

Nanopartikel und Quantenpunkte als potentielle Vehikel zur Darstellung der Nierenfunktion

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)



der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mirjam Englert
aus Eggenfelden

Dezember 2009

Nanopartikel und Quantenpunkte als potentielle Vehikel zur Darstellung der Nierenfunktion

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)



der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mirjam Englert
aus Eggenfelden

Dezember 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.12.2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Ralph Witzgall

Abkürzungsverzeichnis.....1**1. Einleitung5**

1.1	Struktur und Histologie der Niere	5
1.1.1	Baueinheiten der Niere	5
1.1.2	Filtration in den Nierenkörperchen	6
1.1.3	Resorption und Exkretion im Tubulussystem	9
1.1.4	Sammelrohre	9
1.1.5	Blutversorgung der Niere	13
1.2	Molekulare Bildgebung.....	14
1.2.1	Grundlagen der molekularen Bildgebung	14
1.2.2	Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	16
1.2.3	Kernspinresonanz (NMR)	18
1.2.4	Fluoreszenz.....	21
1.3	Nanotechnologie.....	25
1.3.1	Nanopartikel	25
1.3.2	Quantenpunkte	27
1.3.3	Risiken der Nanotechnologie	29

2. Material und Methoden30

2.1	Material	30
2.1.1	Chemikalien und Pharmaka	30
2.1.2	Einmalartikel	31
2.1.3	Instrumente.....	31
2.1.4	Geräte	31
2.1.5	Lösungen	32

2.1.6	Dialyseschläuche	33
2.2	Katheterisierung der Ratten	34
2.2.1	Auswahl der Tiere	34
2.2.2	Anästhesie	34
2.2.3	Lagerung, Fixierung und Materialvorbereitung	35
2.2.4	Präparation	36
2.2.5	Katheterisierung	37
2.2.6	Entfernen des Katheters und Nachbereitung	38
2.3	Organentnahme	38
2.4	Versuchsreihe mit Nanopartikeln	40
2.4.1	Verdünnungsreihe	40
2.4.2	Verhalten der Nanopartikel bei Zentrifugation	41
2.4.3	Zentrifugation der Nanopartikel in Harnstoffverdünnungen	43
2.4.4	Zentrifugation der Nanopartikel in Nierenlysat	45
2.4.5	Beeinflussung der Ergebnisse durch technische Verfahren	50
2.4.6	Systemische i.v.-Injektion der Nanopartikel in Ratten	51
2.4.7	Anfertigung von Gefrierschnitten	53
2.5	Versuchsreihe mit Quantenpunkten	55
2.5.1	Verdünnungsreihe	55
2.5.2	Verhalten der Quantenpunkte bei Zentrifugation	56
2.5.3	Systemische i.v.-Injektion der Quantenpunkte in Ratten	56
2.5.4	Bestimmung der Abklingzeiten der Fluoreszenz von Quantenpunkten	57
2.5.5	Bestimmung von Emissionsspektren	57
3.	Ergebnisse	59
3.1	Ergebnisse der Versuchsreihe mit Nanopartikeln	59
3.1.1	Verdünnungsreihe	59

3.1.2	Verhalten der Nanopartikel bei Zentrifugation	60
3.1.3	Zentrifugation der Nanopartikel in Harnstoffverdünnungen	62
3.1.4	Zentrifugation der Nanopartikel in Nierenlysat	64
3.1.5	Beeinflussung der Ergebnisse durch technische Verfahren	70
3.1.6	Systemische i.v.-Injektion der Nanopartikel in Ratten	72
3.1.7	Gefrierschnitte	80
3.2	Ergebnisse der Versuchsreihe mit Quantenpunkten.....	83
3.2.1	Verdünnungsreihe	83
3.2.2	Verhalten der Quantenpunkte bei Zentrifugation.....	85
3.2.3	Systemische i.v.-Injektion der Quantenpunkte in Ratten	86
3.2.4	Bestimmung der Abklingzeiten der Fluoreszenz von Quantenpunkten.....	88
3.2.5	Bestimmung von Emissionsspektren	90
4.	Diskussion.....	94
4.1	Fluorimetrischer Nachweis	94
4.1.1	Nanopartikel	94
4.1.2	Quantenpunkte	98
4.2	Anwendung in der molekularen Bildgebung	101
4.2.1	Chemisch-physikalische Modifizierbarkeit der Nanomaterialien.....	101
4.2.2	Verhalten der Nanomaterialien im Körper.....	103
4.2.3	Methoden zur Nutzung der Technologie.....	106
5.	Zusammenfassung	110
6.	Literaturverzeichnis	112

7. Anhang.....127

7.1	Eidesstattliche Erklärung.....	127
7.2	Lebenslauf	128
7.3	Danksagung	129

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ADH	antidiuretisches Hormon
a_r	Betrag der Zentrifugalbeschleunigung
ATP	Adenosintriphosphat
B	Bronchioli
B_0	statisches Magnetfeld
β^+	Positron
bar	Bar
bzw.	beziehungsweise
c	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum ($c \approx 3 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$)
C	Kohlenstoff
C	Milzkapsel
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CdSe	Cadmium-Selenid
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Energie
E	Zehnerpotenzen
e	Eulersche Zahl
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
et al.	und andere (et alii)
F	Fluor
f	Frequenz in Hertz
FDG	^{18}F luorodesoxyglukose
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging
FWHM	Full Width at Half Maximum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung ($g \approx 9,81 \text{ m s}^{-2}$)
G	Nierenkörperchen (Glomerulus)
γ	gyromagnetischer Faktor
GaAs	Gallium-Arsenid
Ge	Germanium
GFP	grün fluoreszierendes Protein (Green fluorescent protein)
H	Wasserstoff
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H_2O (bidest)	(zweifach destilliertes) Wasser
ICG	Indocyaningrün (Indocyanine green)
K	Kalium
K	Keimzentrum
kD	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
l	Liter
L_0	nanoskopische Grenze
L_X, L_Y und L_Z	Vektoren im Raum
λ	Wellenlänge
M	Molar
M	Magnetisierungsvektor
m	Masse
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar

mm	Millimeter
μm	Mikrometer
mosm	Milliosmol
μs	Mikrosekunde
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
Neg.-Kontrolle	Negativkontrolle
NIR	infrarotnah (near infrared)
nm	Nanometer
NMR	Magnetresonanz (Nuclear magnetic resonance)
NP	Nanopartikel
ns	Nanosekunde
NTOF	Non-time-of-flight-Methode
O	Sauerstoff
ω	Winkelgeschwindigkeit
ω_{Larmor}	Larmorfrequenz
P	Phosphor
PAN, PAN-COOH	Polyacrylnitril (Copolymer aus 95% Acrylonitril und 5% Acrylsäure)
PAS	Perjodsäure-Schiff-Färbung (Periodic acid-Schiff)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PD, PD-COOH	Polymererivat (Copolymer aus 98% Methacrylonitril, 1% Divinylbenzol und 1% Acrylsäure)
PEG	Polyethylenglykol
PEG-NH ₂ , PEG-OH	aminoterminiertes bzw. hydroxyterminiertes Polyethylenglycol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus Hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration)
Pos.-Kontrolle	Positivkontrolle
PS	Polystyrol

PtTFPP, Pt	Platin-5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6)-pentafluorophenyl-porphyrin (Fluoreszenzfarbstoff)
QP	Quantenpunkte
r	Radius
R	Pearson'scher Korrelationskoeffizient
R	Randwall
R ²	Bestimmungsmaß
r. M.	rote Milzpulpa
rpm	revolutions per minute
Ru(dpp) ₃ ²⁺	Ruthenium-tris-(1,10-diphenylphenanthrolin) (Fluoreszenzfarbstoff)
s	Sekunde
s.	siehe
S _x	Singulettzustände
SDS	Natriumdodecylsulfat
Si	Silizium
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
T	Tubuli
T _x	Tripletzustände
Tab.	Tabelle
TOF	Time-of-flight-Methode
US	Ultraschall
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volumen
V.	Vena
V.c.	Vena centralis
VIS-Licht	sichtbares Licht
Vv.	Venae
w/w	Massenverhältnis (weight per weight)
ZnS	Zinksulfid

