung 52) haben trotz hoher Eisenbeladung keine besonderen Oberflächenstrukturen entwickelt. Weder das Eisen noch die chemische Veränderung des Polymers haben einen Einfluss auf die äußere Erscheinung der Formulierung.

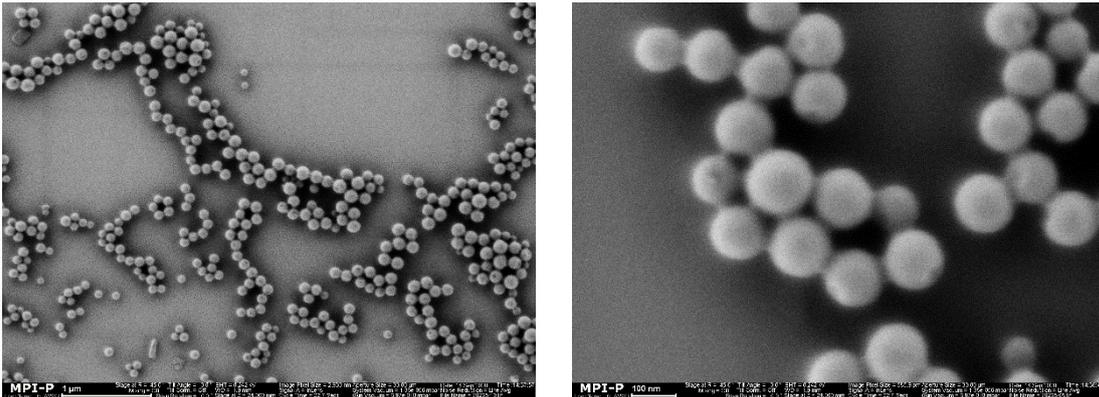


Abbildung 52 Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop von Nanopartikeln, hergestellt aus P(MMA-co-MAHA) mit 5 % MAHA Anteil A) mit einer Skalierung von 1 µm B) mit einer Skalierung von 100 nm.

Wird der Anteil an modifizierten Monomeren ein weiteres Mal um 5 % auf 10 % steigert, lassen sich ebenfalls keine Abnormitäten erkennen. (Abbildung 53) Auch hier bilden sich gleichmäßige Partikel mit glatter Oberfläche und sehr runder Erscheinung aus.

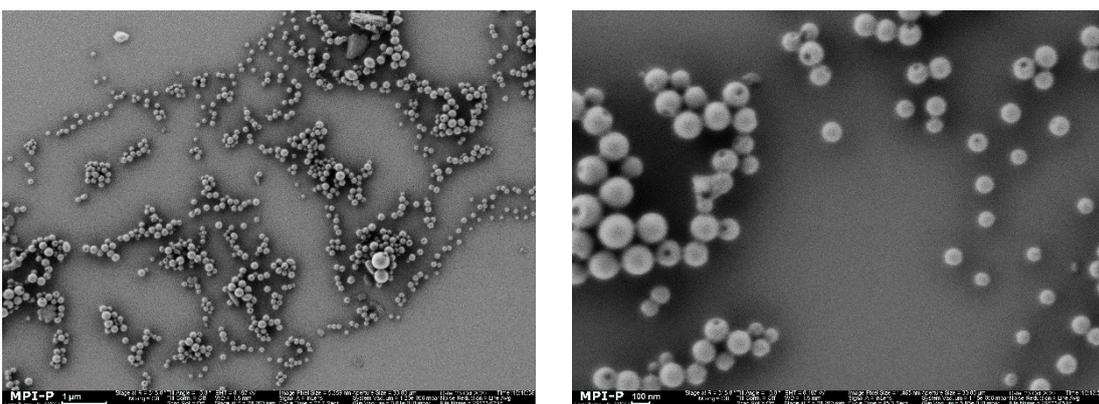


Abbildung 53 Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop von Nanopartikeln, hergestellt aus P(MMA-co-MAHA) mit 10 % MAHA Anteil A) mit einer Skalierung von 1 µm B) mit einer Skalierung von 100 nm.

6.4 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der PMMA- und P(MMA-co-MAHA)-Partikeln

Die ersten wichtigen Unterschiede zwischen den Partikeln lassen sich im Transmissionselektronenmikroskop deutlich sehen. (Abbildung 54) Betrachtet man die Partikel bei einer hohen Vergrößerung und vergleicht sie miteinander, kann man deutlich die Unterschiede in der Verteilung der SPIONs im Partikel sehen. Die Eisenpartikel bilden in PMMA ohne Hydroxamsäuren Agglomerate und lagern sich am Rand der Partikel sichtbar als kleine schwarze Punkte durch ihren hohen Kontrast in Gruppen zusammen. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei Partikeln aus PLGA, die mit einer ebenso hohen Menge an SPIONs hergestellt wurden. Auch hier scheinen sich die Eisenoxidpartikel durch die hohe Konzentration im Inneren der Polymerhülle in Gruppen zu sammeln.

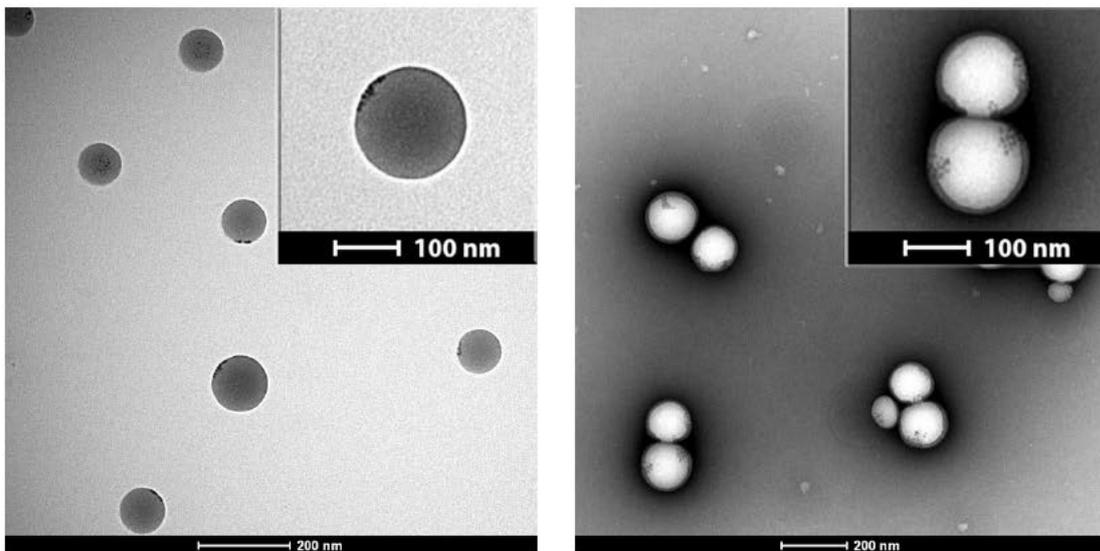


Abbildung 54 A) PMMA Partikel mit SPIONs beladen Skalierung 200 bzw. 100 nm. B) PLGA-Partikel mit Eisen beladen und mit Uranylacetat gefärbt Skalierung 200 nm bzw. 100 nm.

Bei den modifizierten Partikeln zeigt sich eine viel bessere Verteilung. Die Eisenpartikel verteilen sich fast gleichmäßig auf der Oberfläche des Polymers und scheinen keinen Hang zur Agglomeration mehr zu besitzen. In Abbildung 55 kann man die Polymere mit 5 und 10 % MAHA genauer betrachten. Abgesehen von der deutlich sichtbaren guten Verteilung kann man in der Abbildung erkennen, dass die Eisenoxidpartikel im 10 %

MAHA Polymer schlechter zu erkennen sind, es scheint, als ob weniger Partikel im Inneren zu finden sind. Bei noch höherer Vergrößerung ist es möglich, die Partikel besser zu erahnen, wie in Abbildung 56 zu sehen ist. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Abbildungen mit einem STEM-Filter im Dunkelfeld gemacht.

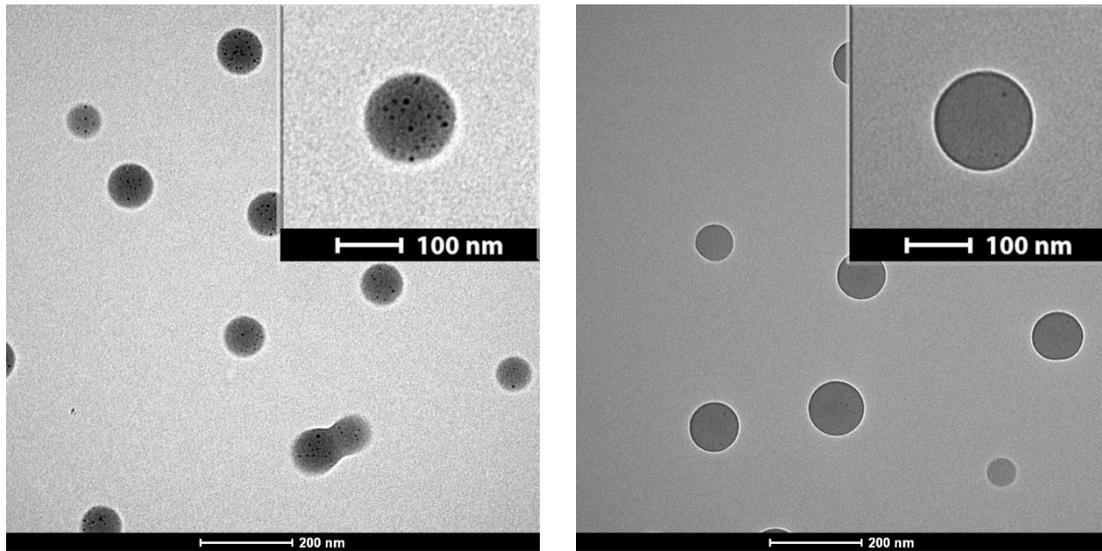


Abbildung 55 A) $P(\text{MMA-co-MAHA})$ Partikel mit 5% MAHA Anteil und mit SPIONs beladen Skalierung 200 nm. B) $P(\text{MMA-co-MAHA})$ Partikel mit 10% MAHA Anteil und mit SPIONs beladen Skalierung 200 nm.

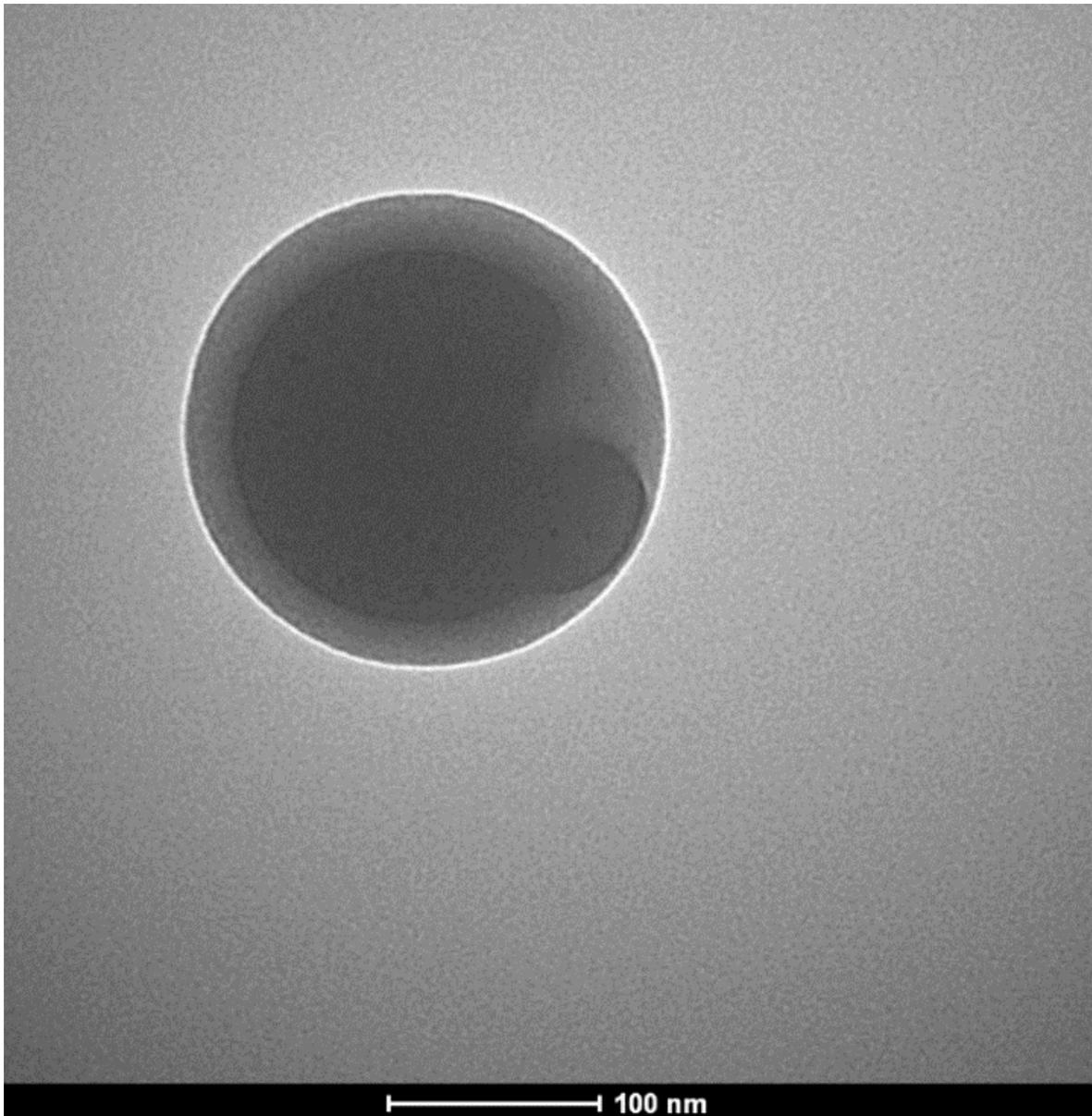


Abbildung 56 Partikel mit 10 % MAHA Anteil und mit SPIONs beladen Skalierung 100 nm.

Mit dem Dunkelfeld ließen sich die Vorteile der modifizierten Polymere in Bezug auf die Verteilung noch besser beobachten. (Abbildung 57) Eisen wird in diesem Fall als weiße Punkte im Inneren der Partikel dargestellt und hebt sich so besser vom sehr hohen Kontrast der P(MMA-co-MAHA)-Partikel ab. Durch diese Herangehensweise konnte die gleichmäßigere Verteilung des Eisens gut sichtbar gemacht werden. Außerdem war es mit dieser Methode möglich hervorzuheben, dass Eisen ebenso in Partikeln mit 10 % MAHA Anteil eingeschlossen wurde. Der erste Eindruck, dass die Einschussrate bei

höherem MAHA-Anteil sinke, wie auf den TEM Bildern ohne STEM-Einheit zu vermuten, konnte so widerlegt werden.

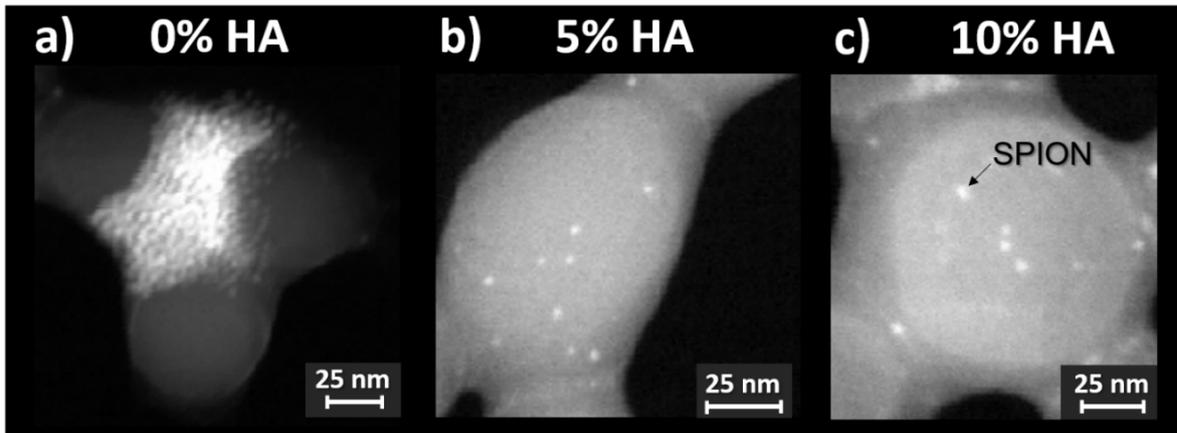


Abbildung 57 Aufnahmen mit einem STEM-Filter im Dunkelfeld von PMMA und P(MMA-co-MAHA) Partikeln.