1. Einleitung

1.1 Struktur und Histologie der Niere

1.1.1 Baueinheiten der Niere

Die Nieren spielen eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel des Organismus. Zu ihren vielfältigen Aufgaben zählen die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und Fremdstoffen, die Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie des Säure-Basen-Gleichgewichtes und die Blutdruckkontrolle. Die paarigen, retroperitoneal gelegenen Nieren wiegen beim erwachsenen Menschen je ca. 120 bis 200 g und sind von einer derben bindegewebigen Organkapsel, der Capsula fibrosa, überzogen. Am medialen Rand findet sich das Hilum renale, wo Nierengefäße, Nerven, Lymphgefäße und Ureter ein- bzw. austreten. Das Hilum renale setzt sich in den Sinus renalis fort, der zusätzlich zu den Leitungsstrukturen mit Fettgewebe ausgefüllt ist [Schiebler 2005]. Den Ursprung des Ureters bildet das Nierenbecken, Pelvis renalis, wo der über die Nierenkelche ablaufende Harn gesammelt wird. In der menschlichen Niere kann man meist sieben bis neun gleichartige Nierenlappen voneinander abgrenzen, die jeweils aus Mark und Rinde bestehen. Einen Überblick über den Aufbau der Niere zeigt Abbildung 1. Die Nieren von kleinen Säugern wie der Ratte weisen die gleichen Bauelemente auf, besitzen allerdings nur einen Nierenlappen [Welsch 2003].

Das Nierenmark wird von den sogenannten Markpyramiden gebildet, deren Spitzen, Papillae renales, in die Nierenkelche ragen. Von hier aus läuft der Endharn in die Nierenkelche. Die Basen der Pyramiden sind nach außen gerichtet und entsenden jeweils etwa 400 bis 500 Markstrahlen in das darüber liegende Rindengewebe [Junqueira 2005]. Innerhalb der Pyramiden lassen Struktur und Anordnung der verschiedenen Nierentubuli eine Innen- und Außenzone erkennen [Welsch 2003].

Die Nierenrinde liegt direkt unter der Organkapsel und wird durch die über das Mark hinausreichenden Markstrahlen in kleinere Läppchen unterteilt. Dieser Bereich der Rinde wird als Nierenlabyrinth bezeichnet. Ein weiterer Teil der Rinde setzt sich zwischen den

Markpyramiden als Nierensäulen (Columnae renales, Bertini-Säulen) nach innen fort und reicht somit bis an den Sinus renalis heran [Welsch 2003].

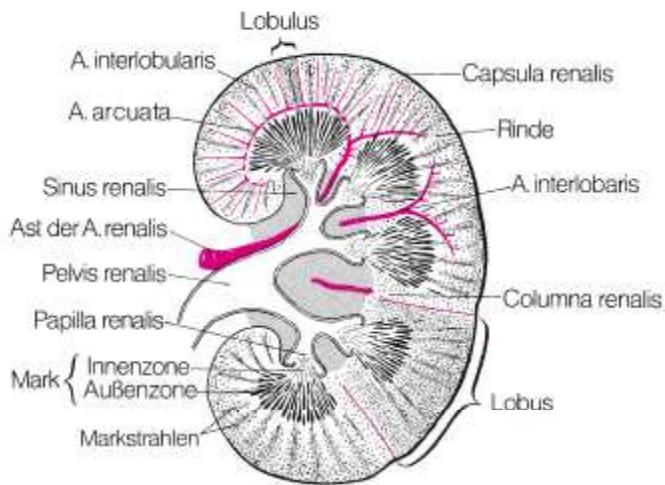


Abb. 1: Frontalschnitt durch eine Niere. Gezeigt sind die Bauelemente der Niere mit Mark und Rinde sowie der Verlauf der wichtigsten Blutgefäße [aus Schiebler 2005].

Die architektonische Grundeinheit der Niere sind die Nephrone, von denen es beim Menschen pro Niere etwa 1,2 Millionen gibt. Zu jedem Nephron gehören ein im Rindenlabyrinth gelegenes Nierenkörperchen (Malpighi-Körperchen) und das davon ausgehende unverzweigte Nierenkanälchen, der Tubulus renalis. Die Nierenkörperchen bestehen aus der sogenannten Bowman-Kapsel und einem Kapillarknäuel im Inneren der Kapsel, dem Glomerulus [Welsch 2003]. Entwicklungsgeschichtlich abzugrenzen von den Nephronen sind die Sammelrohre, die von der Rinde bis in das Mark reichen. In ein Sammelrohr münden die Tubuli von etwa acht bis zehn Nephronen. Die Endstrecken der Sammelrohre werden als Ductus papillares bezeichnet, von denen 10 bis 20 als Öffnungen die Oberfläche der Papillae renales durchsetzen [Junqueira 2005]. Hier wird der Endharn in die Nierenkelche abgegeben, von wo aus er weiter ins Nierenbecken läuft.

1.1.2 Filtration in den Nierenkörperchen

Am Beginn eines jeden Nephrons liegt ein Nierenkörperchen mit einem Durchmesser von ca. 0,2 mm, in dem die Ultrafiltration des Blutes erfolgt. Frei filtriert werden dabei Wasser und alle anderen gelösten Stoffe bis zu einem Molekulargewicht von ca. 5 kD, was einem

Moleküldurchmesser von etwa 2,5 nm entspricht. Blutzellen und größere Proteine werden zurückgehalten, wobei die Durchlässigkeit für positiv geladene Moleküle besser ist als für negativ geladene. Auf diese Weise werden pro Tag etwa 180 l Primärharn filtriert [Junqueira 2005]. Das Blut durchläuft eine zu- und eine abführende Arteriole, die den Gefäßpol des Nierenkörperchens bilden, und das dazwischen liegende Kapillarknäuel. Die Kapillarwände bestehen aus einem dünnen Endothel mit Fenestrationen, die nicht von Diaphragmen bedeckt werden. Da der Porendurchmesser mit 70 bis 90 nm sehr groß ist, können hier lediglich Blutzellen zurückgehalten werden. Dem Endothel anliegend findet sich eine mit ca. 0,3 µm relativ dicke Basalmembran, die eine Dreischichtung aufweist. Die mittlere Schicht ist eine Lamina densa, die aus Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronektin besteht. Sie dient als mechanischer Filter. Auf beiden Seiten legt sich eine Lamina rara an, die negativ geladenes Heparansulfat enthält. Dadurch stößt sie polyanionische Plasmaproteine ab und stellt möglicherweise deren wesentliche Filtrationsbarriere dar. Insgesamt kommt dadurch eine effektive Porenweite von etwa 2 bis 3 nm zustande, was Molekülgrößen von 20 bis 30 kD entspricht [Schiebler 2005]. Abbildung 2A verdeutlicht den Aufbau des gesamten glomerulären Filters.

Indem sich das Kapillarknäuel in die Bowman-Kapsel einstülpt, entstehen ein viszerales, dem Glomerulus aufliegendes, und ein äußeres parietales Blatt der Kapsel. Das innere Blatt wird von den sogenannten Podozyten gebildet. Diese stark verzweigten Deckzellen umgreifen mit ihren primären und sekundären Fortsätzen die Glomeruluskapillaren und sind mit den entsprechenden Fortsätzen benachbarter Podozyten verzahnt (siehe Abb. 2B). Außerdem sind sie mit verbreiterten Füßchen an der äußeren Lamina rara der Basalmembran verankert. Es verbleibt lediglich ein schmaler interzellulärer Spaltraum von im Mittel etwa 40 nm, der von einer ca. 6 nm dicken Schlitzmembran überspannt wird [Schiebler 2005]. Diese extrazelluläre Schicht enthält Glykoproteine und weist 2 bis 5 nm weite Poren auf. Auch die Membran der Podozytenfortsätze selbst ist durch eine stark negativ geladene Glykokalix gekennzeichnet, was die Filtrationseigenschaften des interzellulären Spaltraumes mitbestimmt [Welsch 2003]. Neben dem elektrostatischen Einfluss auf die Filtration besitzen die Podozytenfortsätze auch reichlich kontraktile Filamente, mit denen sie vermutlich die Durchlässigkeit des glomerulären Filters regulieren können [Junqueira 2005]. Das parietale Blatt der Bowman-Kapsel wird aus einschichtigem Plattenepithel gebildet. Von außen her umgibt eine Hülle aus

extrazellulärer Matrix das Nierenkörperchen, wodurch über retikuläre Fasern eine Verbindung zu benachbarten Harnkanälchen hergestellt wird.

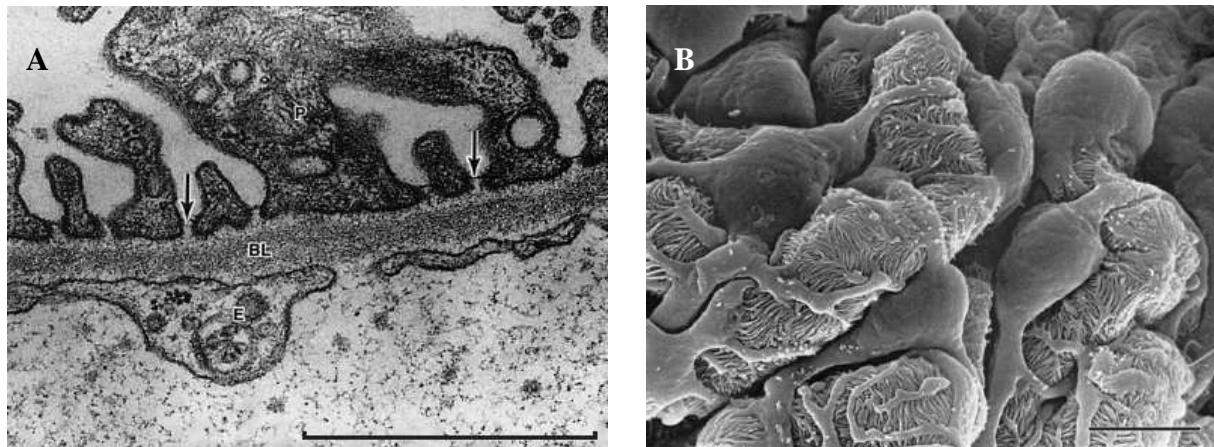


Abb. 2A: Glomerulärer Filter in stark vergrößerter transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahme. Unten sieht man das Lumen einer Kapillare mit ausgefällten Plasmaproteinen, die sich als flockige Substanz darstellen. Fenestriertes Endothel (E) begrenzt die Kapillare. Es schließt sich die Basallamina (BL) an, auf der die Podozytenfüßchen (P) verankert sind. Die über den Filtrationsschlitzten liegende Schlitzmembran ist durch Pfeile gekennzeichnet. Balken = 1 μ m [nach Junqueira et al. 1998]. **Abb. 2B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Podozyten eines Glomerulus.** In den großen Vorwölbungen liegen die Kerne der Podozyten. Deutlich wird die kammartige Verzahnung der Fortsätze. Balken = 10 μ m [aus Fujita et al. 1981].

Im Raum zwischen den Kapillarschlingen des Glomerulus finden sich Mesangiumzellen, die das intraglomeruläre Mesangium bilden. Diese ebenfalls fortsatzreichen, zur Phagozytose befähigten Zellen sind von der Basalmembran der Kapillaren eingeschlossen, so dass sie vom Kapillarlumen nur durch das Endothel getrennt sind. Ihre Aufgabe ist der Abbau von aus den Kapillaren ausgetretenen Makromolekülen und dem von den Podozyten ständig neu gebildeten Basalmembranmaterial sowie der mechanische Ausgleich des hohen hydrostatischen Drucks in den Glomeruluskapillaren [Junqueira 2005]. Innerhalb der beiden Blätter der Bowman-Kapsel liegt der Filtrationsraum, der den Primärharn aufnimmt. Gegenüber dem Gefäßpol befindet sich der Harnpol, von dem aus der Innenraum der Kapsel in das Tubulussystem übergeht.

1.1.3 Resorption und Exkretion im Tubulussystem

Beginnend am Harnpol der Nierenkörperchen füllen die Tubuli der Nephrone den größten Teil der Niere aus. Im Verlauf des Tubulussystems werden nicht nur etwa 99% des filtrierten Wassers, sondern auch eine vergleichbare Menge des darin gelösten Kochsalzes, sämtliche Zucker, Aminosäuren und Proteine des Primärharns wieder rückresorbiert. Durch die Konzentrierung des Harns können die harnpflichtigen Substanzen, insbesondere stickstoffhaltige Endprodukte des Stoffwechsels wie Harnstoff, Harnsäure oder Ammoniak, in nur 1 bis 1,5 l Endharn pro Tag ausgeschieden werden [Junqueira 2005]. Damit diese Leistung erbracht werden kann, gliedert sich das Tubulussystem in drei große Abschnitte, die sich morphologisch und funktionell unterscheiden. Eine schematische Darstellung des gesamten Systems zeigt Abbildung 3.

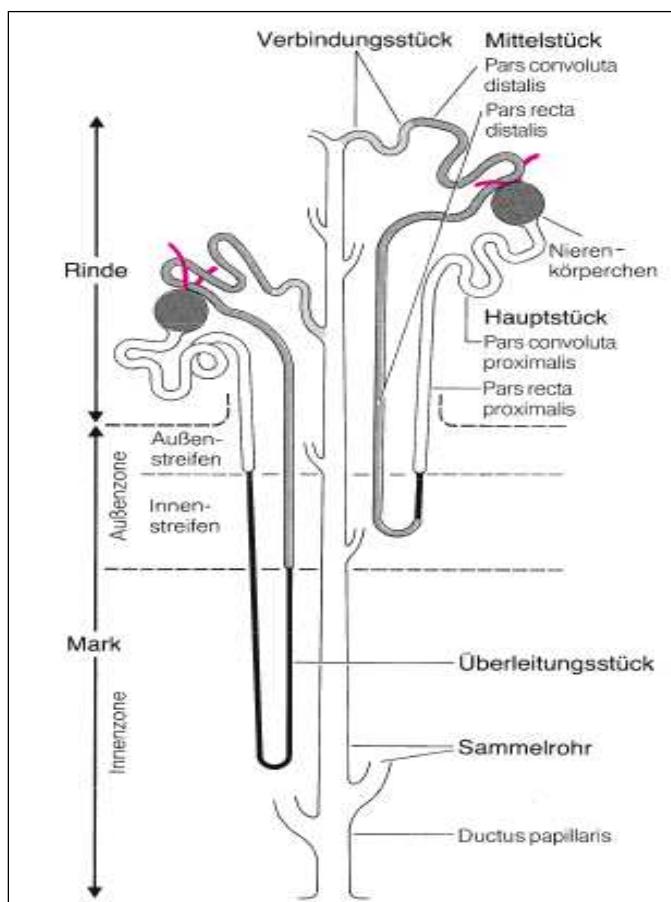


Abb. 3: Übersicht über den Aufbau der Nephrene und ihre Lage innerhalb des Nierenlappens. Das von den Nierenkörperchen ausgehende Tubulussystem besteht aus proximalem, intermediärem und distalem Tubulus sowie dem Verbindungsstück. Während die Nierenkörperchen in der Rinde lokalisiert sind, findet man im Mark nur Abschnitte von Tubuli und Sammelrohren [aus Schiebler 2005].

Aus der Bowman-Kapsel entspringt mit dem proximalen Tubulus der längste Abschnitt des Nephrons. Dieser Teil setzt sich zusammen aus einem ersten gewundenen Abschnitt, Pars