A) reine PMMA-Partikel beladen mit SPIONs mit einer Skalierung von 25 nm. B) P(MMA-co-MAHA)-Partikel mit 5 % MAHA Anteil beladen mit SPIONs mit einer Skalierung von 25 nm. C) P(MMA-co-MAHA)-Partikel mit 10 % MAHA Anteil beladen mit SPIONs mit einer Skalierung von 25 nm.

6.5 GEHALTSBESTIMMUNG VON INKLUDIERTEN EISENPARTIKELN

Eine genaue Einschätzung der Beladung lässt sich über die reinen TEM- Bilder der vorherigen Versuche nicht treffen. Um eine bessere Aussage über die Beladungseffizienz der einzelnen Polymerarten zu erhalten, wurde diese über ein nasschemisches Verfahren und der Absorption von Ferrozin-Eisen-Komplexen ermittelt. (Abbildung 58) Deutlich lässt sich ein Trend feststellen. Mit steigendem MAHA-Anteil am Polymer steigt auch die Einschussrate von Eisen in den Partikeln. Unter den PMMA-Partikeln schnitt die Variante ohne Hydroxamsäuren am schlechtesten ab, mit einer Einschussrate von 24 %. Durch den Einbau von 5 % MAHA Monomeren konnte dieser Wert sichtlich auf 29 % erhöht werden. Wie zu erwarten, konnte dieser Trend bei einer erneuten Erhöhung des MAHA-Anteils auf 10 % weiter angehoben werden. Es konnte eine Einschussrate von 40 % bei diesen Versuchen ermittelt werden. Der Einbau von MAHA-Gruppen in das Polymer hat dementsprechend nicht nur Vorteile bezogen auf die Verteilung, sondern bindet auch SPIONs stärker an das Polymer und erhöht so die gesamte Eisenoxidmenge in der aufgereinigten Probe.

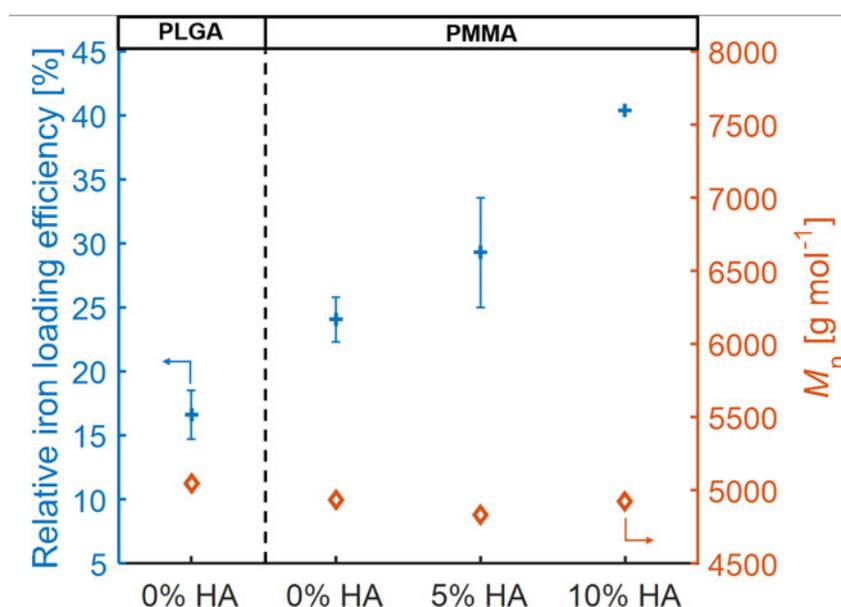


Abbildung 58 (Blau) Die Einschussrate an inkludiertem Eisen bezogen auf die eingesetzte gesamte Eisenmenge in Bezug auf variierende Hydroxamsäurekonzentrationen. (Orange) die molare Masse der Polymere in g/mol.

Ein direkter Vergleich mit PLGA zeigt, dass die neuartigen Polymere auch gegenüber PLGA eine höhere Einschussrate vorweisen können. Die Eisenbeladung ist zwar bei reinem PMMA um 8 % höher, trotzdem ist der Sprung von PLGA zu 10 % MAHA-Anteil mit einer 24 % höheren Beladungseffizienz um 143 % gestiegen und somit mehr als doppelt so groß.

Tabelle 6 SPION-Beladung in Polymer-Partikeln als theoretischer Wert nach der Verdünnung, die gemessene Eisenbeladung, prozentuale Einschuss-effizienz an Eisen gemessen am theoretischen Wert und die durchschnittliche Eisenbeladungseffizienz in Prozent.

Polymer	Konzentration (Fe) theoretisch [mg L ⁻¹]	Konzentration (Fe) [mg L ⁻¹]	SPION- Einschluss [%]	Durchschnittliche SPION-Beladung [%]
PLGA	7,3562	1,2738	17.31	16,61 ± 1.90
	7,8370	1,0851	13.85	
	10,1604	1,8464	18.17	
	13,9037	2,379	17.11	
0 % HA	11.6279	3.0269	26.03	24.05 ± 1.75
	13.7421	3.2185	23.42	
	13.8224	3.1385	22.71	
5% HA	9.5137	2.4461	25.71	29.28 ± 4.28
	10.0423	3.4166	34.02	
	10.2205	2.8735	28.11	
10% HA	6.4551	2.6107	40.44	40.44

6.6 MTT-ASSAY

Eine weitere wichtige Fragestellung für die Verwendbarkeit von P(MMA-co-MAHA) war die mögliche Toxizität der Hydroxamsäuren. Um eine erhöhte Sterblichkeit von Zellen auszuschließen, die in Kontakt mit den modifizierten Polymerpartikeln kommen, wurden MTT-Assays durchgeführt.

Die Ergebnisse waren sehr positiv und zeigten sogar einen unerwarteten Trend, da SPIONS in hohen Konzentrationen toxisch wirken. (Abbildung 59)¹⁴¹ Die Toxizität in murinen Milzzellen nahm mit höheren MAHA-Anteil ab. Während bei niedrigen Konzentrationen an Nanopartikeln alle Polymerarten einen ähnlichen und unbedenklichen toxikologischen Einfluss zeigten, wurde die Sterblichkeit bei höheren Konzentrationen von Polymeren ohne Hydroxamsäuren größer.

Die Toxizität von reinem PMMA nahm in diesen Versuchen mit jeder Konzentrationserhöhung stetig zu. Während sie anfangs noch auf einem ähnlichen, wenn auch etwas niedrigeren Niveau lag, wurde sie mit jeder Konzentrationserhöhung auch immer höher, bis sie von einer Formazanabsorption von 0,373, die der Blindprobe mit 0,377 sehr ähnlich war, auf einen Wert von 0,247 absank. Entsprechend nahm die Aktivität der Zellen um 33,8 % ab.

Bei PLGA bietet sich ein annähernd gleiches Verhalten der Zellen. Zu Beginn gab es noch eine hohe Toleranz gegenüber PLGA. Diese nahm zwar mit den ersten Konzentrationserhöhungen nicht ab, wurde aber ab 0,1 mg/ml weniger und sank bei 0,5 mg/ml weiter und zeigte zum Schluss bei 1 mg/ml auf einen Absorptionswert von 0,27. Betrachtet man die Anfangsaktivität der Proben mit 0,424, sank diese mit erhöhter Konzentration um 36,3 %. Die Toxizität war anfänglich nicht stark ausgeprägt, verursachte aber mit höherer Konzentration die höchste Sterblichkeit in den Zellen.

P(MMA-co-MAHA) mit 5 Prozent MAHA Anteil zeigt bis zu 0,5 mg/ml keine Auswirkung auf die mitochondriale Aktivität. Erst bei 1 mg/ml deutete sich ein leichter Trend an,

indem die Formazan-Absorption von anfänglichen 0,405 auf 0,365 herabsank. Prozentual betrachtet sank sie also um 9,9 %.

Bei der Probe mit dem höchsten MAHA-Anteil von 10 % zeigt sich bei keiner der Konzentrationen ein Effekt auf die Überlebensrate der Zellen. Im Gegenteil scheint die mitochondriale Aktivität bei den letzten beiden Konzentrationen sogar tendenziell zu steigen. So erhöht sich die Formazan-Absorption auf 0,448 bei 1 mg/ml im Vergleich zu 0,413 bei 0,01mg/ml um 8,5%.

Beim direkten Vergleich mit der Probe an unbehandelten Zellen kann dieser Trend noch besser beobachten werden und man erkennt, dass die Toxizität mit höherem MAHA Anteil immer weiter abnimmt.

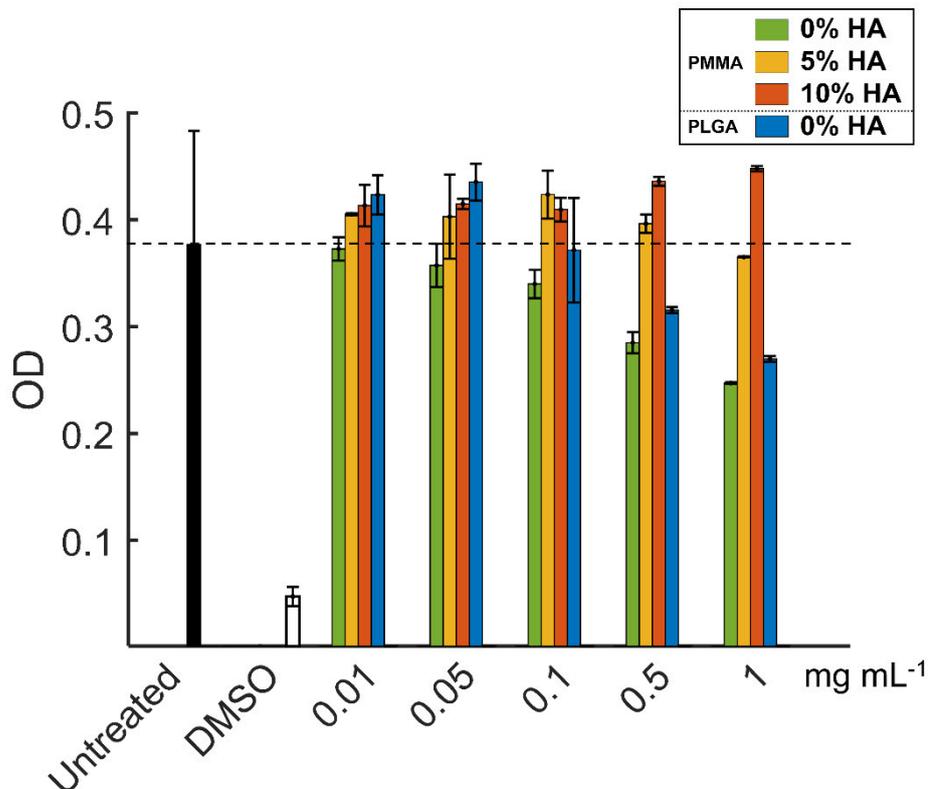


Abbildung 59 Die mitochondriale Aktivität gemessen an der Absorption aus Formazan für die verschiedenen Polymerpartikelarten bei steigenden Konzentrationen in murinen Milzzellen.

6.7 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Um die Viabilität der Zellen zu überprüfen, wurde ein FVD (fixable viability dye) verwendet. Alle Zellen wiesen eine exzellente Viabilität auf, wie in Abbildung 60 dargestellt ist.

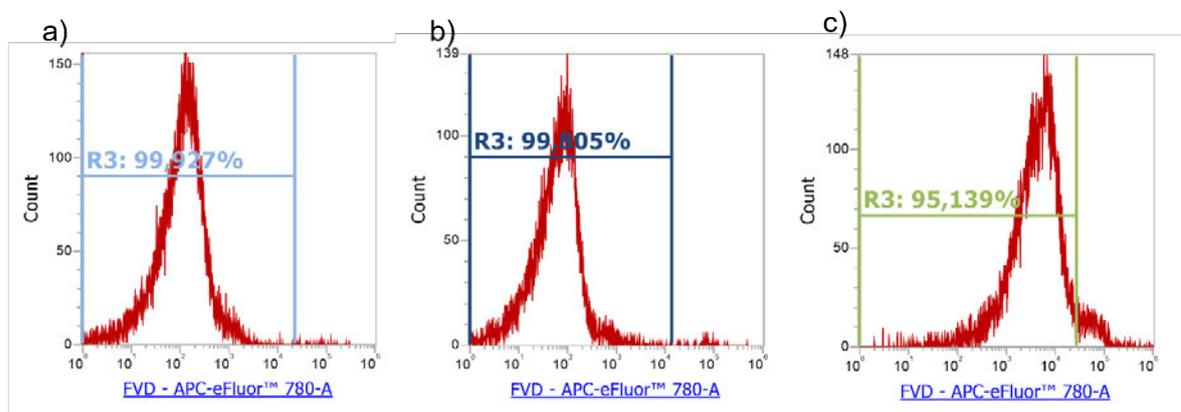


Abbildung 60 mit FVD markierte neutrophile Knochenmarkszellen

(a) B-Zellen aus der Milz (b) und dendritische Knochenmarkszellen sowie Makrophagen (c). Die Frequenzen der lebensfähigen Zellen (ohne Markierung) werden in den Grafiken auf der linken Seite dargestellt.

Mit der Durchflusszytometrie sollte die immunologische Reaktion von myeloischen Zellen auf die verschiedenen Partikelarten untersucht werden. Bei diesen Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob Hydroxamsäure durch verschiedene Leukozytenpopulationen erkannt wird und inwieweit diese Leukozyten die verschiedenen Agenzien binden/internalisieren und ob dies Auswirkungen auf deren Viabilität hat.

Die Aufnahme der Partikel in die Immunzellen zeigt ungeachtet der Konzentration einen ähnlichen Trend. Grundsätzlich lässt sich eine starke Signalsteigerung in neutrophilen Zellen bis auf das 54-fache im Vergleich zu den unbehandelten Zellen feststellen. Bei allen Partikelarten ist die Aufnahme in neutrophile Zellen am höchsten. Mit einem Signal, das bis um das 36-fache gesteigert wurde, zeigen auch Makrophagen eine deutliche Aufnahme der Partikel. Eine schwächere Aufnahme mit dem 5-fachen Wert konnte in DC

gemessen werden, während B-Zellen mit einem nur doppelt so hohen Signal im Vergleich zu Zellen ohne Partikelkontakt fast keine Aufnahme zeigten.

Tabelle 7 Durchschnittliche Fluoreszenzintensität der verschiedenen untersuchten Zelltypen, nachdem sie mit Partikeln inkubiert wurden.

Für die Messungen wurden mit Curcumin markierte Partikel aus PMMA oder P(MMA-co-MAHA) mit 5 % MAHA Anteil verwendet. Beide Partikelarten sind einmal mit und einmal ohne SPIONs dargestellt. Gemessen wurde die median fluorescence intensity (MFI)

Konzentration	SPION Eingeschlossen	HA [%mol]	MFI (Neutrophile Zellen)	MFI (B-Zellen)	MFI (Dendritische Zellen)	MFI (Makro- phagen)
Unbehandelt	-	-	1634	347	5690	1446
5%vol	Nein	0	14913	378	9055	4623
		5	38799	510	18193	23124
	Ja	0	49278	685	16985	15767
		5	21676	400	14275	11540
50%vol	Nein	0	24004	395	9698	7046
		5	89742	631	28004	52107
	Ja	0	57823	831	22813	25076
		5	59480	648	14596	14500

7 DISKUSSION: HYDROXAMSÄUREN ALS KOMPLEXBILDNER IN POLYMERPARTIKELN

Durch die Arbeit des Arbeitskreis Frey konnten Polymere entwickelt werden, die sich einerseits hervorragend zur Herstellung von Nanopartikeln eignen und die auf der anderen Seite die Effizienz der Eisenbeladung und die Verteilung im Partikel verbessern. Des Weiteren zeigen sich bei höherem MAHA-Anteil eine geringere Toxizität und im Vergleich ein ähnliches Verhalten von Immunzellen gegenüber Partikeln mit und ohne Hydroxamsäuren. Polymerpartikel konnten auf Grundlage dieser Polymere anhand der Erfahrung des Arbeitskreises Langguth als Nanopartikel hergestellt und charakterisiert werden.