convoluta proximalis, und einem anschließenden gestreckten Teil, der Pars recta proximalis. Lichtmikroskopisch besteht die Wand des proximalen Tubulus aus einem einschichtig kubisch bis hochprismatischen eosinophilen Epithel, dessen Zellen große, runde, euchromatinreiche Kerne aufweisen. Apikal findet sich neben Endozytosevesikeln ein hoher Bürstensaum, der von einer PAS-positiven Glykokalix bedeckt ist. Ultrastrukturell entsprechen dem Bürstensaum ca. 1 μm lange, dichtstehende Mikrovilli, wovon jede Zelle rund 6000 besitzt. Basalseitig verursachen zahlreiche parallel stehende Mitochondrien und das zwischen ihnen nach innen gefaltete Plasmalemm das Bild einer basalen Streifung. Die Mitochondrien decken den Energiebedarf für die in diesen Einfaltungen gelegene $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase, die zusammen mit zahlreichen Carrierproteinen und Ionenkanälen für passive und primär bzw. sekundär aktive Transportmechanismen verantwortlich ist. Auf diese Weise können Kationen wie Natrium, Kalium, Kalzium und Magnesium sowie Anionen wie Phosphat, Sulfat, Bikarbonat, Chlorid oder auch Aminosäuren und Zucker resorbiert werden. Obwohl der glomeruläre Filter für Proteine so gut wie nicht durchlässig ist, gelangen täglich doch zwischen 2 und 10 g Proteine in den Primärharn. Deren Wiederaufnahme erfolgt mittels Endozytosevesikeln, die in der Zelle mit Lysosomen fusionieren, um die Proteine zu Aminosäuren abzubauen. Durch den in der Folge der vielfältigen Transportprozesse ansteigenden osmotischen Druck strömt Wasser passiv sowohl trans- als auch parazellulär aus dem Tubuluslumen aus. Am Ende des proximalen Tubulus sind ca. 70% des Primärharnvolumens und ein ähnlicher Anteil des Natriums wieder aufgenommen. Glukose, Aminosäuren und Proteine werden vollständig im proximalen Tubulus resorbiert, da es in den anderen Tubulusabschnitten keine Transportmechanismen gibt [Junqueira 2005]. Neben der Resorption erfolgen auch sekretorische Prozesse, wodurch organische Säuren wie Urat oder Oxalat und organische Kationen wie Atropin oder Morphin ausgeschieden werden. Oft erfolgt vor der Sekretion eine Bindung der Stoffe an Stoffe wie Sulfat oder Glukuronsäure [Welsch 2003].

An den proximalen Tubulus schließt sich der intermediäre Tubulus an, der auch als Überleitungsstück bezeichnet wird. Der Durchmesser nimmt von 50 bis 60 μm im proximalen Tubulus auf 12 bis 15 μm ab. Das stark abgeflachte Wandepithel weist nur wenige Zellorganellen und keinen Bürstensaum auf [Welsch 2003]. Die Kerne verursachen Auswölbungen der Zellwände, die in das 10 bis 12 μm weite Tubuluslumen hineinragen. Die

Tubuli sind wasserpermeabel, so dass Wasser das Lumen in Richtung der höheren Osmolalität des Interstitiums verlassen kann [Schiebler 2005].

Der nachfolgende distale Tubulus besteht wiederum aus einer Pars recta und einer Pars convoluta, die dasselbe Bauprinzip aufweisen. Am Übergang zwischen beiden Abschnitten, aber noch in der Pars recta, befindet sich die Macula densa, durch die der Tubulus in direktem Kontakt zum Gefäßpol seines Nierenkörperchens steht. Es handelt sich dabei um bestimmte Epithelzellen, die Teil des juxtaglomerulären Apparates sind und somit eine wichtige Aufgabe bei der endokrinen und der Filterfunktion der Niere übernehmen. Die Zellen des distalen Tubulus sind etwas kleiner und heller als die des proximalen Tubulus und weisen weder Bürstensaum noch Endozytosevesikel auf. Ausgeprägte Tight Junctions dichten den Zellverband nach außen hin ab, so dass der Tubulusabschnitt wasserundurchlässig wird [Lüllmann-Rauch 2003]. Es ist eine basale Streifung erkennbar, die von Zellfortsätzen und zahlreichen dicht stehenden Mitochondrien gebildet wird. Diese liefern die nötige Energie für die in der Zellmembran lokalisierte $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase, die eine ausgeprägte Transportleistung der Zelle ermöglichen [Junqueira 2005]. Insgesamt wird der Harn hier hypoton, da NaCl resorbiert wird, ohne dass Wasser nachströmen kann.

Eine wichtige funktionelle Einheit stellt die sogenannte Henle-Schleife dar. Sie setzt sich zusammen aus den bereits beschriebenen Abschnitten Pars recta des proximalen Tubulus, dem intermediären Tubulus und der Pars recta des distalen Tubulus. Zusammen mit bestimmten Blutgefäßen der Niere, den Vasa recta, bildet sie das histologische Korrelat für das physiologische Prinzip der Gegenstrom-Multiplikation. Dieses ist für die Konzentrierung des Harns unabdingbar. Je länger die Henle-Schleife angelegt ist, desto besser ist eine Niere in der Lage, den Harn zu konzentrieren. Beim Menschen wird eine Konzentration von etwa 1200 mosm/l erreicht [Junqueira 2005].

Den letzten Tubulusabschnitt bildet der Verbindungstubulus. Dieser ist geschlängelt und stellt die Verbindung mit dem Sammelrohr her, wobei er auch mehrere distale Tubuli aufnehmen kann [Schiebler 2005]. Das Epithel enthält Zellen, die vergleichbar mit den Zellen der Sammelrohre sind. Sie lassen sich beeinflussen von antidiuretischem Hormon, das die Wasserpermeabilität erhöht, und von Aldosteron, unter dessen Kontrolle aktiv Natrium resorbiert wird [Junqueira 2005].

1.1.4 Sammelrohre

Die Sammelrohre sind entwicklungsgeschichtlich von den übrigen Anteilen des Tubulussystems abzugrenzen. Sie gehen aus der Ureterknospe hervor, während die Nephrone im metanephrogenen Mesenchym der Nierenanlage entstehen. Unterschieden werden kortikale und äußere bzw. innere medulläre Sammelrohre. Der Harn gelangt zunächst über etwa zehn verschiedene Verbindungstubuli in die Sammelrohre, die in den Markstrahlen gestreckt in Richtung des Nierenmarks und der Nierenpapille verlaufen. Im Verlauf kommt es zu Zusammenschlüssen der Sammelrohre untereinander, wodurch letztlich ca. sieben Sammelrohre ein immer größer werdendes Lumen bilden bis hin zu den 100 bis 200 μm weiten Ductus papillares. Von diesen großen Endstücken münden beim Menschen pro Niere etwa 200 bis 700 an den Spitzen der Nierenpapillen in die Nierenkelche. Das kubische bis prismatische Epithel weist gut sichtbare Zellgrenzen auf, an denen die Zellen das Lumen durch Tight junctions wasserdicht nach außen abgrenzen. Es lassen sich zwei Zelltypen unterscheiden, die Haupt- und die Schaltzellen [Welsch 2003].

In den Membranen der hellen Hauptzellen sind Wasserkanäle, sogenannte Aquaporine, eingelagert. Während das Aquaporin 3 in der basolateralen Membran ständig verfügbar ist, wird das Aquaporin 2 in der apikalen Membran nur unter Einwirken von antidiuretischem Hormon, dem ADH, eingebaut. Es wird in den Membranen von intrazellulären Vesikeln bereit gehalten und über Exozytose in die Membran integriert, wenn ADH basolateral an entsprechende Rezeptoren gebunden hat. Dadurch wird die Membran wasserdurchlässig, so dass Wasser dem osmotischen Gradienten folgend ins Interstitium austreten kann. Entsprechend verursacht eine bei ADH-Mangel geringere Menge an Aquaporin 2 eine geringere Durchlässigkeit für Wasser und somit ein größeres Endharnvolumen geringerer Konzentration. Ein weiterer Regulationsfaktor ist das Hormon Aldosteron, das die Resorption von Natrium und die Abgabe von Kalium in den Tubulus hinein kontrolliert [Lüllmann-Rauch 2003].

Die dunklen, mitochondrienreicheren Schalt- oder Zwischenzellen unterteilen sich in Zellen vom Typ A und vom Typ B. Typ-A-Zellen sezernieren über die apikale Zellmembran mittels einer H^+/K^+ -ATPase und einer H^+ -ATPase Protonen ins Sammelrohrlumen, während sie basal Bikarbonat ins Blut abgeben. Die selteneren Typ-B-Schaltzellen können bei alkalotischer

Stoffwechselleage überschüssiges Bikarbonat ins Lumen des Sammelrohrs sezernieren [Welsch 2003].

1.1.5 Blutversorgung der Niere

Die Niere weist eine ausgesprochen reiche Versorgung mit Blutgefäßen auf. So ist jede Niere in der Regel mit einer A. renalis aus der Aorta und einer V. renalis, die in die V. cava mündet, versorgt. Durch den direkten Blutzufluss aus der Aorta und den Abfluss in die V. cava kann die gesamte zirkulierende Blutmenge des Körpers die Niere alle vier bis fünf Minuten durchströmen. Aus der A. renalis gehen insgesamt bis zu fünf Segmentarterien hervor, die sich im Sinus renalis in Aa. interlobares aufzweigen. Diese dringen zwischen den Markpyramiden ins Nierengewebe ein und verzweigen sich wiederum in rechtwinklig abgehende Aa. arcuatae. Die Aa. arcuatae, die zwischen Rinde und Mark bogenförmig verlaufen, entsenden radiäre Aa. interlobulares, die in Richtung der Kapsel ziehen und die Arteriolas glomerulares afferentes abgeben. Aus diesen schließlich werden die Kapillarknäuel der Nierenkörperchen versorgt, bevor Arteriolas glomerulares efferentes das noch immer sauerstoffhaltige Blut weiter transportieren. Von den kortikalen Glomeruli aus erfolgt der Abfluss analog zum arteriellen Zufluss über Vv. interlobulares und die entsprechenden Zwischenstufen bis hin zur V. renalis. Die Arteriolas efferentes der marknahen Glomeruli versorgen weiter das Nierenmark, indem sie lange ins Mark ziehende Vasa recta bilden, die zu den Henle-Schleifen und Sammelrohren parallel verlaufen und schließlich in Kapillarplexus münden. Angelagert an die absteigenden Vasa recta finden sich aufsteigende venöse Vasa recta. Durch die Gesamtheit dieser Strukturen wird das Prinzip der Gegenstromdiffusion ermöglicht, da die spezielle Kapillararchitektur verhindert, dass der hohe osmotische Druck im Interstitium ausgewaschen wird. Auch sie münden in Vv. interlobulares [Schiebler 2005]. Das System ist so ausgelegt, dass nur 8% der gesamten Nierendurchblutung das Mark erreichen und nur 1% in die Innenzone des Marks gelangt [Junqueira 2005].

1.2 Molekulare Bildgebung

1.2.1 Grundlagen der molekularen Bildgebung

Mithilfe der molekularen Bildgebung, auch als Molecular Imaging bezeichnet, sollen biologische Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene *in vivo* charakterisiert und gemessen werden. Das Augenmerk ist hierbei nicht mehr auf die aus den verschiedensten Krankheitsbildern resultierenden morphologischen Veränderungen, sondern auf die eigentlich zugrunde liegenden molekularen Abnormalitäten gerichtet. Man möchte so die Mechanismen der Krankheitsentstehung verstehen und sich dies therapeutisch zunutze machen. Da die bisher betrachteten anatomischen und physiologischen Veränderungen nur eine späte Manifestation der molekularen Veränderungen sind, erhofft man sich nun eine frühere Erkennung von Krankheiten bzw. sogar deren Vorstadien und damit einen direkten Einfluss auf die Patientenversorgung. Des Weiteren können auch die Auswirkungen einer Therapie bereits kurz nach Therapiebeginn dargestellt werden, so dass der Erfolg pharmakologischer oder biologischer Intervention nicht erst nach Monaten überprüft werden kann [Weissleder 2001b; Allport 2001].

Schon früher wurden „molekulare“ Bildgebungsverfahren mit monoklonalen Antikörpern oder der Darstellung von Rezeptoren entwickelt, aber erst jetzt wurden grundlegende Techniken wie molekulares Klonen, Röntgenkristallographie oder hochentwickelte Computeranalyse routinemäßig verfügbar. Ein weiterer Baustein war die Entwicklung nichtinvasiver, hochauflösender bildgebender Technologien, die sich für die *in vivo*-Diagnostik eignen [Yeh 1995; Becker 2001; Paulus 2000]. Der nach wie vor anwachsende Forschungszweig hat die Entwicklung und Testung neuer Arbeitsmaterialien, Reagenzien und Methoden zum Ziel, so dass spezifische molekulare Signalwege analysiert werden können, die eine Schlüsselrolle im Krankheitsprozess einnehmen [Weissleder 2001b; Allport 2001].

Um spezifische Moleküle *in vivo* darstellen zu können, müssen verschiedene Schlüsselkriterien erfüllt sein. Dazu zählen zunächst die Verfügbarkeit von hochaffinen Markermolekülen mit angemessener Pharmakodynamik und die Fähigkeit dieser Marker, auf ihrem Weg durch den Körper biologische Barrieren zu überwinden. Es gibt vielfältige

Strategien, sowohl die vaskulären und interstitiellen Grenzen als auch die Zellmembranen zu umgehen. So kann durch Translokationssignale ein aktiver Transport der Marker in die Zelle induziert [Lewin 2000], durch PEGylierung Immunogenität und Wiedererkennung durch das Immunsystem vermindert [Bogdanov 1993], mithilfe von lang zirkulierenden Markern eine gleichmäßige Verteilung erreicht [Bogdanov 1996] und mit pharmakologischen und physikalischen Methoden das Targeting verbessert werden [Muldoon 1995; Neuwelt 1994]. Eine weitere Herausforderung stellt es dar, ungebundene Liganden zu eliminieren, um Hintergrundrauschen zu minimieren. Da man die überschüssigen Marker nicht wie bei in vitro-Versuchen auswaschen kann, muss man versuchen, sie anderweitig aus der Zirkulation zu entfernen. Zum Beispiel kann man den Transfer der Marker ins retikuloendotheliale System induzieren, indem man kurz vor der optischen Darstellung spezifische „Chase“-Komponenten hinzufügt [Goodwin 1988]. Um in vivo detektiert werden zu können, müssen die Marker ihre Zielstrukturen in ausreichender Konzentration und für eine ausreichende Zeitdauer erreichen. Es sollte also die Bindung möglichst spezifisch sein und eine zu schnelle Ausscheidung oder Metabolisierung vermieden werden. Des Weiteren gibt es verschiedenste Strategien, wie das Signal am Wirkort chemisch oder biologisch noch verstärkt werden kann. Beschrieben sind zum Beispiel eine Erhöhung der Markerkonzentration durch eine Vormarkierung [Barbet 1998] bzw. eine verbesserte Kinetik [Hu 1996] oder die Fähigkeit der Marker, ihr Verhalten nach der Bindung an die Zielmoleküle etwa durch enzymatische Aktivierung zu verändern [Weissleder 1999]. Als Marker eingesetzt werden zum Beispiel rezeptorspezifische Liganden, Enzymsubstrate oder höhernmolekulare sogenannte Biopharmazeutika wie monoklonale Antikörper oder rekombinante Proteine.

Schließlich müssen schnelle und hochauflösende Bildgebungstechniken verfügbar sein, um die Informationen umzusetzen und zugänglich zu machen. Im Wesentlichen unterscheidet man drei Arten, auf der die Bildgebung basieren kann. Zu den nuklearmedizinischen Techniken zählen neben der zweidimensionalen Szintigraphie auch die ebenfalls auf der Emission von Gammastrahlung basierende dreidimensionale Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT) sowie die in Kapitel 1.2.2 erläuterte Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Eine weitere Methode stellt die Bildgebung auf der Grundlage der Magnetresonanz dar, mit deren Grundlagen sich Kapitel 1.2.3 befasst. Schließlich gibt es noch das Prinzip der optischen Bildgebung, das die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehende Grundtechnik darstellt. Die optische

Bildgebung basiert auf Phänomenen wie Fluoreszenz, Absorption, Reflexion oder Biolumineszenz [Weissleder 2001b].

1.2.2 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Als Beispiel für ein funktionelles nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren soll die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) herausgegriffen werden, bei der die Verteilung eines Radiopharmakons im Körper nichtinvasiv dargestellt wird. Auf diese Weise können in der Onkologie maligne Tumore lokalisiert und in den Bereichen Neurologie und Kardiologie wichtige Informationen zu Krankheiten gewonnen werden. Seit den ersten Anwendungen dieser Technik um 1975 [Ter-Pogossian 1975; Phelps 1975] wurde eine Reihe moderner PET-Systeme entwickelt. Neben Geräten für den klinischen Gebrauch und die Forschung existieren spezielle Mikro-PET-Systeme für Nage- und Kleintiere, die mit einem räumlichen Auflösungsvermögen von 1 mm eine extrem hohe Sensitivität aufweisen [Correia 1999; Correia 2000].