Die dynamische Lichtstreuung konnte zuallererst einen Eindruck der durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser und der Größenverteilung der Partikel geben. In Tabelle 5 zeigen die Daten, dass der Anteil an MAHA nur einen geringen Einfluss auf die Partikelgröße hat. Alle Partikel zeigen einen Durchmesser, der sich mit den Daten aus den Messungen der PLGA-Partikel deckt. Die Werte entsprechen somit den beschriebenen Durchmessern, die für den EPR-Effekt notwendig sind und mit Werten zwischen 10 und 500 nm eine Anreicherung in Tumorgewebe nachweisen konnten.²³ Wie angesprochen, wird die Verteilung etwas schlechter durch einen höheren MAHA-Anteil. Dieses Verhalten liegt höchstwahrscheinlich an der schlechteren Löslichkeit in Ethylacetat und der höheren Affinität zu Wasser, durch die zusätzlich eingebauten hydrophilen Gruppen der Hydroxamsäuren. Um dieses Verhalten besser beurteilen zu können, sollten weitere Versuche durchgeführt werden, mit dem Ziel, die Höchstmenge an MAHA im Polymer zu bestimmen, bei der eine Partikelherstellung noch möglich ist. Trotz gesteigerter Inhomogenität sind auch Werte von 0,1 bis 0,2 im PDI als gute Werte für die Partikelherstellung zu betrachten, wenn man bedenkt, dass Werte unter 0,1 als hoch monodispers, zwischen 0,1 und 0,4 als mäßig polydispers und erst bei einem Wert über 0,4 als hoch polydispers beschrieben werden.¹²⁸ Das bedeutet, dass auch die Ergebnisse dieser Versuchsreihe den Anforderungen entsprechen, die an Nanopartikel gestellt wurden.

Die Rasterelektronenmikroskopie zeigte, dass alle Partikel aus PMMA, ob mit oder ohne Hydroxamsäuren, runde und gleichmäßig geformte Partikel ausbilden. Trotz der deutlich höheren Menge an SPIONs im Vergleich zur eingesetzten Polymermenge haben sich im Gegensatz zu den PLGA-Partikeln keine auffälligen Veränderungen in der Oberflächenstruktur oder in der geometrischen Form gezeigt. Die PMMA Partikel sind ungeachtet der Modifizierung in ihrer äußeren Erscheinung deutlich uniformer und runder als PLGA-Partikel mit niedrigerem SPION-Einschluss. Außerdem kann beim Vergleich der Partikel derselben Art keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Ob die Partikel einen MAHA-Anteil haben oder nicht, spielt bei ihrer Erscheinung keine Rolle. Da auch keine Eisenpartikel an der Oberfläche zu sehen sind, kann man davon ausgehen, dass sich nach den Aufreinigungsschritten mithilfe der Zentrifuge die Eisenpartikel im Inneren befinden.

Wie oben angesprochen, werden die Vorteile von Hydroxamsäuren in den Polymeren erstmals in den Abbildungen des Transmissionselektronenmikroskops ersichtlich. Hier zeigt sich deutlich die Affinität der Eisenpartikel zu den Polymeren. Durch hydrophobe Beschichtung der SPIONs mit Ölsäure sollten die Partikel eigentlich kein Bestreben haben, sich im Partikel gleichmäßig zu verteilen. In anderen Veröffentlichungen wurden ebenfalls Beobachtungen gemacht, die darauf hindeuten, dass bei größer werdenden Mengen an SPIONs mit einem Ölsäuremantel eine Agglomeration in PLGA-Partikeln stattfindet.¹⁴² Eigentlich sollten sich also SPIONs in hohen Konzentrationen wie in Abbildung 54 bei PMMA und PLGA zu sehen ist, als Agglomerate in den Partikeln zusammenlagern. Die Abbildung zeigt auch, dass dieses Phänomen in besonderem Maße in PMMA auftritt und in PLGA die Verteilung ein wenig besser ist. Während sich in PLGA einzelne Grüppchen gebildet haben, scheinen sich die Eisenoxidpartikel in PMMA immer nur an einer Stelle zu befinden. Ganz anders als in den modifizierten Polymerpartikeln. Besonders interessant wird dieses Verhalten, wenn man bedenkt, dass Hydroxamsäuren hydrophil sind und mit Eisen wasserlösliche Komplexe bilden.¹⁴³ Die Agglomeration sollte durch den hydrophoben Charakter der SPIONs in diesen Partikeln noch stärker ausgeprägt sein. Jedoch verhalten sich die Eisenoxidpartikel nur bei nicht modifizierten Polymeren auf diese Weise und zeigen in Anwesenheit von Hydroxamsäuren eine gleichmäßige Verteilung. Besonders gut lässt sich dieses

Verhalten bei Partikeln mit einem 5% MAHA-Anteil beobachten (Abbildung 55), dort sieht man im Vergleich zu reinem PMMA oder PLGA keine Grüppchenbildung, sondern ein verteiltes System aus einzelnen SPIONs. Da alle Partikel auf die gleiche Weise hergestellt wurden und alle Ausgangsmaterialien abgesehen der Polymere gleich sind, bleibt nur die Schlussfolgerung, dass die Hydroxamsäure für diese Eigenschaften verantwortlich sein kann. Die Hydroxamsäuren bilden augenscheinlich Komplexe auf den Oberflächen der SPIONs und binden sie so an die Innenseite der Polymerpartikel. Vermutlich werden die Partikel durch diese Komplexe immobilisiert, so können sie sich beim Verdampfen des Lösungsmittels und beim darauffolgenden Eintritt von Wasser nicht in Clustern zusammenlagern. Weitere Versuche sind an dieser Stelle notwendig, um dieses Verhalten gezielt zu beweisen.

Entgegen dieser Theorie zeigt sich das Bild B) aus Abbildung 55. Zu sehen sind die Partikel mit einem 10%-MAHA Anteil, die eigentlich ein ähnliches, wenn nicht besseres Bild darstellen müssten. Auf der Abbildung sind jedoch keine Partikel und wenn, dann nur sehr schemenhaft zu erkennen. Es entsteht der Eindruck, dass sich auf dem Bild keine SPIONs befinden. Nimmt man einen dieser Partikel in großer Vergrößerung auf und analysiert diesen bei voller Auflösung wie in Abbildung 56, lassen sich die SPIONs als schwarze Flecken ansatzweise erkennen. Da dies keineswegs aussagekräftig genug war, mussten zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass die PLGA-Partikel in Abbildung 54 durch ihren sehr schwachen Kontrast nicht im TEM zu sehen sind. Um sie sichtbar zu machen, müssen sie mit einem Material mit hoher Elektronendichte angefärbt werden und können so erst betrachtet werden. In diesem Fall wurden die Partikel wie beschrieben mit Uranylacetat auf dem Grid aufgetragen. Die Abbildung der PMMA-Partikel mit oder ohne MAHA Anteil hingegen wurden nicht angefärbt und zeigten trotzdem einen immens hohen Kontrast. Erst durch verschiedene Einstellungen der Belichtungszeit und Intensität konnten die Aufnahmen, so wie sie zu sehen sind, gemacht werden. So lag die Vermutung nahe, dass der hohe Kontrast der Partikel einen Einfluss auf die Darstellung der SPIONs hat. Da der Kontrast mit einer Erhöhung der Elektronendichte einhergeht,¹⁰⁸ würde ein gesteigerter Anteil an MAHA von 5 auf 10 % auch 5 % mehr konjugierte Benzolringe mit sich bringen und somit die Elektronendichte der Partikel deutlich steigern. (Abbildung 48)

Aus diesem Grund wurden zur Überprüfung dieser Theorie Aufnahmen im TEM mit einer STEM-Einheit im Dunkelfeld gemacht. (Abbildung 57) So konnten sich die Eisenoxidpartikel als weiße Punkte mit einem eisenspezifischen Signal vom dunklen, aber kontrastreichen PMMA und P(MMA-co-MAHA) abheben. Hier sieht man deutlich, dass die anfängliche Vermutung richtig ist. Es sind Eisenpartikel in den einzelnen Polymerpartikeln vorhanden und die Verteilung ist bei 5 und 10 % MAHA-Anteil besser als in reinem PMMA. Dort sammeln sich die Partikel am Rand der Polymersphären und bilden große agglomerierte Gebilde am Rand. In den anderen Partikelarten hingegen sieht man die Eisenoxidpartikel recht gleichmäßig über die Nanopartikel verteilt ohne Anzeichen von großen Anhäufungen. So konnte auch für einen 10 % MAHA Anteil gezeigt werden, dass die Eisenoxidpartikel höchstwahrscheinlich an der Oberfläche der Polymerpartikel anhaften. Als starker Eisenkomplexbildner, der mit Eisen 1, 2 und auch 3-wertige Komplexe eingehen kann,¹⁴⁴ ist zu vermuten, dass Hydroxamsäure einzelne Eisenatome auf der Oberfläche der Eisenpartikel durch ein oder mehrere Hydroxamsäuren komplexiert. Welche genaue Konstellation entsteht, muss durch weitere Versuche noch geklärt werden. Nichtsdestotrotz zeigen diese Versuche auf eindrucksvolle Weise die Affinität der SPIONs zum modifizierten Polymer, welche weder bei reinem PMMA noch bei PLGA zu sehen war. In Abbildung 61 wird diese Affinität zum Polymer bei der Herstellung dargestellt, wie sie von uns vermutet wurde. Die Theorie sollte durch eine Reihe zusätzlicher Versuche untermauert werden. Zu diesem Zweck eignen sich vor allem Versuche im SANS, um die Dicke der Polymerschicht und die Dicke der SPION-Schicht zu bestimmen. Sanson, Diou et al. konnten mit ihrem beschriebenen Verfahren bestimmen, ob die eingeschlossenen SPIONs sich gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt hatten. Durch eine Variation des Deuteriumgehalts wurde die Streulänge des Puffers zunächst dem Polymer und anschließend dem SPION angeglichen, sodass die exakte Position der einzelnen Bestandteile im Gesamtkonstrukt ermittelt werden konnte.¹³⁵ So konnten sie nicht nur die durchschnittliche Dicke der vollständigen äußeren Schichten und deren Verteilung bestimmen, sondern auch der einzelnen Schichten aus Polymer und SPIONs. Somit wurde gezeigt, dass eine durchschnittliche gute Verteilung der SPIONs an der Oberfläche der Partikel vorliegt. Ein solcher Versuch basierend auf der Neutronenstreuung sollte durchgeführt werden, um eine abschließende und präzise Aussage über die Verteilung machen zu können.

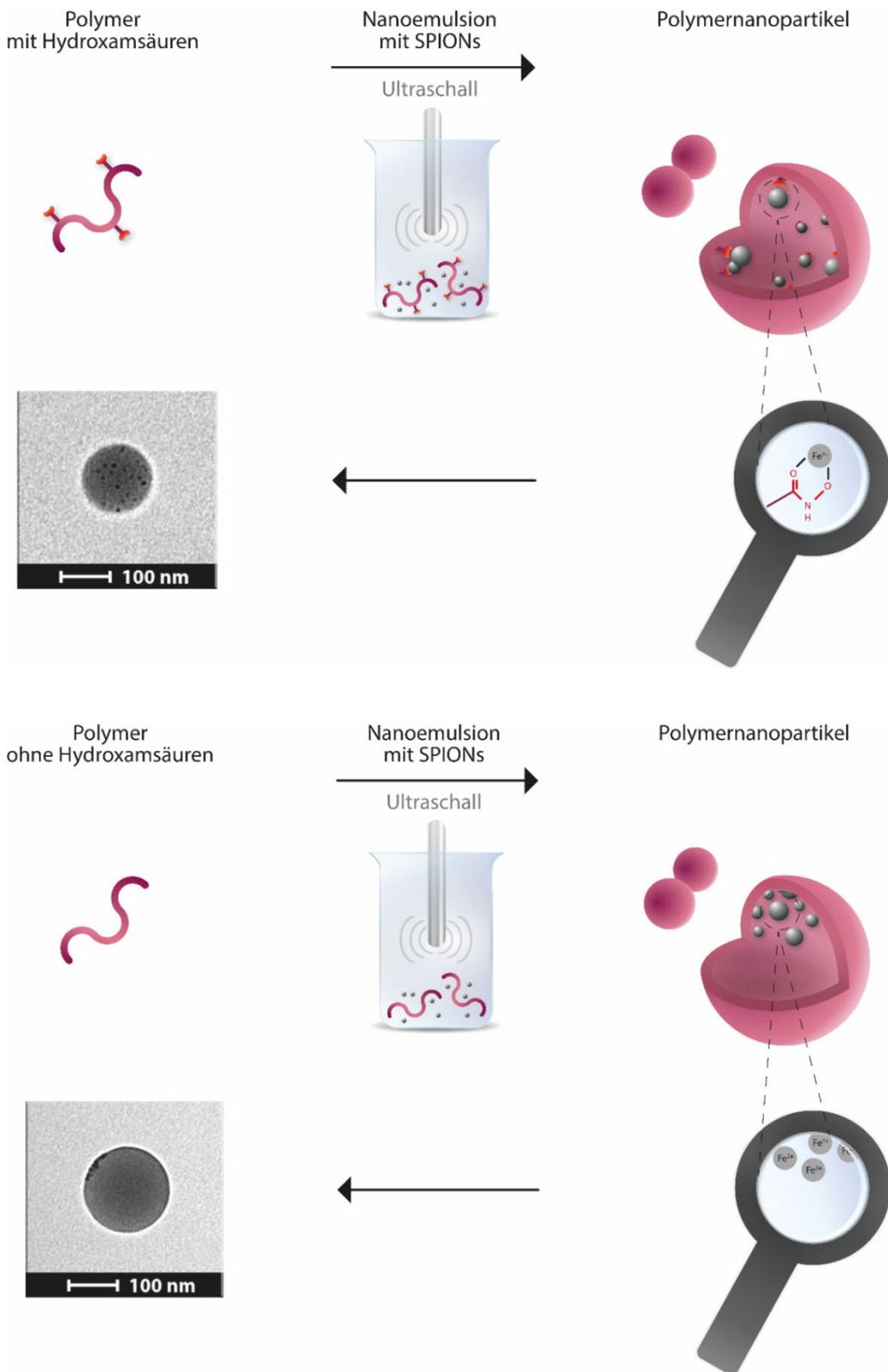


Abbildung 61 schematisch dargestellte Herstellung von Polymerpartikel mit und ohne MAHA.

Auf Grundlage dieser Beobachtung sollte gezeigt werden, ob die modifizierten Partikel durch die erhöhte Affinität zur Oberfläche und die damit verbundene bessere Verteilung auch Vorteile in der Einschlusseffizienz von Eisen zeigen können. Mit den Versuchen aus Kapitel 6.5 konnte eine deutliche Effizienzsteigerung bei der Produktion von magnetischen Polymerpartikeln demonstriert werden. Wie es durch die vorherigen Beobachtungen zu erwarten war, stieg der Anteil an eingeschlossenen SPIONs auch mit einem höheren Anteil an Hydroxamsäuren. Tabelle 6 zeigt hier, dass die Eisenkonzentrationen recht divers verteilt sind und es noch andere Faktoren bei der Produktion gibt, um das Verfahren zu optimieren. Ein sehr deutlicher Trend lässt sich dennoch erkennen. Bei einer durchschnittlichen Erhöhung der Einschlusseffizienz um 5 bzw. 16 % bezogen auf 5 % und 10 % MAHA-Anteil, ist es sehr naheliegend, dieses Verhalten mit einer Modifikation in den Polymeren in Verbindung zu bringen. Durch die erhöhte Affinität zu den Partikeln erhöht sich auch der Anteil an eingeschlossenem Eisen. Die verbesserte Einschussrate könnte einerseits an der besseren Verteilung am Polymer liegen, aber auch an der Bindung und der Fixierung der SPIONs durch das Polymer selbst. Da für diese Versuche ausschließlich die gefriergetrockneten Partikel aus den Suspensionen verwendet und diese in keiner Form verändert oder gefiltert wurden, muss das übrige Eisen bei der Aufreinigung der Partikel verworfen worden sein.

Mit diesem Versuch zeigt sich der größte Vorteil der neuen Polymere. In vorherigen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass eine höhere Eisenmenge in PLGA-Partikeln zu einer höheren Magnetisierung der Polymerpartikel führt. Es zeigt sich sogar, dass die Magnetisierung linear mit der gesteigerten Eisenkonzentration ansteigt.¹⁴² In Kapitel 1.4.3 und 1.4.4 wurde zuvor schon beschrieben, dass auch die magnetische Bildgebung und die magnetische Hyperthermie stark mit der Konzentration des Eisens verknüpft sind, im Falle der Bildgebung wurde dies auch schon in Polymerpartikeln nachgewiesen. Dies bedeutet, dass durch die modifizierten Polymere und damit der gesteigerten Einschlusseffizienz magnetische Systeme bei gleichen Herstellbedingungen bessere therapeutische Erfolge erzielen könnten. Sie würden die Produktion magnetischer Partikelsysteme günstiger machen und haben großes Potenzial bei der Effizienzsteigerung magnetischer therapeutischer Systeme.