Grundlegendes Element jeder PET-Untersuchung ist der verwendete β^+ -Strahler. Es entsteht beim Zerfall eines durch seinen Protonenreichtum instabilen Kerns ein stabilerer Zustand, indem sich im Kern ein Proton in ein Neutron und ein Positron umwandelt. Zusätzlich entsteht ein ungeladenes Neutrino, das aber aufgrund seines großen Durchdringungsvermögens nur schwer nachzuweisen ist. Bei diesem sogenannten β^+ -Zerfall nimmt die Kernladungszahl um eine Einheit ab, während sich die Massenzahl nicht verändert. Die Herstellung der protonenreichen Isotope erfolgt mithilfe eines Elementarbeschleunigers wie dem Zyklotron durch Generieren energiereicher Protonen, die dann in den Zielkern eindringen können [Fowler 1986]. Vorteilhaft für die klinische Anwendung des PET-Verfahrens ist, dass sich zu den im Körper am häufigsten vorkommenden Elementen β^+ -Strahler herstellen lassen, die am normalen Metabolismus teilnehmen können. Es werden hauptsächlich die Elemente Kohlenstoff (^{11}C), Stickstoff (^{13}N), Sauerstoff (^{15}O) und Fluor (^{18}F) verwendet [Herzog 2006]. Beispielsweise kann die mit Fluor markierte ^{18}F -Fluorodesoxyglukose (FDG) von den Zellen wie Glukose aufgenommen, aber nicht weiter verstoffwechselt werden, wodurch intrazellulär eine Anreicherung stattfindet. So können Rückschlüsse auf den Glukosestoffwechsel verschiedener Gewebe gezogen werden [Baghaei

2004]. Nach dem gleichen Prinzip kann mit anderen Radiopharmaka vorgegangen werden. Da die Halbwertszeiten der genannten Isotope allerdings meist im Bereich weniger Minuten liegen, muss die Herstellung in unmittelbarer Nähe zum klinischen Einsatz erfolgen. Damit sind der routinemäßigen Verwendung aufgrund der hohen Kosten für eine Zyklotronanlage gewisse Grenzen gesetzt.

Der ausgewählte Marker wird zumeist intravenös injiziert, so dass er in den Stoffwechsel gelangt. Wird durch einen Zerfall ein Positron freigesetzt, legt es im Gewebe eine Strecke von etwa 0,2 bis 2 mm zurück [Baghaei 2004], wobei es seine Energie durch Anregung von Hüllelektronen auf höhere Energieniveaus, durch Ionisation oder durch Bremsstrahlung abgibt. Nachdem es den größten Teil seiner kinetischen Energie verloren hat, erfolgt eine sogenannte Zerstrahlung oder Annihilation. Dabei interagiert das Positron mit einem Elektron aus dem Gewebe, so dass die Massen beider Partikel nach dem Gesetz $E = m c^2$ (mit E: Energie, m: Masse des Positrons bzw. Elektrons, c: Lichtgeschwindigkeit) in Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung umgewandelt werden. So entsteht ein Photonenpaar, wobei jedes der beiden Photonen entsprechend der Masse eines Positrons bzw. Elektrons eine Energie von 511 keV aufweist [Ter-Pogossian 1995]. Sie werden in einem Winkel von $180^\circ \pm 0,6^\circ$, also annähernd in entgegengesetzte Richtungen, emittiert [Baghaei 2004]. Ringförmig um den Patienten angeordnet befinden sich Detektoren, in denen die Photonen beim Auftreffen ihre Energie durch Anregung von Elektronen abgeben. Auf diese Weise werden Koinzidenzen zwischen je zwei dieser Detektoren registriert. Aus der zeitlichen und räumlichen Verteilung der registrierten Ereignisse wird sowohl auf die Quantität als auch auf die Lokalisation der Positronen-Emitter geschlossen und eine Serie von Schnittbildern errechnet.

Allerdings erreichen nicht alle im Körper emittierten Photonen das umgebende Detektorsystem. Die Photonen können mit Gewebe interagieren, indem sie beispielsweise absorbiert werden. Vor allem aber können sie gemäß des Compton-Effektes einen Teil ihrer Energie auf ein in der äußeren Schale einer Atomhülle sitzendes Elektron übertragen, das dadurch vom Atom abgetrennt wird. Das Quant besitzt nach der Einwirkung auf das Elektron eine verringerte Energie und bewegt sich mit veränderter Flugrichtung weiter. Die PET-Kamera wertet detektierte Gammastrahlung nur, wenn in einem Koinzidenzfenster von 10 bis 20 ns zeitgleich ein zweites Photon registriert wird, wodurch Hintergrundrauschen verringert

wird. Dennoch können auch Zufallsereignisse auftreten, die durch zeitgleiche, aber voneinander unabhängige Detektionen falsche Informationen liefern. Wurden zwei Ereignisse schließlich akzeptiert, kann deren Entstehungsort elektronisch auf der Verbindungsleitung der beiden Detektoren lokalisiert werden [Baghaei 2004]. Um den Ursprung der beiden Photonen darüber hinaus eingrenzen zu können, gibt es zwei grundlegende Techniken: Die Time-of-flight-Methode (TOF) macht es sich zunutze, dass die sich mit Lichtgeschwindigkeit bewegenden Photonen nur dann exakt zum gleichen Zeitpunkt an den Detektoren auftreffen, wenn sie genau in der Mitte der Verbindungsleitung entstanden sind. Aus dem eventuellen Zeitunterschied von wenigen Nanosekunden kann die Verschiebung in Richtung eines der beiden Detektoren errechnet werden. Allerdings kann der Zeitpunkt des Auftreffens mit derzeitigen Mitteln bestenfalls mit einer Genauigkeit von 0,5 ns bestimmt werden, so dass sich diese Methode als zu ungenau erwiesen hat. Statt dessen wird die Non-time-of-flight-Methode (NTOF) angewendet, bei der nicht die genaue Lokalisation des Ereignisses auf einer Verbindungsleitung entscheidend ist, sondern dem Gesamtbild mit jedem Ereignis eine neue Verbindungsleitung hinzugefügt wird. Da in Arealen mit hoher Anreicherung des Markers viele Photonenpaare emittiert werden, die sich in unterschiedlicher Ausrichtung entgegengesetzt weg bewegen, werden diese Areale schließlich durch die Häufung der Schnittpunkte aller Verbindungsleitungen dargestellt [Early 1995]. Da bei dieser Art der funktionellen Bildgebung aber zum Beispiel im Bereich des Abdomens oftmals anatomische Strukturen fehlen, anhand derer man die durch Anreicherung markierten Bereiche lokalisieren kann, macht die Kombination mit anatomischer Bildgebung Sinn. Deshalb wurde das duale PET/CT-System entwickelt, bei dem optimalerweise beim gleichen Messvorgang sowohl die PET-Detektion als auch die computertomographische Bildgebung erfolgen, so dass die Bilder übereinander gelegt und so die markierten Areale auch anatomisch genau zugeordnet werden können [Baghaei 2004].

1.2.3 Kernspinresonanz (NMR)

Das Prinzip der Kernspinresonanz (Nuclear magnetic resonance, NMR) kann in unterschiedlicher Weise sowohl für anatomische als auch für funktionelle Bildgebung genutzt werden. Um die Art der Signalerzeugung nachvollziehen zu können, soll zunächst auf die physikalischen Grundlagen eingegangen werden. Im Mittelpunkt der Betrachtung stehen die

Atomkerne der untersuchten Materie selbst. Wie die Elektronen der Atomhülle, so haben auch alle Nukleonen einen diskreten Eigendrehimpuls, den sogenannten Spin, dessen Vektor parallel zu ihrer Drehachse liegt. Dabei ist die Drehrichtung von Protonen und Neutronen genau entgegengesetzt. Enthält ein Kern also gleich viele Protonen und Neutronen, so resultiert ein Gesamtdrehimpuls von null, da sich die Drehimpulse aufheben. Bei unterschiedlicher Anzahl von Nukleonen der beiden Gruppen ist der Eigendrehimpuls des Atomkerns ungleich null und der Kern rotiert um seine Hauptachse. Weil Atomkerne durch ihre Protonen eine positive Ladung tragen, erhält man durch die Rotation bewegte Ladungen, die naturgemäß ein Magnetfeld induzieren. Wird nun von außen ein statisches Magnetfeld B_0 angelegt, so richtet der Kern seine Hauptachse, den Magnetisierungsvektor M , mit einer sogenannten Präzessionsbewegung entsprechend des Magnetfeldes entweder parallel oder antiparallel aus. Er wird dadurch auf ein höheres Energieniveau angeregt. Wird das homogene Magnetfeld abgeschaltet, fällt der Kern in seine alte Lage zurück und gibt die Energiedifferenz in Form von elektromagnetischer Strahlung wieder ab. Ebenso kann das Energieniveau des Kerns durch Anlegen und Abschalten eines weiteren Magnetfeldes durch erneutes Präzedieren verändert werden. Aus diesem Grund wird für die Messung ein zweites hochfrequentes Magnetfeld in transversaler Richtung angelegt, so dass der Kern seine Präzessionsbewegung beibehält und sich nicht in eine bestimmte Richtung ausrichten kann. Hierzu existiert in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Kerns, die im gyromagnetischen Faktor γ ausgedrückt wird, und des angelegten Magnetfeldes B_0 eine bestimmte Resonanzfrequenz. Diese Eigenfrequenz des Kernes, die sogenannte Larmorfrequenz ω_{Larmor} , wird durch den folgenden Zusammenhang beschrieben:

$$\omega_{\text{Larmor}} = \gamma \cdot B_0$$

Entspricht die angelegte Frequenz der Larmorfrequenz, so wird ein Maximum der Energie des Hochfrequenzfeldes aufgenommen, so dass der Magnetisierungsvektor schließlich annähernd senkrecht zur Richtung des Magnetfeldes B_0 rotiert. Umgekehrt kann man durch die Regulation der äußeren Variablen selektiv bestimmte Kerne anregen: Die Larmorfrequenz des zu detektierenden Kernes wird durch die Wahl des Betrags von B_0 so eingestellt, dass sie der gewählten Frequenz des zweiten Magnetfeldes entspricht. Eine Anregung erfolgt also nur im Resonanzfall, also bei Übereinstimmen der beiden Frequenzen. In der technischen Anwendung gilt es nun, Atomkerne zu finden, deren gyromagnetischer Faktor es ermöglicht,

dass sowohl Frequenz und Betrag der Magnetfelder erzeugt werden können, als auch die Larmorfrequenzen mit ausreichender Signalstärke gut messbar sind. Aus unterschiedlichen Gründen hat sich hier das Proton, der Kern des Wasserstoffatoms (^1H), als vorteilhaft erwiesen: Das häufige Vorkommen von Wasserstoff im menschlichen Körper trägt zu einer ausreichenden Signalstärke bei, aufgrund der ungeraden Nukleonenzahl ist ein Spin vorhanden, und auch die notwendigen Feldstärken von bis zu 4 Tesla können mit supraleitenden Permanentmagneten erzeugt werden. Weitere Kerne in der praktischen Anwendung sind Phosphor (^{31}P), Sauerstoff (^{17}O), Fluor (^{19}F) und Natrium (^{23}Na). Ein weiteres Phänomen, das die Resonanzfrequenz beeinflusst, ist die sogenannte chemische Verschiebung. Ist der untersuchte Kern in einer Molekülstruktur chemisch gebunden, verschiebt sich je nach Bindungspartner und Position im Molekül die Larmorfrequenz [Tscherley 1996].

Für die Messung wird eine Spule in die Nähe des rotierenden Kerns gebracht. Die durch die Präzessionsbewegungen frei werdende Energie induziert darin einen Wechselstrom, der als Resonanzsignal gemessen wird. Dabei beruht die Messung darauf, dass sich die Kerne nach Abschalten des Hochfrequenzfeldes wieder in ihrer ursprünglichen Position entlang des statischen Feldes B_0 ausrichten. Diesen als Relaxation bezeichneten Prozess kann man in zwei Ebenen betrachten, woraus sich zwei verschiedene Messparameter ergeben. Definiert man die Richtung von B_0 als longitudinale z-Richtung und die Ausrichtung des Hochfrequenzfeldes als transversale xy-Ebene, dann nimmt der Magnetisierungsvektor der z-Komponente im Zeitverlauf exponentiell zu, während die xy-Komponente wieder auf ihren Anfangswert von null abfällt. Als Längs- oder Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 wird die Zeitdauer bezeichnet, die die z-Komponente benötigt, bis das magnetische Moment wieder auf $1 - e^{-1}$ (ca. 63%) ihres Ausgangswertes angestiegen ist. Da die Geschwindigkeit dieses Vorgangs von der Beweglichkeit des angeregten Kerns innerhalb des Molekülverbandes abhängt, haben Flüssigkeiten eine wesentlich kürzere T_1 -Relaxationszeit als Festkörper. Die Quer- oder Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 beschreibt die Zeitdauer, bis die xy-Komponente auf e^{-1} (ca. 37%) des Wertes unmittelbar nach der Anregung abgesunken ist. Dabei erweist sich die separate Betrachtung der beiden Ebenen als sinnvoll, da die Quermagnetisierung in der xy-Ebene viel schneller abnimmt, als man im Vergleich mit dem Anstieg von T_1 vermuten würde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch Wechselwirkungen der Kerne untereinander die Larmorfrequenzen der Kerne nicht mehr einheitlich sind. Es resultiert eine

Phasenverschiebung, so dass sich die transversalen Magnetisierungsvektoren makroskopisch gesehen gegenseitig aufheben. Zusätzlich beschleunigen lokale Inhomogenitäten des Feldes B_0 die Phasenverschiebung der Präzessionsbewegungen. Die T2-Relaxationszeit ist in Festkörpern wesentlich kürzer als in Flüssigkeiten, weil dort fest gebundene Moleküle örtliche Feldabweichungen aufrechterhalten [Bücheler 2006].

Zunächst wurde die beschriebene Technik für die NMR-Spektroskopie genutzt. Diese Methode stellt eines der wichtigsten spektroskopischen Verfahren zur Analyse von Struktur und Dynamik von Molekülen dar. In der Folge wurden diese Kenntnisse weiter entwickelt, so dass auch Informationen über Gegenstände und lebende Organismen gewonnen werden konnten: die Magnetresonanztomographie (MRT) liefert Schnittbilder einzelner Ebenen, die die Intensität des induzierten Wechselstromes in einer Grau- oder Farbskala darstellt. Da die Signalstärke bei entsprechender Einstellung von der Dichte an Wasserstoffkernen abhängt und sich biologische Gewebe in ihrem Wasser- und damit Protonengehalt unterscheiden, kann zwischen verschiedenen Geweben differenziert werden. In jüngster Zeit wurden sogar Möglichkeiten zur funktionellen Bildgebung gefunden. Dabei dienen unterschiedliche Moleküle als Marker. Beispielsweise kann durch Messen des Sauerstoffgehaltes im Blut auf die Aktivität verschiedener Zellverbände rückgeschlossen werden, da das Hämoglobin mit Abgabe von Sauerstoff auch seine magnetischen Eigenschaften ändert. Dies findet besonders in der Neurologie bei der Untersuchung von Nervengewebe Verwendung [Funk 2004]. In ähnlicher Weise bringt die Technik Fortschritte für die Tumordiagnostik: Es konnte gezeigt werden, dass Ferumoxytol, ein magnetisches Nanopartikel, die Signale von Lymphknoten derart moduliert, dass es möglich ist, eine Beteiligung von malignen Zellen zu erkennen [Harisinghani 2007]. Ein weiterer Ansatz ermöglicht sogar indirekt die Darstellung von Genexpression. Durch die Erfassung von Eisenoxid-Nanopartikeln, die bei Expression eines bestimmten Transferrinrezeptors vermehrt in entsprechende Zellen aufgenommen werden, konnte die Synthese dieses Rezeptors sichtbar gemacht werden [Weissleder 2000].

1.2.4 Fluoreszenz

Die dritte große Gruppe der vorgestellten bildgebenden Verfahren ist die optische Bildgebung. Die Versuche der vorliegenden Arbeit basieren vor allem auf dem Phänomen der

Fluoreszenz, weshalb im folgenden Kapitel deren physikalische Grundlagen und verschiedene Einsatzmöglichkeiten vorgestellt werden sollen. Der Überbegriff der Lumineszenz beschreibt die Emission elektromagnetischer Strahlung durch Atome oder Moleküle, die vorher durch Energiezufuhr angeregt wurden. Die anregende Energie kann dabei unterschiedlichsten Ursprungs sein, was in der Nomenklatur zum Ausdruck kommt: Man spricht von Photolumineszenz, wenn durch Absorption elektromagnetischer Strahlung angeregt wird, von Chemolumineszenz, wenn die Energie aus chemischen Reaktionen stammt und von Biolumineszenz, wenn es sich bei den Reaktionen um biologische Prozesse handelt. Auch die Anregung durch radioaktive Strahlen (Radiolumineszenz), elektrische (Elektrolumineszenz) und mechanische Vorgänge (Tribolumineszenz) sind möglich [Ehlers 2002].