Abschließend musste noch die Fragestellung geklärt werden, welchen Einfluss die Modifikationen der Polymere auf die Zytotoxizität und die Interaktion mit Immunzellen haben und ob es einen negativen Einfluss der Hydroxamsäuren auf die Verträglichkeit in Modellzellen gibt. Die Versuche der Zelltoxizität zeigten ein positives Ergebnis. Auch wenn es keinen Grund gab, die Toxizität der Hydroxamsäuren anzunehmen, da diese in vielen Zellorganismen als Sideophore für den Eisenhaushalt eine wichtige Rolle spielen und z.B. als Arzneimittel Desoxyferamin eine Zulassung für die Behandlung von Eisenspeicherkrankheiten wie der Hämochromtose besitzt.¹⁴⁵ Dennoch zeigten die Zellen, die mit modifizierten Polymeren und Eisen versetzt wurden, eine höhere Überlebensrate und konnten auch hier eine bessere Verträglichkeit bei murinen Milzzellen vorweisen. Die Gründe für diese Beobachtung können vielseitig sein.

Sehr wahrscheinlich ist, dass die SPIONs radikale Sauerstoffspezies hervorgebracht haben, wie es in Makrophagen schon gezeigt wurde.^{146,147} Diese Thematik wurde in vielen Vorarbeiten des AK Prof. Dr. Langguth untersucht und wurde in Kapitel 1.3.3 ausführlich behandelt. Durch diese Anhäufung von sogenannten „reactive oxygen species“ (ROS) kann es zu inflammatorischen Erscheinungen, Zellveränderung und Apoptose kommen.¹⁴⁸ Besonders freies Eisen ist dafür bekannt, dass es durch Fenton-Reaktion, aber auch über die Haber-Weiss-Reaktion zu oxidativem Stress durch Hydroxylradikale kommt.¹⁴⁹ Hydroxamsäuren hingegen könnten durch ihre komplexierenden Eigenschaften freie Eisenatome, die sich in Anwesenheit von Wasser bilden, abfangen, bevor diese Schäden an den Zellen anrichten können. Aber auch an der Oberfläche von Eisenpartikel kann es zur Bildung dieser hochreaktiven Sauerstoffspezies kommen.¹⁵⁰ Hier könnte die Immobilität der SPIONs eine wichtige Rolle in der Verringerung der Toxizität spielen. Des Weiteren könnten die Polymere selbst in ihrer ursprünglichen Form toxischer sein als die modifizierten Varianten. Es bedarf weiterer Versuche und Untersuchungen, um dies ausführlich zu klären. Jedoch sind diese Daten besonders erfreulich, da mit einer verringerten Toxizität nicht gerechnet wurde, sondern vielmehr mit einem unveränderten toxikologischen Ergebnis aller Polymerarten im Vergleich untereinander. Die Partikel aus P(MMA-co-HA) besitzen also auch in dieser Hinsicht signifikante Vorteile gegenüber reinem PMMA und dem seit Jahren intensiv untersuchten PLGA.

In den FACS-Versuchen wurde die Bindung der Partikel an die unterschiedlichen Immunzellen untersucht. So sollten Rückschlüsse über die Interaktion des Immunsystems mit den unterschiedlichen Polymeren erhalten werden. Auch bei diesen Versuchen konnte eine sehr gute Überlebensrate in den Zellen bestätigt werden. Da es noch keine gesicherten Daten zur Einschussrate des Curcumins in den einzelnen Polymerpartikelarten gibt, können nur Daten miteinander verglichen werden, bei denen dasselbe Agens bei verschiedenen Zellen verwendet wurde, nicht aber Daten eines Zelltyps mit unterschiedlichen Agenzien.

Die Partikel hatten die höchste Aufnahmerate bei neutrophilen Zellen und Makrophagen, die als phagozytierende Zellen sehr unspezifisch auf Fremdkörper reagieren. DC, die ebenfalls eher zur innate Immunabwehr zählen, zeigten im Gegensatz zu Makrophagen und neutrophilen Zellen eine geringe Aufnahme. Zellen, die zur spezifischen Immunabwehr gehören, wie bspw. B-Zellen, nahmen ebenfalls kaum Partikel auf. Da Makrophagen und neutrophile Zellen als erste Antwort des Immunsystems auf Fremdkörper reagieren und B-Zellen durch aufgenommene Pathogene aktiviert werden,¹⁵¹ ist dies nicht verwunderlich. Es ist jedoch ein Hinweis darauf, dass von Hydroxamsäuren keine verstärkte Immunantwort zu erwarten ist. Auch dies deckt sich mit der zugelassenen Anwendung von Hydroxamsäuren als Infusionen zur Bekämpfung der Hämochromatose, die außer einigen Irritationen an der Infusionsstelle keine Nebenwirkungen bei Dosen von 1 bis 2 g pro Tag gezeigt haben.¹⁵² Für die direkte Vergleichbarkeit der Polymeren auf die Immunantwort sollten jedoch noch weitere Versuche folgen.

Fazit:

Diese Arbeit hat einen weiteren Schritt zur Weiterentwicklung der Therapie mit magnetischen Nanopartikel geliefert. Zukünftig sind weitere Versuche notwendig, um detailliertes Wissen über die Prozesse und eingesetzten Materialien zu erhalten.

Obwohl noch viele Unklarheiten existieren, konnte mit dieser Arbeit dennoch das große Potenzial von Polymeren mit Hydroxamsäure bei der Herstellung von magnetischen Nanopartikeln belegt werden. Das hier vorgestellte System birgt eine Vielzahl von

Vorteilen und ist aus jetzigem Wissensstand einzigartig. Soweit dem Autor bekannt ist, gibt es keine Versuche, die einen ähnlichen Ansatz verfolgen und einer physikalischen Effizienzsteigerung der Systeme durch chemische Veränderungen des Polymers verfolgen. Während in anderen Veröffentlichungen wie in Kapitel 1.4 dargelegt, die Anhäufung der Partikel in den Zielgeweben durch Modifikationen an den Partikeloberflächen als Ziel haben, basiert mein System auf der besseren Magnetisierung der Partikel ohne den Verlust der Distribution und einer höheren Einschlusseffizienz. Formulierungen, die auf der Grundlage von Oberflächenverankerungen am Zielgewebe funktionieren, haben meines Erachtens einen großen Nachteil. Sie alle sind sehr spezifisch auf eine Erkrankung oder eine Tumorexpression angewiesen. In manchen Fällen sind sogar mehrere spezifische Oberflächenproteine für eine bessere Akkumulation notwendig. Somit können mit dem Ansatz des aktiven Targetings nur sehr genau definierte Gewebsarten anvisiert werden. Die allgemeine Verbesserung der Magnetisierung kann unabhängig von der Art der Erkrankung ihre Wirkung entfalten, da sie auf diese Oberflächenproteine nicht angewiesen ist. Die Steigerung würde bei allen Tumorarten auf gleiche Weise zum Tragen kommen. Dieses System birgt dementsprechend großes Potenzial bei der Verbesserung der magnetischen Nanopartikel und kann zu besseren Therapieerfolgen führen. Aber auch in Kombination mit dem magnetischen Targeting, dem aktiven Targeting über Oberflächenprotein und der magnetischen Hyperthermie, könnten modifizierte Polymere mit Hydroxamsäuren die bisher erreichten Erfolge noch weiter vorantreiben. Hinzu kommt die niedrigere Toxizität im Vergleich zu etablierten Partikelarten aus PLGA.

Ausblick:

Die wichtigste Herausforderung an dieses System, um es für weitere Versuche in z. B. Tieren weiterzuentwickeln und zu erforschen, ist die nicht vorhandene Bioabbaubarkeit des Polymers.¹⁵³ PMMA wurde bei diesen Versuchen aufgrund seiner Löslichkeit in Ethylacetat und seiner Resistenz gegenüber einer Vielzahl an Säuren als Modellschubstanz verwendet.¹⁵⁴ So konnte zunächst die Theorie des verbesserten Eiseneinschlusses in polymeren Nanopartikeln überprüft werden. Aufgrund der Synthese, die in Kapitel 3.3.2 erklärt wurde, muss die Hydroxamsäure im letzten Schritt mit Säure geschützt werden. Bioabbaubare Polymere, die heute in der Herstellung von Nanopartikeln eingesetzt

werden, sind entweder Polyester, Polysaccharide oder Proteine.^{155,156} Alle diese Polymerarten beruhen auf säurelabilen Verbindungen und eignen sich deswegen nur bedingt zur Herstellung von mit Hydroxamsäure gekoppelten Polymeren. Für weitere Versuche mit dem Ziel der verbesserten Tumorbekämpfung oder Bildgebung muss weiter an Polymeren gearbeitet werden, die einerseits bioabbaubar sind und auf der anderen Seite Hydroxamsäure enthalten.

Außerdem sollten Untersuchungen durchgeführt werden, die klären, aus welchem Grund P(MMA-co-MAHA)-Partikel eine geringere Toxizität aufweisen und ob sich dieses Verhalten auch bei bioabbaubaren Polymeren weiter zeigt. Indem man eine Erklärung für dieses Phänomen findet, könnte die Toxizität von magnetischen Nanopartikeln in Zukunft weiter sinken und dies könnte den Einsatz von höheren Dosen erlauben.

Auch sollten die immunologischen Tests weiter fortgeführt werden. Die Daten zeigen, dass es bei Zellen des unspezifischen Immunsystems zur Aufnahme der Partikel kommt, aber eine spezifische Reaktion durch B-Zellen ausbleibt. Allerdings haben diese Daten keine Aussage über die Stärke der Immunreaktion und geben nur Hinweise auf die Art der Immunantwort. So sollte beispielsweise die Konzentration von inflammatorischen Mediatoren wie bspw. Zytokinen bei weiteren Versuchen bestimmt werden. So könnte die Fragestellung nach der Intensität der Immunantwort beantwortet werden, um starke Nebenwirkungen in Testtieren zu vermeiden

QUELLEN

1. Weiser JR, Saltzman WM. Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models. *J Control Release*. 2014;190:664-673. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.048.
2. Chenthamara D, Subramaniam S, Ramakrishnan SG, et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater Res*. 2019;23:20. doi:10.1186/s40824-019-0166-x.
3. Fahr A, Voigt R. *Voigt Pharmazeutische Technologie: Für Studium und Beruf*. 12., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2015. Wissen und Praxis.
4. Bari H. A prolonged release parenteral drug delivery system-an overview. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2010;3(1):1-11.
5. Rahnfeld L, Luciani P. Injectable Lipid-Based Depot Formulations: Where Do We Stand? *Pharmaceutics*. 2020;12(6). doi:10.3390/pharmaceutics12060567.
6. Nguyen T-T-L, Duong V-A, Maeng H-J, Chi S-C. Preparation of an oil suspension containing ondansetron hydrochloride as a sustained release parenteral formulation. *Drug Deliv Transl Res*. 2020;10(1):282-295. doi:10.1007/s13346-019-00687-2.
7. Hatefi A, Amsden B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2002;80(1-3):9-28. doi:10.1016/S0168-3659(02)00008-1.
8. Krause H-J, Schwarz A, Rohdewald P. Polylactic acid nanoparticles, a colloidal drug delivery system for lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 1985;27(2-3):145-155. doi:10.1016/0378-5173(85)90064-X.
9. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in Biotechnology*. 1995;13(12):527-537. doi:10.1016/S0167-7799(00)89017-4.
10. Athanasiou K. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*. 1996;17(2):93-102. doi:10.1016/0142-9612(96)85754-1.
11. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 2011;3(3):1377-1397. doi:10.3390/polym3031377.
12. Bohrey S, Chourasiya V, Pandey A. Polymeric nanoparticles containing diazepam: preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study. *Nano Converg*. 2016;3(1):3. doi:10.1186/s40580-016-0061-2.
13. Leroux JC, Cozens R, Roesel JL, et al. Pharmacokinetics of a novel HIV-1 protease inhibitor incorporated into biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral administration to mice. *J Pharm Sci*. 1995;84(12):1387-1391. doi:10.1002/jps.2600841202.
14. Blasi P. Poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles: an overview. *J Pharm Investig*. 2019;49(4):337-346. doi:10.1007/s40005-019-00453-z.
15. Wang Y, Qu W, Choi SH. FDA's regulatory science program for generic PLA/PLGA-based drug products. [Am Pharm Rev 19(4):5-9]. 2016. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/188841-FDA-s-Regulatory-Science-Program-for-Generic-PLA-PLGA-Based-Drug-Products/>.
16. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;75(1):1-18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.

17. Park K, Lee S, Kang E, Kim K, Choi K, Kwon IC. New Generation of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy. *Adv Funct Mater.* 2009;19(10):1553-1566. doi:10.1002/adfm.200801655.
18. Wang X, Yang L, Chen ZG, Shin DM. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(2):97-110. doi:10.3322/CA.2007.0003.
19. Xin Y, Yin M, Zhao L, Meng F, Luo L. Recent progress on nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Cancer Biol Med.* 2017;14(3):228-241. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0052.
20. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012;161(2):505-522. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
21. Rezvantalab S, Drude NI, Moraveji MK, et al. PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Front Pharmacol.* 2018;9:1260. doi:10.3389/fphar.2018.01260.
22. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release.* 2000;65(1-2):271-284. doi:10.1016/S0168-3659(99)00248-5.
23. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(3):131-135. doi:10.1016/j.addr.2010.03.011.
24. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986;46(12 Pt 1):6387-6392.
25. Golombek SK, May J-N, Theek B, et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;130:17-38. doi:10.1016/j.addr.2018.07.007.
26. Zhuang Y, Deng H, Su Y, et al. Aptamer-Functionalized and Backbone Redox-Responsive Hyperbranched Polymer for Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Biomacromolecules.* 2016;17(6):2050-2062. doi:10.1021/acs.biomac.6b00262.
27. Calixto GMF, Bernegossi J, Freitas LM de, Fontana CR, Chorilli M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules.* 2016;21(3):342. doi:10.3390/molecules21030342.
28. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc.* 2013;46(1):24-29. doi:10.5946/ce.2013.46.1.24.
29. Liu Y, Zhao G, Xu C-F, Luo Y-L, Lu Z-D, Wang J. Systemic delivery of CRISPR/Cas9 with PEG-PLGA nanoparticles for chronic myeloid leukemia targeted therapy. *Biomater Sci.* 2018;6(6):1592-1603. doi:10.1039/C8BM00263K.
30. Rosalia RA, Cruz LJ, van Duiker S, et al. CD40-targeted dendritic cell delivery of PLGA-nanoparticle vaccines induce potent anti-tumor responses. *Biomaterials.* 2015;40:88-97. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.053.
31. Zhong Y, Meng F, Deng C, Zhong Z. Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules.* 2014;15(6):1955-1969. doi:10.1021/bm5003009.
32. Lurje G, Lenz H-J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology.* 2009;77(6):400-410. doi:10.1159/000279388.

33. Acharya S, Dilnawaz F, Sahoo SK. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials*. 2009;30(29):5737-5750. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.008.
34. Ruoslahti E. Peptides as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles. *Adv Mater*. 2012;24(28):3747-3756. doi:10.1002/adma.201200454.
35. Liu P, Qin L, Wang Q, et al. cRGD-functionalized mPEG-PLGA-PLL nanoparticles for imaging and therapy of breast cancer. *Biomaterials*. 2012;33(28):6739-6747. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.008.
36. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818-822. doi:10.1038/346818a0.
37. Xiao Z, Farokhzad OC. Aptamer-functionalized nanoparticles for medical applications: challenges and opportunities. *ACS Nano*. 2012;6(5):3670-3676. doi:10.1021/nn301869z.
38. Gu F, Zhang L, Teply BA, et al. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2586-2591. doi:10.1073/pnas.0711714105.
39. Asplund T, Heldin P. Hyaluronan Receptors Are Expressed on Human Malignant Mesothelioma Cells but not on Normal Mesothelial Cells. *Cancer Res*. 1994;54(16):4516-4523. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/54/16/4516.full.pdf>.
40. Yadav AK, Mishra P, Mishra AK, Mishra P, Jain S, Agrawal GP. Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine*. 2007;3(4):246-257. doi:10.1016/j.nano.2007.09.004.
41. Chen WC, Zhang AX, Li S-D. Limitations and niches of the active targeting approach for nanoparticle drug delivery. *European Journal of Nanomedicine*. 2012;4(2-4). doi:10.1515/ejnm-2012-0010.
42. Karl Buch, T. Nawroth, P. Langguth. *Lanthanide-loaded nanoparticles as a novel radioenhancer in radiation therapy of cancer*. [Dissertation]. Mainz: Johannes Gutenberg University; 2009.
43. Operti MC, Bernhardt A, Grimm S, Engel A, Figdor CG, Tagit O. PLGA-based nanomedicines manufacturing: Technologies overview and challenges in industrial scale-up. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;605:120807. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120807.
44. Jahn MR, Nawroth T, Fütterer S, Wolfrum U, Kolb U, Langguth P. Iron oxide/hydroxide nanoparticles with negatively charged shells show increased uptake in Caco-2 cells. *Mol Pharm*. 2012;9(6):1628-1637. doi:10.1021/mp200628u.
45. Jahn MR, Shukoor I, Tremel W, et al. Hemin-coupled iron(III)-hydroxide nanoparticles show increased uptake in Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(12):1522-1530. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01356.x.
46. Jahn MR, Mrestani Y, Langguth P, Neubert RHH. CE characterization of potential toxic labile iron in colloidal parenteral iron formulations using off-capillary and on-capillary complexation with EDTA. *Electrophoresis*. 2007;28(14):2424-2429. doi:10.1002/elps.200600559.
47. Fütterer S, Andrusenko I, Kolb U, Hofmeister W, Langguth P. Structural characterization of iron oxide/hydroxide nanoparticles in nine different parenteral drugs for the treatment of iron deficiency anaemia by electron diffraction (ED) and X-ray powder diffraction (XRPD). *J Pharm Biomed Anal*. 2013;86:151-160. doi:10.1016/j.jpba.2013.08.005.

48. Schnorr J, Fütterer S, Spicher K, et al. Bioequivalence decision for nanoparticulate iron complex drugs for parenteral administration based on their disposition. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018;94:293-298. doi:10.1016/j.yrtph.2018.02.009.
49. Schnorr J. *Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe: Untersuchungen zu Physikochemie, In-vitro-Verhalten und Austauschbarkeit von Eisen „non-biological complex drugs“*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2018.
50. Nawroth T, Rusp M, May RP. Magnetic liposomes and entrapping : time-resolved neutron scattering TR-SANS and electron microscopy. *Physica B: Condensed Matter*. 2004;350(1-3):E635-E638. doi:10.1016/j.physb.2004.03.170.
51. Zhang H, Liu XL, Zhang YF, et al. Magnetic nanoparticles based cancer therapy: current status and applications. *Sci China Life Sci*. 2018;61(4):400-414. doi:10.1007/s11427-017-9271-1.
52. Meschede D. *Gerthsen Physik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
53. Gittleman JI, Abeles B, Bozowski S. Superparamagnetism and relaxation effects in granular Ni-Si O₂ and Ni- Al₂O₃ films. *Phys Rev B*. 1974;9(9):3891-3897. doi:10.1103/PhysRevB.9.3891.
54. *Nano-Glass Ceramics*. Elsevier; 2015.
55. Dulińska-Litewka J, Łazarczyk A, Hałubiec P, Szafranski O, Karnas K, Karewicz A. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles-Current and Prospective Medical Applications. *Materials (Basel)*. 2019;12(4). doi:10.3390/ma12040617.
56. Marghussian V. Magnetic Properties of Nano-Glass Ceramics. In: *Nano-Glass Ceramics*. Elsevier; 2015:181-223.
57. Kuznetsov AA, Filippov VI, Kuznetsov OA, Gerlivanov VG, Dobrinsky EK, Malashin SI. New ferro-carbon adsorbents for magnetically guided transport of anti-cancer drugs. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1999;194(1-3):22-30. doi:10.1016/S0304-8853(98)00568-X.
58. Fritsche O. Die magnetische Induktion. In: Fritsche O, ed. *Physik für Chemiker II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020:67-73.
59. Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, et al. Clinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: A Phase I Study with 4'-Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Res*. 1996;56(20):4686-4693. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/56/20/4686.full.pdf>.
60. Lübbe AS, Bergemann C, Huhnt W, et al. Preclinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: Tolerance and Efficacy. *Cancer Res*. 1996;56(20):4694.
61. Schleich N, Po C, Jacobs D, et al. Comparison of active, passive and magnetic targeting to tumors of multifunctional paclitaxel/SPIO-loaded nanoparticles for tumor imaging and therapy. *J Control Release*. 2014;194:82-91. doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.059.
62. Cui Y, Zhang M, Zeng F, Jin H, Xu Q, Huang Y. Dual-Targeting Magnetic PLGA Nanoparticles for Codelivery of Paclitaxel and Curcumin for Brain Tumor Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(47):32159-32169. doi:10.1021/acsami.6b10175.
63. Shakeri-Zadeh A, Khoee S, Shiran M-B, Sharifi AM, Khoei S. Synergistic effects of magnetic drug targeting using a newly developed nanocapsule and tumor irradiation by ultrasound on CT26 tumors in BALB/c mice. *J Mater Chem B*. 2015;3(9):1879-1887. doi:10.1039/C4TB01708K.

64. Al-Jamal KT, Bai J, Wang JT-W, et al. Magnetic Drug Targeting: Preclinical in Vivo Studies, Mathematical Modeling, and Extrapolation to Humans. *Nano Lett.* 2016;16(9):5652-5660. doi:10.1021/acs.nanolett.6b02261.
65. Takeda S, Mishima F, Fujimoto S, Izumi Y, Nishijima S. Development of magnetically targeted drug delivery system using superconducting magnet. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2007;311(1):367-371. doi:10.1016/j.jmmm.2006.10.1195.
66. Rotariu O, Strachan NJ. Modelling magnetic carrier particle targeting in the tumor microvasculature for cancer treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2005;293(1):639-646. doi:10.1016/j.jmmm.2005.01.081.
67. Yan L, Amirshaghghi A, Huang D, et al. Protoporphyrin IX (PpIX)-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) Nanoclusters for Magnetic Resonance Imaging and Photodynamic Therapy. *Adv Funct Mater.* 2018;28(16). doi:10.1002/adfm.201707030.
68. Perez JM, Josephson L, Weissleder R. Use of magnetic nanoparticles as nanosensors to probe for molecular interactions. *Chembiochem.* 2004;5(3):261-264. doi:10.1002/cbic.200300730.
69. Schleich N, Sibret P, Danhier P, et al. Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging. *International Journal of Pharmaceutics.* 2013;447(1-2):94-101. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.042.
70. Rodolfo Debone Piazza, Wesley Renato Viali, Caio Carvalho dos Santos, et al. PEGlatyon-SPION surface functionalization with folic acid for magnetic hyperthermia applications. *Materials Research Express.* 2020;7(1):15078.
71. Chang D, Lim M, Goos JACM, et al. Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations. *Front Pharmacol.* 2018;9:831. doi:10.3389/fphar.2018.00831.
72. Cędrowska E, Pruszyński M, Gawęda W, et al. Trastuzumab Conjugated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Labeled with 225Ac as a Perspective Tool for Combined α -Radioimmunotherapy and Magnetic Hyperthermia of HER2-Positive Breast Cancer. *Molecules.* 2020;25(5). doi:10.3390/molecules25051025.
73. Gobbo OL, Sjaastad K, Radomski MW, Volkov Y, Prina-Mello A. Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Theranostics.* 2015;5(11):1249-1263. doi:10.7150/thno.11544.
74. Connord V, Clerc P, Hallali N, et al. Real-Time Analysis of Magnetic Hyperthermia Experiments on Living Cells under a Confocal Microscope. *Small.* 2015;11(20):2437-2445. doi:10.1002/smll.201402669.
75. Eynali S, Khoei S, Khoei S, Esmaelbeygi E. Evaluation of the cytotoxic effects of hyperthermia and 5-fluorouracil-loaded magnetic nanoparticles on human colon cancer cell line HT-29. *International Journal of Hyperthermia.* 2017;33(3):327-335. doi:10.1080/02656736.2016.1243260.
76. Vivek R, Thangam R, Kumar SR, et al. HER2 Targeted Breast Cancer Therapy with Switchable "Off/On" Multifunctional "Smart" Magnetic Polymer Core-Shell Nanocomposites. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(3):2262-2279. doi:10.1021/acsami.5b11103.
77. Griffete N, Fresnais J, Espinosa A, Taverna D, Wilhelm C, Ménager C. Thermal Polymerization on the Surface of Iron Oxide Nanoparticles Mediated by Magnetic Hyperthermia: Implications for Multishell Grafting and Environmental Applications. *ACS Appl Nano Mater.* 2018;1(2):547-555. doi:10.1021/acsanm.7b00063.

78. Zhang Z-Q, Song S-C. Thermosensitive/superparamagnetic iron oxide nanoparticle-loaded nanocapsule hydrogels for multiple cancer hyperthermia. *Biomaterials*. 2016;106:13-23. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.08.015.
79. Tay ZW, Chandrasekharan P, Chiu-Lam A, et al. Magnetic Particle Imaging-Guided Heating in Vivo Using Gradient Fields for Arbitrary Localization of Magnetic Hyperthermia Therapy. *ACS Nano*. 2018;12(4):3699-3713. doi:10.1021/acsnano.8b00893.
80. La Presa P de, Luengo Y, Multigner M, et al. Study of Heating Efficiency as a Function of Concentration, Size, and Applied Field in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2012;116(48):25602-25610. doi:10.1021/jp310771p.
81. Mertz D, Sandre O, Bégin-Colin S. Drug releasing nanoplatforms activated by alternating magnetic fields. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017;1861(6):1617-1641. doi:10.1016/j.bbagen.2017.02.025.
82. Hua X, Tan S, Bandara HMHN, Fu Y, Liu S, Smyth HDC. Externally controlled triggered-release of drug from PLGA micro and nanoparticles. *PLoS One*. 2014;9(12):e114271. doi:10.1371/journal.pone.0114271.
83. Fang K, Song L, Gu Z, Yang F, Zhang Y, Gu N. Magnetic field activated drug release system based on magnetic PLGA microspheres for chemo-thermal therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;136:712-720. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.10.014.
84. Chiang W-L, Ke C-J, Liao Z-X, et al. Pulsatile drug release from PLGA hollow microspheres by controlling the permeability of their walls with a magnetic field. *Small*. 2012;8(23):3584-3588. doi:10.1002/smll.201201743.
85. Liu JF, Jang B, Issadore D, Tsourkas A. Use of magnetic fields and nanoparticles to trigger drug release and improve tumor targeting. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2019;11(6):e1571. doi:10.1002/wnan.1571.
86. Raouf I, Khalid S, Khan A, Lee J, Kim HS, Kim M-H. A review on numerical modeling for magnetic nanoparticle hyperthermia: Progress and challenges. *J Therm Biol*. 2020;91:102644. doi:10.1016/j.jtherbio.2020.102644.
87. Sun S, Zeng H, Robinson DB, et al. Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2004;126(1):273-279. doi:10.1021/ja0380852.
88. Nappini S, Bonini M, Ridi F, Baglioni P. Structure and permeability of magnetoliposomes loaded with hydrophobic magnetic nanoparticles in the presence of a low frequency magnetic field. *Soft Matter*. 2011;7(10):4801. doi:10.1039/C0SM01264E.
89. Guo H, Chen W, Sun X, Liu Y-N, Li J, Wang J. Theranostic magnetoliposomes coated by carboxymethyl dextran with controlled release by low-frequency alternating magnetic field. *Carbohydr Polym*. 2015;118:209-217. doi:10.1016/j.carbpol.2014.10.076.
90. Vlasova KY, Piroyan A, Le-Deygen IM, et al. Magnetic liposome design for drug release systems responsive to super-low frequency alternating current magnetic field (AC MF). *J Colloid Interface Sci*. 2019;552:689-700. doi:10.1016/j.jcis.2019.05.071.
91. Stiny L. *Grundwissen Elektrotechnik und Elektronik: Eine leicht verständliche Einführung*. 7., vollst. überarb. u. erw. Auflage 2018. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden; 2018.
92. Harten U. *Physik für Mediziner*. Sixteenth edition. Berlin, Heidelberg: Springer; 2020.

93. Lossen H. Ueber die Oxalohydroxamsäure;. *Ann Chem Pharm.* 1869;150(3):314-322. doi:10.1002/jlac.18691500304.
94. Keth J, Johann T, Frey H. Hydroxamic Acid: An Underrated Moiety? Marrying Bioinorganic Chemistry and Polymer Science. *Biomacromolecules.* 2020;21(7):2546-2556. doi:10.1021/acs.biomac.0c00449.
95. Folkers JP, Gorman CB, Laibinis PE, Buchholz S, Whitesides GM, Nuzzo RG. Self-Assembled Monolayers of Long-Chain Hydroxamic Acids on the Native Oxide of Metals. *Langmuir.* 1995;11(3):813-824. doi:10.1021/la00003a024.
96. Raymond KN, Allred BE, Sia AK. Coordination Chemistry of Microbial Iron Transport. *Accounts of Chemical Research.* 2015;48(9):2496-2505. doi:10.1021/acs.accounts.5b00301.
97. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(3):413-451. doi:10.1128/MMBR.00012-07.
98. Miller MJ. Syntheses and therapeutic potential of hydroxamic acid based siderophores and analogs. *Chemical Reviews.* 1989;89(7):1563-1579.
99. Imran ul-haq M, Hamilton JL, Lai BFL, et al. Design of long circulating nontoxic dendritic polymers for the removal of iron in vivo. *ACS Nano.* 2013;7(12):10704-10716. doi:10.1021/nn4035074.
100. Yu B, Yang Y, Liu Q, Zhan A, Yang Y, Liu H. A Novel Star Like Eight-Arm Polyethylene Glycol-Deferoxamine Conjugate for Iron Overload Therapy. *Pharmaceutics.* 2020;12(4). doi:10.3390/pharmaceutics12040329.
101. Foner S. Versatile and Sensitive Vibrating-Sample Magnetometer. *Review of Scientific Instruments.* 1959;30(7):548-557. doi:10.1063/1.1716679.
102. Nalwa HS, ed. *Handbook of thin film materials.* San Diego: Academic Press; 2002.
103. Jiles D. *Introduction to magnetism and magnetic materials.* 2. ed., transferred to digital print. Boca Raton, Fla.: CRC; 2010.
104. *Magnetic sensor and magnetometers.* London: Artech House; 2000.
105. Cullity BD, Graham CD. *Introduction to magnetic materials.* 2nd ed. Hoboken, New Jersey, [Piscataway, New Jersey]: IEEE/Wiley; IEEE Xplore; 2008.
106. Kolhatkar AG, Jamison AC, Litvinov D, Willson RC, Lee TR. Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):15977-16009. doi:10.3390/ijms140815977.
107. Shi C, Thum C, Zhang Q, et al. Inhibition of the cancer-associated TASK 3 channels by magnetically induced thermal release of Tetrandrine from a polymeric drug carrier. *J Control Release.* 2016;237:50-60. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.044.
108. Lauth GJ. *Einführung in die physik und chemie der grenzflichen und kolloide.* [Place of publication not identified]: Springer; 2015.
109. Linnemann A, Kühl S, eds. *Grundlagen der Licht- und Elektronenmikroskopie.* Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 2018. UTB; 4864.
110. Lababidi N, Sigal V, Koenneke A, Schwarzkopf K, Manz A, Schneider M. Microfluidics as tool to prepare size-tunable PLGA nanoparticles with high curcumin encapsulation for efficient mucus penetration. *Beilstein J Nanotechnol.* 2019;10:2280-2293. doi:10.3762/bjnano.10.220.

111. Kubitscheck U. *Fluorescence microscopy: From principles to biological applications*. Weinheim: Wiley-Blackwell; op. 2013.
112. *Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*. Wiley.
113. Bauch J, Rosenkranz R. *Physikalische Werkstoffdiagnostik: Ein Kompendium wichtiger Analytikmethoden für Ingenieure und Physiker*. 1. Auflage 2017. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017.
114. Abiad MG, Carvajal MT, Campanella OH. A Review on Methods and Theories to Describe the Glass Transition Phenomenon: Applications in Food and Pharmaceutical Products. *Food Eng Rev*. 2009;1(2):105-132. doi:10.1007/s12393-009-9009-1.
115. Datenblatt Power MOSFET IXFN360N15T2. <https://cdn-reichelt.de/documents/datenblatt/A200/IXFN360N15T2.pdf>.
116. Datenblatt Impulskondensator MKP10-250 220N. https://cdn-reichelt.de/documents/datenblatt/B300/WIMA_MKP_10.pdf.
117. Datenblatt Gate-Treiber Model UCC21520DWR. https://www.ti.com/lit/ds/symlink/ucc21520.pdf?HQS=dis-mous-null-mousermode-dsf-pf-null-ww&ts=1669394003145&ref_url=https%253A%252F%252Fwww.mouser.de%252F.
118. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
119. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-482. doi:10.1006/abbi.1993.1311.
120. Sack U. *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. Berlin, Boston: De Gruyter; 2015.
121. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1992;176(6):1693-1702. doi:10.1084/jem.176.6.1693.
122. Abdulwahab K, Malik MA, O'Brien P, et al. Synthesis of monodispersed magnetite nanoparticles from iron pivalate clusters. *Dalton Trans*. 2013;42(1):196-206. doi:10.1039/C2DT32478D.
123. Patterson JP, Robin MP, Chassenieux C, Colombani O, O'Reilly RK. The analysis of solution self-assembled polymeric nanomaterials. *Chem Soc Rev*. 2014;43(8):2412-2425. doi:10.1039/c3cs60454c.
124. Tønnesen HH, Karlsen J. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1985;180(5):402-404. doi:10.1007/BF01027775.
125. Friess W, Schlapp M. Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;63(2):176-187. doi:10.1016/j.ejpb.2005.11.007.
126. Desai PD. Thermodynamic Properties of Iron and Silicon. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 1986;15(3):967-983. doi:10.1063/1.555761.
127. Gupta NK, Dixit VK. Development and evaluation of vesicular system for curcumin delivery. *Arch Dermatol Res*. 2011;303(2):89-101. doi:10.1007/s00403-010-1096-6.

128. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337-351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
129. Park K, Otte A, Sharifi F, et al. Potential Roles of the Glass Transition Temperature of PLGA Microparticles in Drug Release Kinetics. *Mol Pharm*. 2021;18(1):18-32. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c01089.
130. Nappini S, Bombelli FB, Bonini M, Nordèn B, Baglioni P. Magnetoliposomes for controlled drug release in the presence of low-frequency magnetic field. *Soft Matter*. 2010;6(1):154-162. doi:10.1039/B915651H.
131. Yallapu MM, Gupta BK, Jaggi M, Chauhan SC. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *J Colloid Interface Sci*. 2010;351(1):19-29. doi:10.1016/j.jcis.2010.05.022.
132. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;363(1-2):26-39. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.018.
133. Yoo J, Won Y-Y. Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(11):6053-6062. doi:10.1021/acsbiomaterials.0c01228.
134. Uma B, Swaminathan TN, Radhakrishnan R, Eckmann DM, Ayyaswamy PS. Nanoparticle Brownian motion and hydrodynamic interactions in the presence of flow fields. *Phys Fluids (1994)*. 2011;23(7):73602-7360215. doi:10.1063/1.3611026.
135. Sanson C, Diou O, Thévenot J, et al. Doxorubicin loaded magnetic polymersomes: theranostic nanocarriers for MR imaging and magneto-chemotherapy. *ACS Nano*. 2011;5(2):1122-1140. doi:10.1021/nn102762f.
136. Shokrollahi H. A review of the magnetic properties, synthesis methods and applications of maghemite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2017;426:74-81. doi:10.1016/j.jmmm.2016.11.033.
137. Chereddy KK, Coco R, Memvanga PB, et al. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *J Control Release*. 2013;171(2):208-215. doi:10.1016/j.jconrel.2013.07.015.
138. Khalil NM, do Nascimento TCF, Casa DM, et al. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;101:353-360. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.06.024.
139. Senapati S, Mahanta AK, Kumar S, Maiti P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct Target Ther*. 2018;3:7. doi:10.1038/s41392-017-0004-3.
140. J. Keth. *Hydroxamic acid-functionalized Copolymers for Metal Chelation: From Monomer Development to Thermo-responsive Materials and Biomedical Applications*. [Dissertation]. Mainz: Johannes Gutenberg University; 2021.
141. Mahmoudi M, Laurent S, Shokrgozar MA, Hosseinkhani M. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell "vision" versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS Nano*. 2011;5(9):7263-7276. doi:10.1021/nn2021088.
142. Wassel RA, Grady B, Kopke RD, Dormer KJ. Dispersion of super paramagnetic iron oxide nanoparticles in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007;292(2-3):125-130. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.06.012.

143. Neilands JB. Hydroxamic acids in nature. *Science*. 1967;156(3781):1443-1447. doi:10.1126/science.156.3781.1443.
144. Schwarzenbach G, Schwarzenbach K. Hydroxamatkomplexe I. Die Stabilität der Eisen(III)-Komplexe einfacher Hydroxamsäuren und des Ferrioxamins B. *HCA*. 1963;46(4):1390-1400. doi:10.1002/hlca.19630460434.
145. Meißner D, Arndt T. Deferoxamin. In: Gressner AM, Arndt T, eds. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019:663-664. *Springer Reference Medizin*.
146. Stroh A, Zimmer C, Gutzeit C, et al. Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(8):976-984. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.016.
147. Naqvi S, Samim M, Abdin M, et al. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:983-989. doi:10.2147/IJN.S13244.
148. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int*. 2013;2013:942916. doi:10.1155/2013/942916.
149. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*. 1991;91(3):S31-S38. doi:10.1016/0002-9343(91)90281-2.
150. Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res*. 2005;592(1-2):119-137. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012.
151. Murphy K, Weaver C, eds. *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
152. Brittenham GM, Griffith PM, Nienhuis AW, et al. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *N Engl J Med*. 1994;331(9):567-573. doi:10.1056/NEJM199409013310902.
153. Bettencourt A, Almeida AJ. Poly(methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery. *J Microencapsul*. 2012;29(4):353-367. doi:10.3109/02652048.2011.651500.
154. Ali U, Karim KJBA, Buang NA. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polymer Reviews*. 2015;55(4):678-705. doi:10.1080/15583724.2015.1031377.
155. Chaurasiya S, Mishra V. Biodegradable nanoparticles as theranostics of ovarian cancer: an overview. *J Pharm Pharmacol*. 2018;70(4):435-449. doi:10.1111/jphp.12860.
156. Idrees H, Zaidi SZJ, Sabir A, Khan RU, Zhang X, Hassan S-U. A Review of Biodegradable Natural Polymer-Based Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(10). doi:10.3390/nano10101970.

Abbildungverzeichnis

Abbildung 1 Synthese von PLGA
Abbildung 2 Schematische Darstellung von superparamagnetischem Verhalten
Abbildung 3 Magnetfeld einer Zylinderspule mit magnetisierbarem Kern
Abbildung 4 Magnetfeld eines Magnetischen Kreises mit Luftspalt
Abbildung 5 Verhalten eines magnetischen Schwingkreises.
Abbildung 6 Spannungsverlauf im Schwingkreis
Abbildung 7 Verhalten eines Dipols in einem inhomogenen magnetischen Feld
Abbildung 8 Hydroxamsäure als Eisenkomplexbildner
Abbildung 9 Synthese von P(MMA-co-MAHA) mithilfe einer RAFT-Polymerisation. Abbildung erstellt durch Jenifer K■■■.
Abbildung 10 Änderung der Streulichtintensität über Zeit bei größeren und kleineren Partikeln in der dynamischen Lichtstreuung.
Abbildung 11 Darstellung der Transmissionselektronenmikroskopie im Vergleich zum Lichtmikroskop
Abbildung 12 Schematischer Aufbau eines SEM
Abbildung 13 A) schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops. B) Wellenlängen für den Filter Texas red, der zum Detektieren von Rhodamin B benutzt

Abbildung 14 Beispielhafter Aufbau einer DSC
Abbildung 15 prinzipieller Schaltplan der Magnetschaltung
Abbildung 16 vereinfachte graphische Darstellung der Schaltung des Magnetsystems
Abbildung 17 Aufteilungsstrategie für die Leukozyten am Beispiel von BMDC
Abbildung 18 TEM-Aufnahme von SPIONs mit einer Ölsäure Ummantelung
Abbildung 19 die Größenverteilung der SPIONs in Prozent in Bezug auf ihre Größe in nm (Aufgerundet).
Abbildung 20 Die Langevin-Funktion der VSM Messungen.
Abbildung 21 A DLS Daten aus Tabelle 4 und 5 als Größenverteilung dargestellt. Streulichtintensität gegen Partikelgröße
Abbildung 21 B DLS Daten aus Tabelle 4 und 5 als Größenverteilung dargestellt. Partikelanzahl gegen Partikelgröße.
Abbildung 22 PLGA-Partikel mit Uranylacetat gefärbt und mit Eisenoxidpartikeln beladen
Abbildung 23 Eine nähere Betrachtung der Partikel aus Abbildung 19 B)
Abbildung 24 A) und B) PLGA-Partikel mit Uranylacetat angefärbt und mit Eisenoxid und Curcumin beladen. Beide mit einer Skalierung von 1 μm .
Abbildung 25 Eine nähere Betrachtung der Partikel aus Abbildung 21.
Abbildung 26 PLGA-Partikel mit Uranylacetat gefärbt und mit Eisenoxidpartikeln beladen.

Abbildung 27 Cluster von SPIONs verteilt auf PLGA-Partikel. Beide mit einer Skalierung von 200 nm.
Abbildung 28 PLGA-Partikel mit Uranylacetat gefärbt und mit Eisenoxid und Curcumin beladen. Beide mit einer Skalierung von 500 nm.
Abbildung 29 Eine nähere Betrachtung der Partikel.
Abbildung 30 SEM-Aufnahmen der PLGA Partikel mit 2 % PVA.
Abbildung 31 SEM-Aufnahmen der PLGA Partikel mit 1 % PVA
Abbildung 32 Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin B-gelabelten PLGA-Partikeln beladen mit Curcumin und hergestellt in einer 2 % PVA-Lösung.
Abbildung 33 Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin B-gelabelten PLGA-Partikeln beladen mit Curcumin und SPIONs und hergestellt in einer 2% PVA-Lösung
Abbildung 34 Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin B-gelabelten PLGA-Partikeln beladen mit Curcumin und hergestellt in einer 1% PVA-Lösung
Abbildung 35 Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin B-gelabelten PLGA-Partikeln beladen mit Curcumin und SPIONs und hergestellt in einer 1% PVA-Lösung.
Abbildung 36 Differentialkalorimetrie Standard
Abbildung 37 Differentialkalorimetrie Big
Abbildung 38 Der Oszillator angeschlossen an das magnetische Impulssystem
Abbildung 39 Der Oszillator angeschlossen an das magnetische Impulssystem
Abbildung 40 Der Oszillator angeschlossen an das magnetische Impulssystem

Abbildung 41 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat in Wasser.

Abbildung 42 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat und 1 % Hydroxyethylcellulose in Wasser.

Abbildung 43 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat in Wasser. Die Partikel wurden zusätzlich

Abbildung 44 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat in Wasser.

Abbildung 45 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat und 1 % Hydroxyethylcellulose in Wasser.

Abbildung 46 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat in Wasser. Die Partikel wurden zusätzlich

Abbildung 47 Die Freisetzung von Curcumin aus magnetischen PLGA-Partikeln in einem Medium aus 2 % Natriumlaurylsulfat und 1 % Hydroxyethylcellulose in Wasser.

Abbildung 48 Links reines PMMA, wie es durch die Strukturanalyse bestätigt vorlag. Rechts Struktur von PMMAHA als modifiziertes Monomer.

Abbildung 49. A.) Daten aus der Größenausschlusschromatographie für das Polymer 0 % HA B.) Daten aus der Größenausschlusschromatographie für das Polymer 10 %

Abbildung 50 Größenverteilung der PMMA-Partikel. A) 0% HA (Hydroxamsäuremonomer) B) 5% HA C) 10% HA

Abbildung 51 Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop von Nanopartikeln, hergestellt aus reinem PMMA

Abbildung 52 Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop von Nanopartikeln, hergestellt aus P(MMA-co-MAHA) mit 5 % MAHA Anteil.

Abbildung 53 Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop von Nanopartikeln, hergestellt aus P(MMA-co-MAHA) mit 10 % MAHA Anteil.

Abbildung 54 A) PMMA Partikel mit SPIONs beladen Skalierung 200 bzw. 100 nm. B) PLGA-Partikel mit Eisen beladen und mit Uranylacetat gefärbt.

Abbildung 55 A) P(MMA-co-MAHA) Partikel mit 5% MAHA Anteil und mit SPIONs beladen Skalierung 200 nm. B) P(MMA-co-MAHA) Partikel mit 10% MAHA Anteil.
Abbildung 56 Partikel mit 10 % MAHA Anteil und mit SPIONs beladen Skalierung 100 nm.
Abbildung 57 Aufnahmen mit einem STEM-Filter im Dunkelfeld von PMMA und P(MMA-co-MAHA) Partikeln.
Abbildung 58 (Blau) Die Einschlusseffizienz an inkludiertem Eisen bezogen auf die eingesetzte gesamte Eisenmenge in Bezug auf variierende
Abbildung 59 Die mitochondriale Aktivität gemessen an der Absorption aus Farmazan für die verschiedenen Polymerpartikelarten bei steigenden Konzentrationen
Abbildung 60 mit FVD markierte neutrophile Knochenmarkzellen
Abbildung 61 schematisch dargestellte Herstellung von Polymerpartikel mit und ohne MAHA.
Abbildung 62 bis 69 (Anhang) Zellsortierung auf Fluoreszenzbasis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung der Vorgehensweise bei der Herstellung von PLGA-Partikeln
Tabelle 2 Verwendete Ausgangsstoffe für die Synthese von Rhodamin B-gelabelten PLGA.
Tabelle 3 Daten aus den DLS-Messungen der PLGA-Partikel „Standard“ im Durchschnitt. Partikel, die mit einer 2 % PVA-Lösung hergestellt wurden mit Ihren
Tabelle 4 Daten aus den DLS-Messungen der PLGA-Partikel „BIG“ im Durchschnitt. Partikel, die mit einer 1 % PVA-Lösung hergestellt wurden mit Ihren unterschiedlichen

Tabelle 4 Daten aus den DLS-Messungen der PLGA-Partikel „BIG“ im Durchschnitt. Partikel, die mit einer 1 % PVA-Lösung hergestellt wurden mit Ihren unterschiedlichen

Tabelle 5 Die durchschnittlichen Partikeldurchmesser gemessen mit dynamischer Lichtstreuung der verschiedenen PMMA-Partikelarten. Angaben als

Tabelle 6 SPION-Beladung in Polymer-Partikeln als theoretischer Wert nach der Verdünnung, die gemessene Eisenbeladung, prozentuale Einschlusseffizienz an Eisen

Tabelle 7 Durchschnittliche Fluoreszenzintensität der verschiedenen untersuchten Zelltypen, nachdem sie mit Partikeln inkubiert wurden.

Anhang:

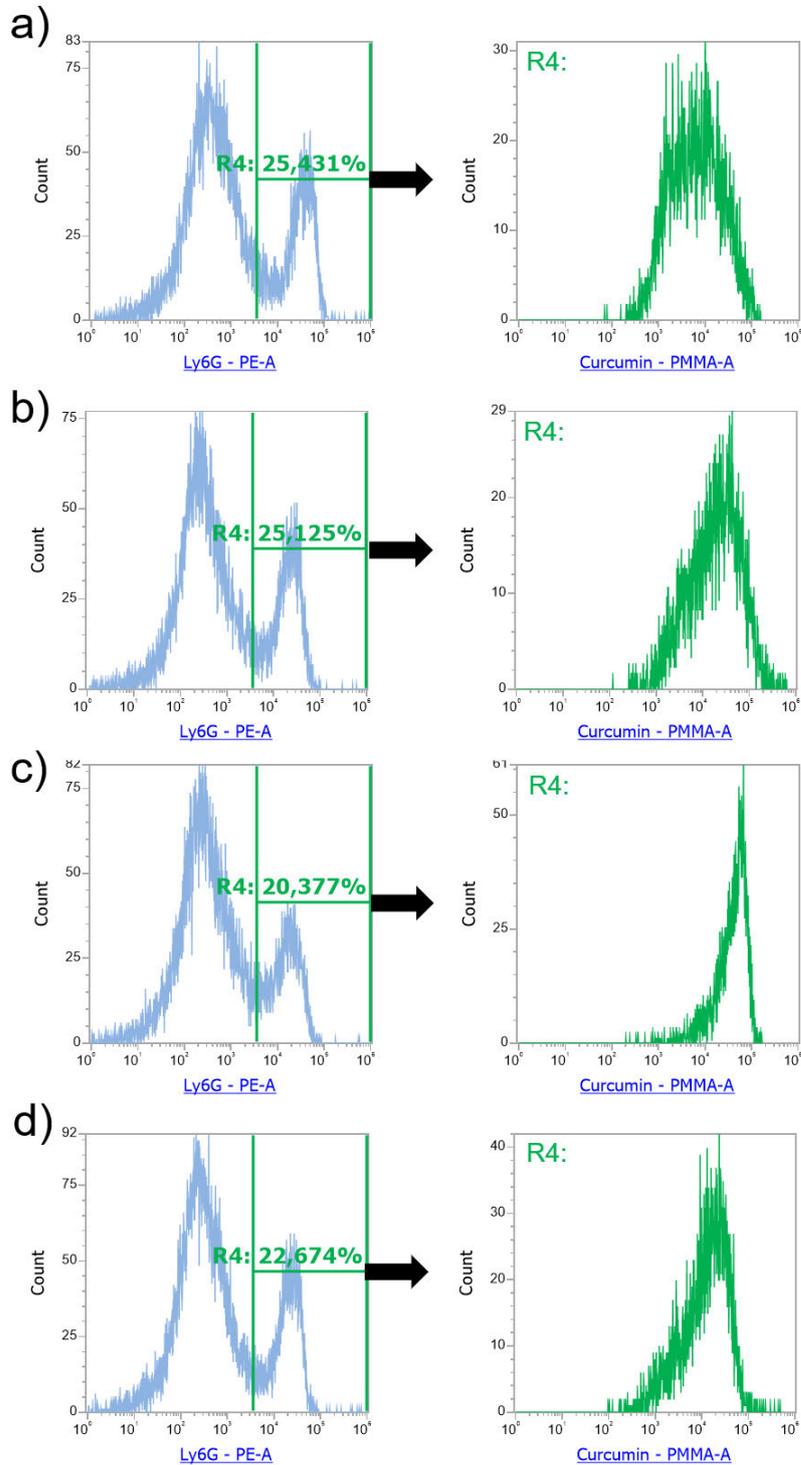


Abbildung 62 Zellsortierung auf Fluoreszenzbasis (Frequenzen links dargestellt) von neutrophilen Knochenmarkszellen ($Ly6G^+$). Die Zellen wurden über Nacht mit Curcumin markierten Partikeln (Curcuminintensitäten rechts dargestellt) inkubiert, die aus reinem PMMA (a,c) und aus 5% MAHA-Anteil $P(MMA-coMAHA)$ (b,d) bestanden. Die Partikel wurden ohne SPIONs (a,b) und mit SPIONs (c,d) verwendet, wobei die Partikelsuspension 5%_{vol} des gesamten Mediums ausmacht.

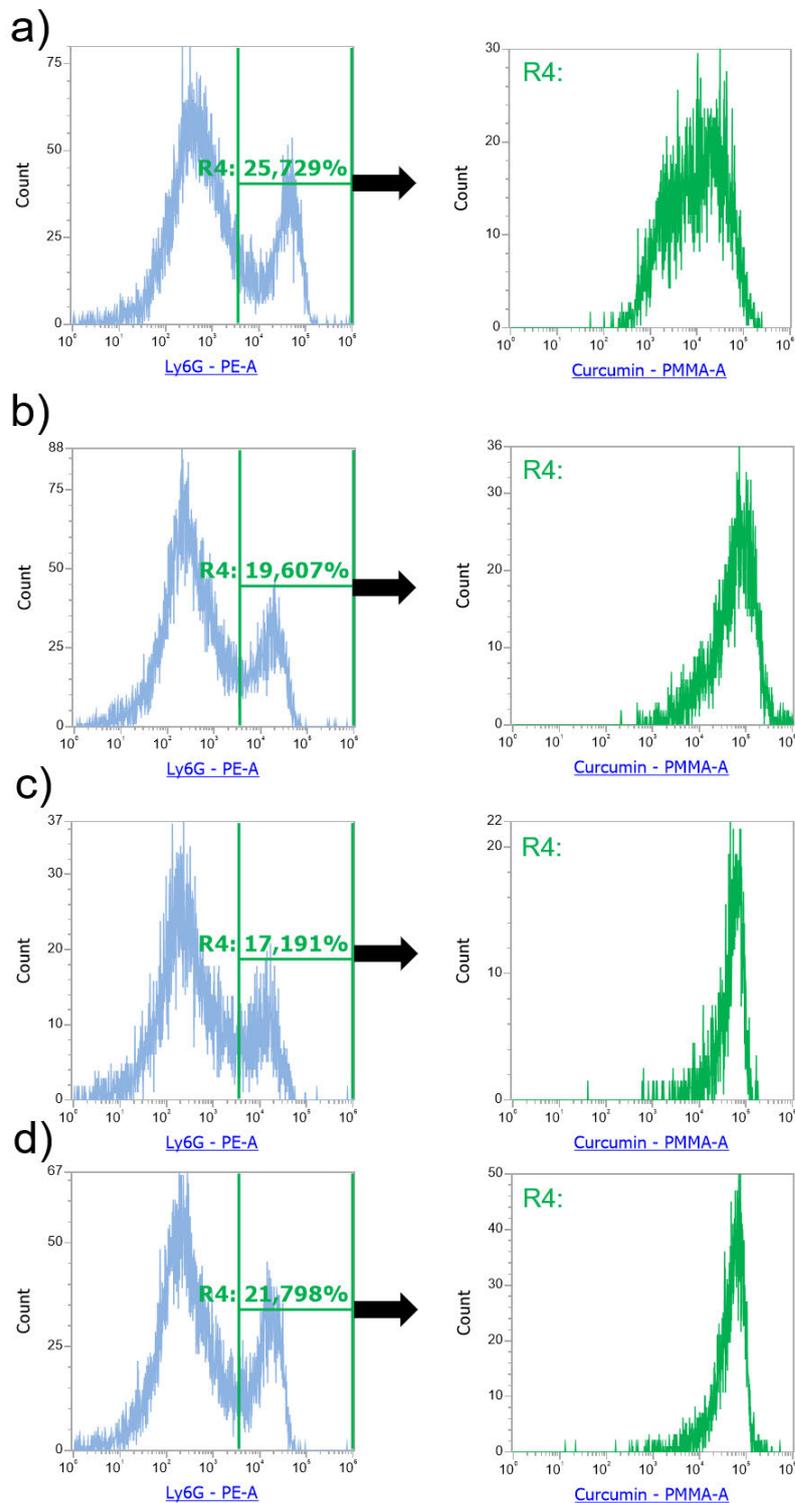


Abbildung 63 Zellsortierung auf Fluoreszenzbasis (Frequenzen links dargestellt) von neutrophilen Knochenmarkzellen (Ly6G⁺). Die Zellen wurden über Nacht mit Curcumin markierten Partikeln (Curcuminintensitäten rechts dargestellt) inkubiert, die aus reinem PMMA (a,c) und aus 5% MAHA-Anteil P(MMA-coMAHA) (b,d) bestanden. Die Partikel wurden ohne SPIONs (a,b) und mit SPIONs (c,d) verwendet, wobei die Partikelsuspension 50%_{vol} des gesamten Mediums ausmacht.

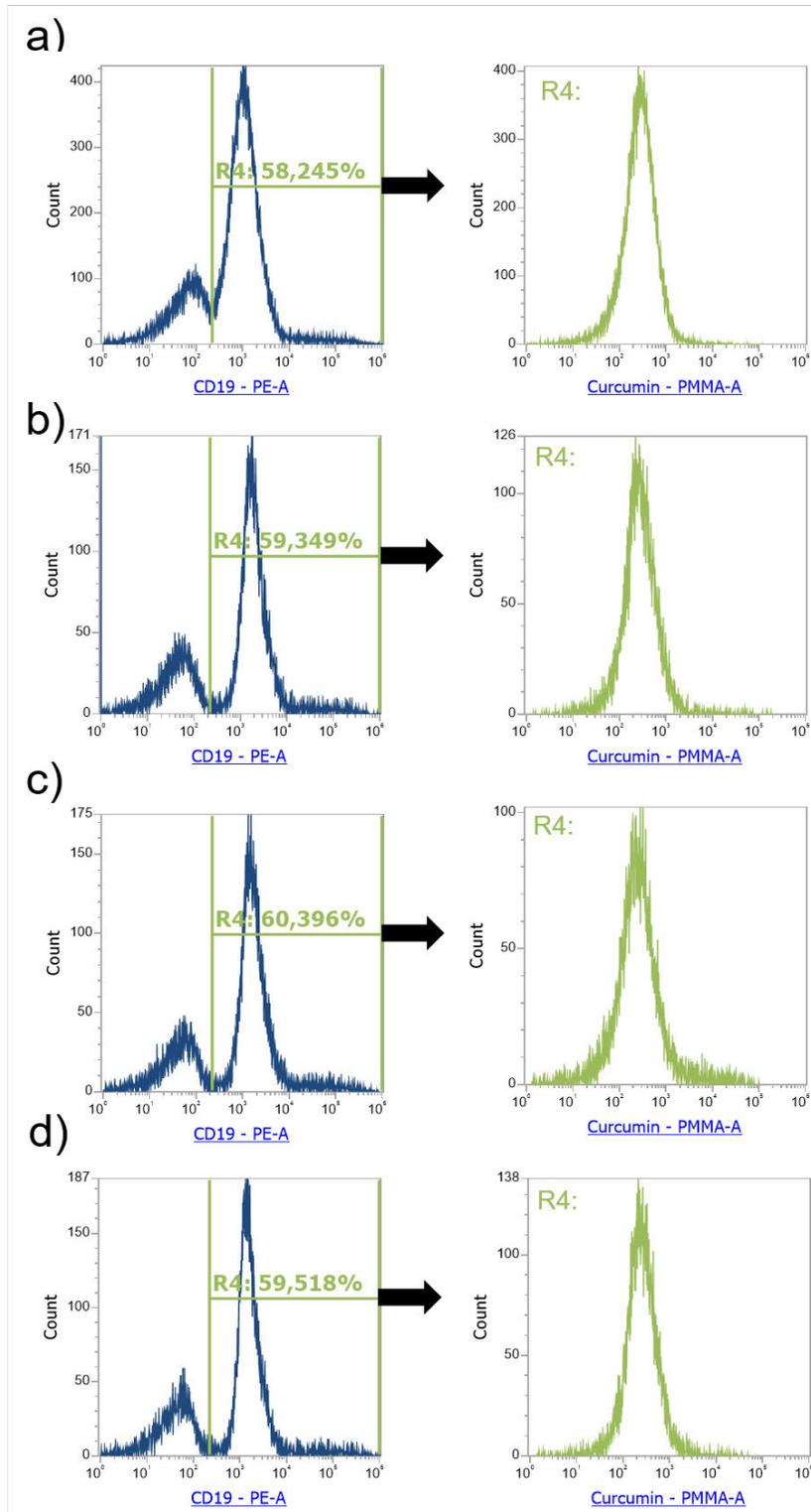


Abbildung 64 Zellsortierung auf Fluoreszenzbasis (Frequenzen links dargestellt) von B-Zellen ($CD19^+$) aus der Milz des Typs $Ly6G^+$. Die Zellen wurden über Nacht mit Curcumin markierten Partikeln (Curcuminintensitäten rechts dargestellt) inkubiert, die aus reinem PMMA (a,c) und aus 5% MAHA-Anteil $P(MMA-coMAHA)$ (b,d) bestanden. Die Partikel wurden ohne SPIONs (a,b) und mit SPIONs (c,d) verwendet, wobei die Partikelsuspension 5%_{vol} des gesamten Mediums ausmacht.

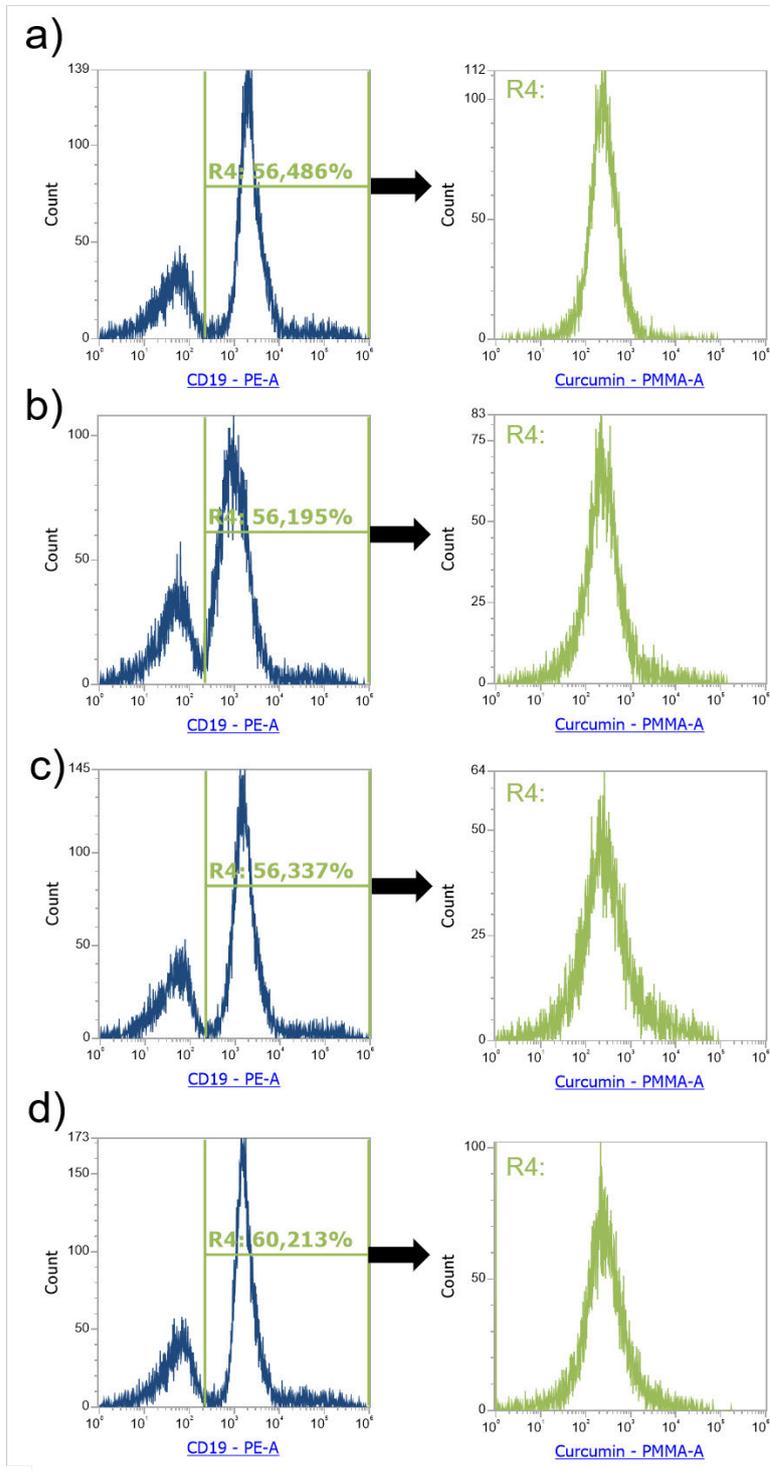


Abbildung 65 Zellsortierung auf Fluoreszenzbasis (Frequenzen links dargestellt) von B-Zellen ($CD19^+$) aus der Milz des Typs $Ly6G^+$. Die Zellen wurden über Nacht mit Curcumin markierten Partikeln (Curcuminintensitäten rechts dargestellt) inkubiert, die aus reinem PMMA (a,c) und aus 5% MAHA-Anteil $P(MMA-coMAHA)$ (b,d) bestanden. Die Partikel wurden ohne SPIONs (a,b) und mit SPIONs (c,d) verwendet, wobei die Partikelsuspension 50%_{vol} des gesamten Mediums ausmacht.

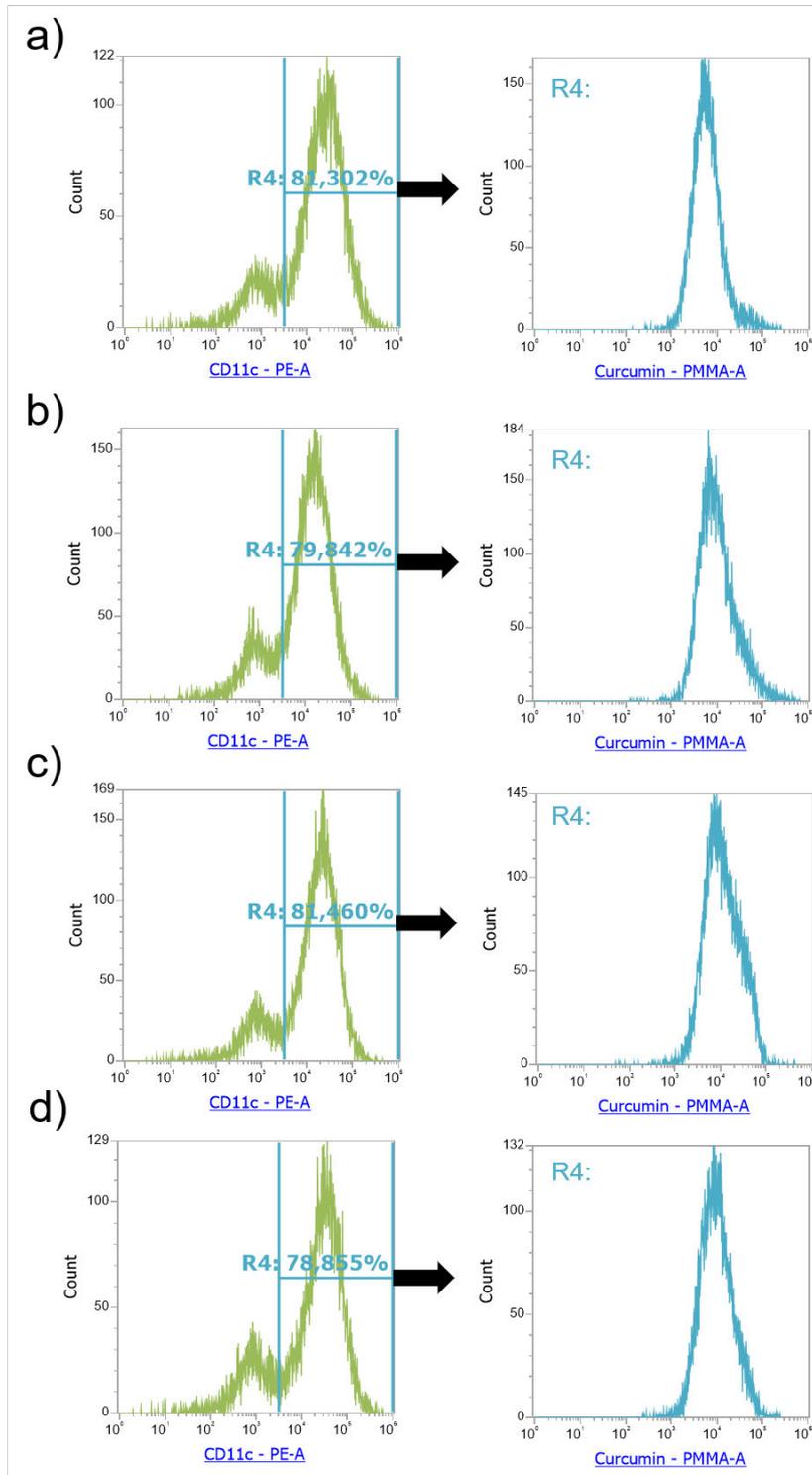


Abbildung 66 Zellsortierung auf Fluoreszenzbasis (Frequenzen links dargestellt) von dendritischen Knochenmarkszellen (CD11c⁺). Die Zellen wurden über Nacht mit Curcumin markierten Partikeln (Curcuminintensitäten rechts dargestellt) inkubiert, die aus reinem PMMA (a,c) und aus 5% MAHA-Anteil P(MMA-coMAHA) (b,d) bestanden. Die Partikel wurden ohne SPIONs (a,b) und mit SPIONs (c,d) verwendet, wobei die Partikelsuspension 5%_{vol} des gesamten Mediums ausmacht.

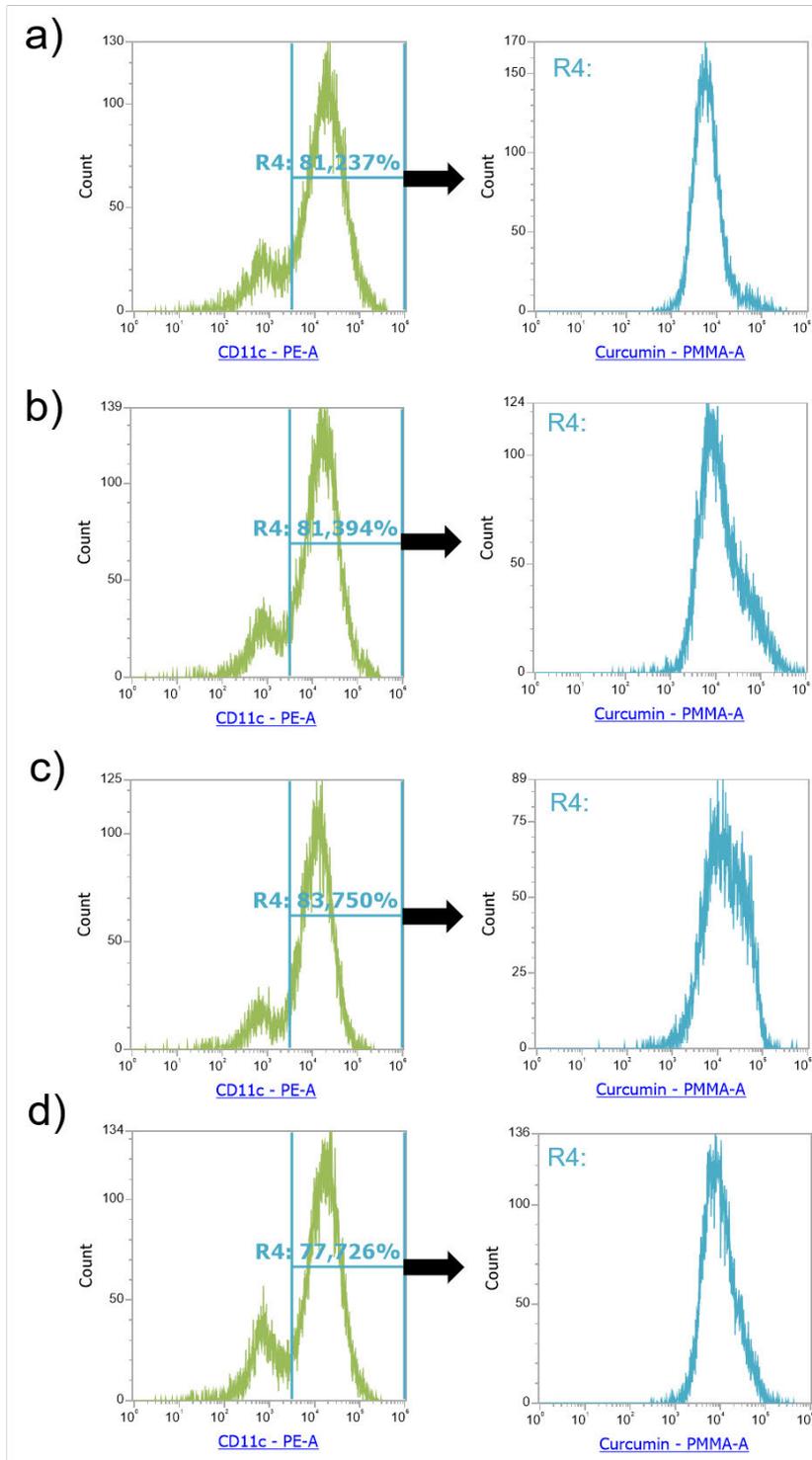


Abbildung 67 Zellsortierung auf Fluoreszenzbasis (Frequenzen links dargestellt) von dendritischen Knochenmarkszellen des Typs CD11c⁺. Die Zellen wurden über Nacht mit Curcumin markierten Partikeln (Curcuminintensitäten rechts dargestellt) inkubiert, die aus reinem PMMA (a,c) und aus 5% MAHA-Anteil P(MMA-coMAHA) (b,d) bestanden. Die Partikel wurden ohne SPIONs (a,b) und mit SPIONs (c,d) verwendet, wobei die Partikelsuspension 50%_{vol} des gesamten Mediums ausmacht.

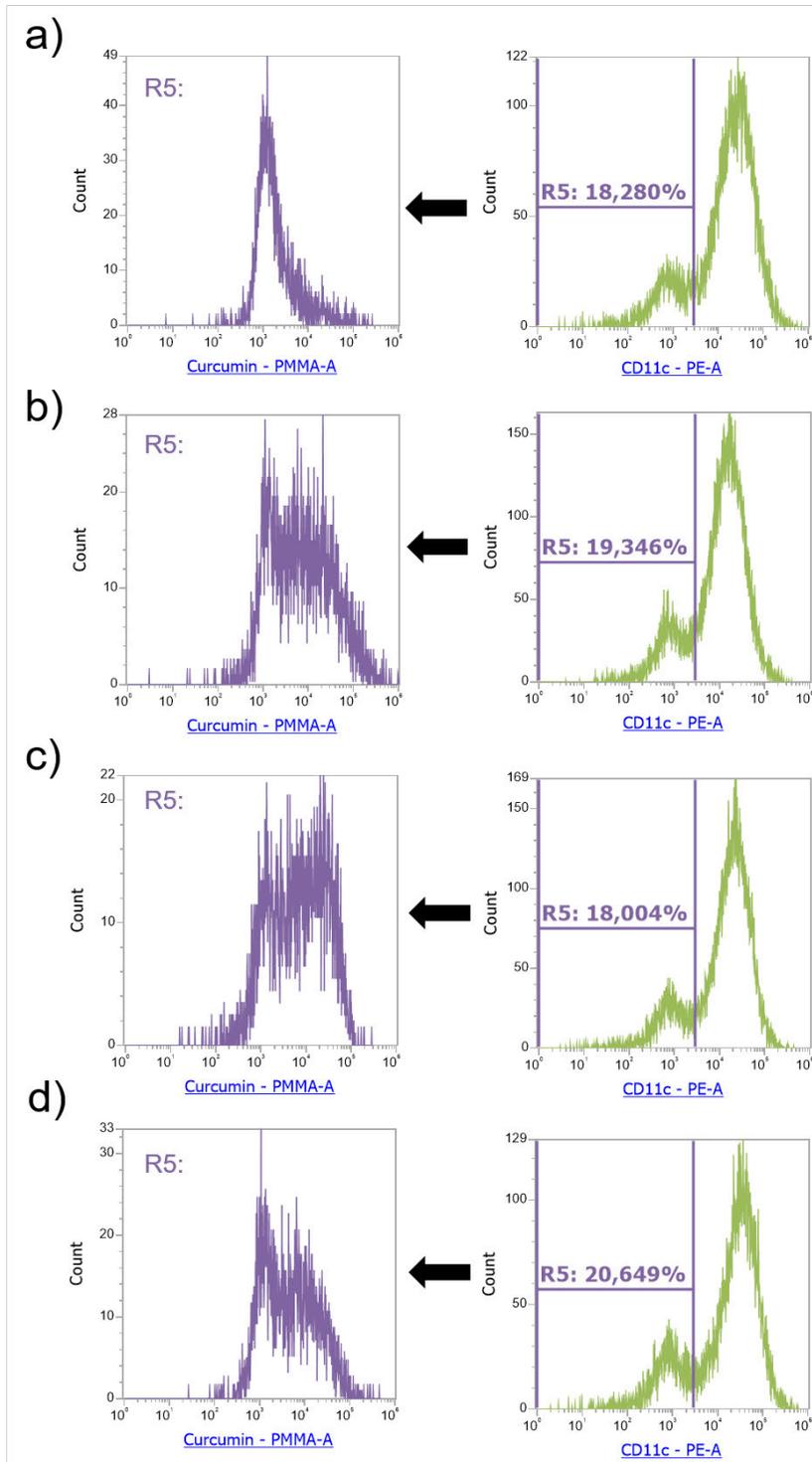


Abbildung 68 Zellsortierung auf Fluoreszenzbasis (Frequenzen rechts dargestellt) von Makrophagen ($CD11b^+$, $CD11c$) aus Knochenmark. Die Zellen wurden über Nacht mit Curcumin markierten Partikeln (Curcuminintensitäten links dargestellt) inkubiert, die aus reinem PMMA (a,c) und aus 5% MAHA-Anteil $P(MMA-coMAHA)$ (b,d) bestanden. Die Partikel wurden ohne SPIONs (a,b) und mit SPIONs (c,d) verwendet, wobei die Partikelsuspension 5%_{v/v} des gesamten Mediums ausmacht.

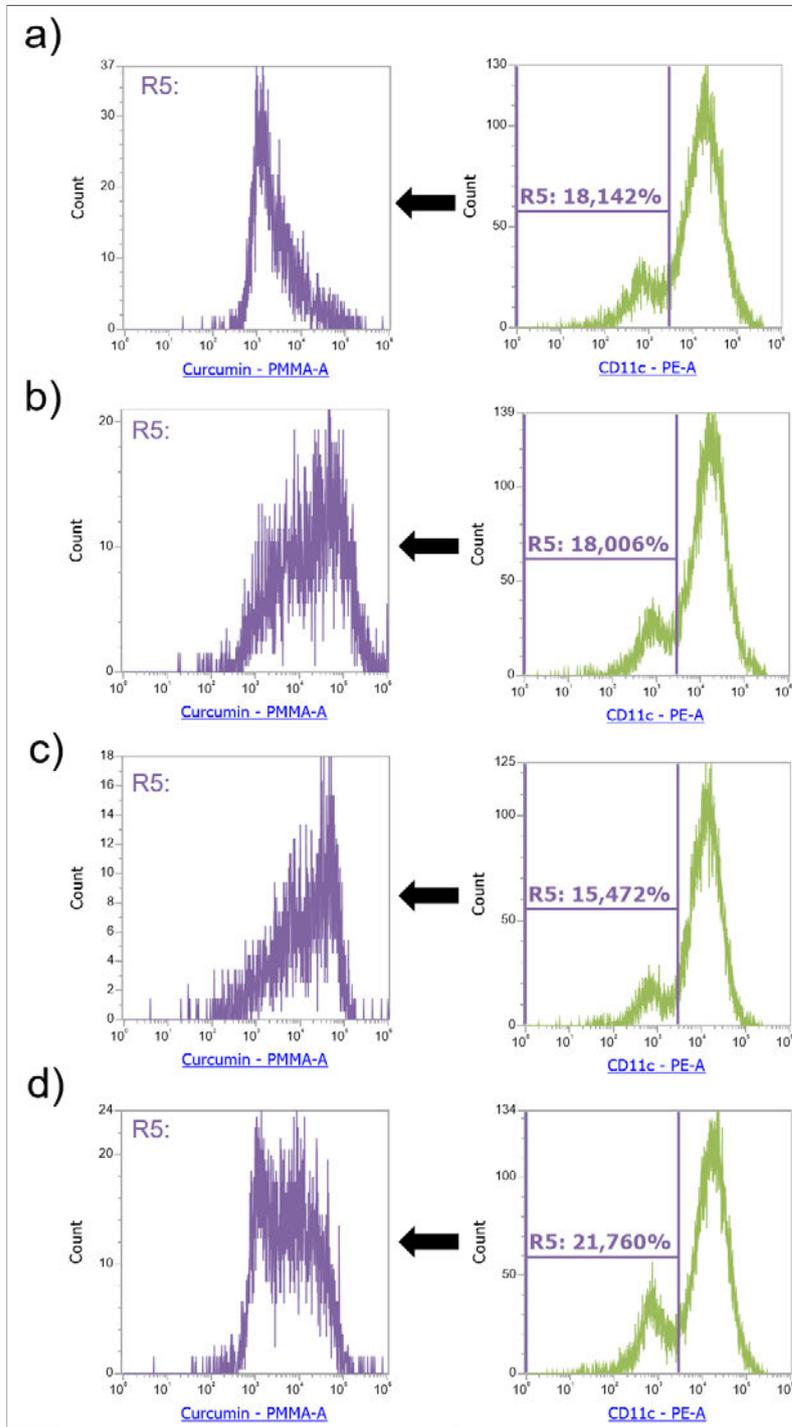


Abbildung 69 Zellsortierung auf Fluoreszenzbasis (Frequenzen rechts dargestellt) von Makrophagen (CD11b⁺, CD11c) aus Knochenmark. Die Zellen wurden über Nacht mit Curcumin markierten Partikeln (Curcuminintensitäten links dargestellt) inkubiert, die aus reinem PMMA (a,c) und aus 5% MAHA-Anteil P(MMA-coMAHA) (b,d) bestanden. Die Partikel wurden ohne SPIONs (a,b) und mit SPIONs (c,d) verwendet, wobei die Partikelsuspension 50%_{vol} des gesamten Mediums ausmacht.