Im sogenannten Singulettgrundzustand (S_0) besitzen die Elektronen, die paarweise in ihren Orbitalen angeordnet sind, entgegengesetzte Spins. Wird Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung aufgenommen, kann ein Elektron in ein unbesetztes energiereicheres Orbital wechseln, ohne dass sich der Spin ändert. Je nach Höhe der anregenden Energie befindet sich das Elektron dann in einem angeregten Singulettzustand, z.B. S_1 oder S_2 . Da dieser Zustand instabil ist, wird schon bald der Grundzustand wieder eingenommen, wobei die Energie durch Aussenden elektromagnetischer Strahlung abgegeben wird. Diese Strahlungsemision, die spontan innerhalb von 0,1 bis 100 ns nach Beginn der elektromagnetischen Anregung erfolgt und bei Unterbrechung der Bestrahlung innerhalb etwa 10^{-8} s abklingt, wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Energie der Fluoreszenzstrahlung ist gemäß der Stokes'schen Regel maximal gleich der absorbierten Energie. Differenzen zwischen Absorptions- und Emissionswellenlänge können anhand des Termschemas von Jablonski, das Abbildung 4 zeigt, erklärt werden. Es existieren innerhalb eines Zustandes S verschiedene Schwingungsniveaus, wobei die Anregung ausgehend vom Grundzustand auf unterschiedlichen Schwingungsniveaus des jeweiligen Anregungszustandes enden kann. Die Emissionsübergänge gehen aber stets vom niedrigsten Schwingungsniveau des Anregungszustandes aus. Die Energiedifferenz kann durch sogenannte innere Umwandlung (internal conversion) z.B. bei Zusammenstößen mit anderen Molekülen strahlungslos in Form von Wärme abgegeben werden [Ehlers 2002]. Unter bestimmten Umständen kann die Strahlungsemision auch erst mehr als eine Millisekunde nach Beginn der Anregung einsetzen und im Vergleich zur Fluoreszenz nach Unterbrechung der Energiezufuhr noch 0,1 μ s bis 100 s und länger anhalten. Der Vorgang wird dann als Phosphoreszenz bezeichnet.

Diese tritt auf, wenn das angeregte Elektron aus dem Singulettzustand (z.B. S_1) zunächst strahlungslos in einer Singulett-Triplett-Umwandlung (intersystem crossing) unter Umkehr seines Spins in einen energieärmeren Triplettzustand (z.B. T_1) wechselt. Erst danach wird die verbleibende Energie in Form von elektromagnetischer Phosphoreszenzstrahlung abgegeben. Der Spin des Elektrons wechselt bei der Rückkehr in den Grundzustand wieder in seine Ausgangsposition zurück. Da jeder T-Zustand im Vergleich zum zugehörigen S-Zustand energieärmer ist, ist das Phosphoreszenz-Emissionsspektrum gegenüber dem Fluoreszenzspektrum des gleichen Moleküls zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Alternativ kann nach Absorption von Licht auch die gesamte Energie in einer strahlungslosen Desaktivierung durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen abgegeben werden. Ob eine Lumineszenz auftritt, hängt vor allem von der Beschaffenheit des Moleküls ab. Der Teil eines Moleküls, der für die Fluoreszenz verantwortlich ist, wird als Fluorophor bezeichnet [Schwedt 1981].

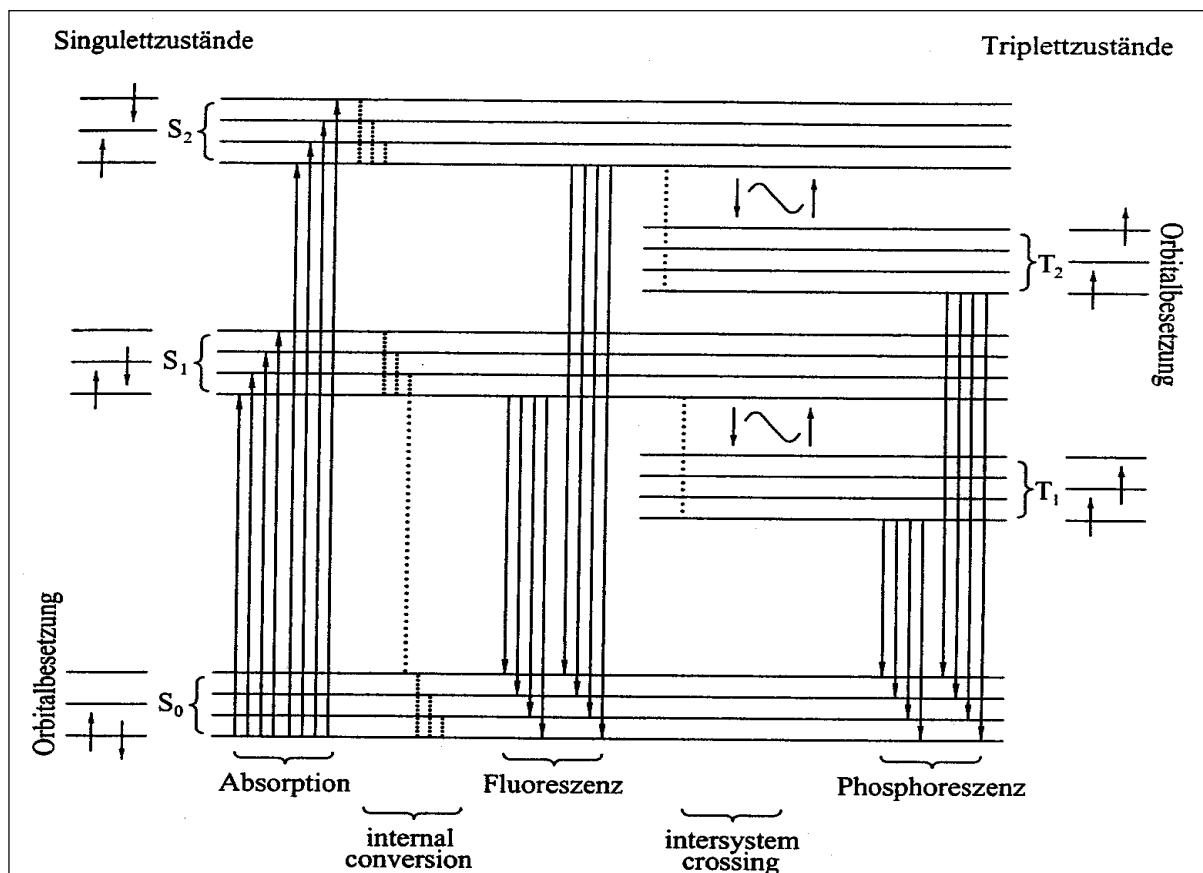


Abb. 4: Termschema nach Jablonski mit Angabe der Spinzustände zur Erläuterung von Absorption, Fluoreszenz und Phosphoreszenz. (....) = strahlungslose Übergänge, (—) = Übergänge durch Absorption oder Emission elektromagnetischer Wellen [aus Ehlers 2002].

In einem Fluoreszenzspektrum wird die Intensität des emittierten Lichts in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen. Angeregt wird dabei mit monochromatischem Licht aus dem UV- oder VIS-Bereich, die Detektion über den gesamten Frequenzbereich kann mit einem Fluoreszenzspektrometer erfolgen. Es wird zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum unterschieden. Bei beiden handelt es sich um Bandenspektren, da bei der Lichtemission angeregter Moleküle nicht nur elektronische, sondern auch variable Schwingungs- und Rotationszustände eine Rolle spielen [Ehlers 2002]. Eine Reihe von analytischen Methoden machen sich die charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften von Verbindungen zunutze. Es können sowohl in der Fluoreszenzspektralanalyse qualitativ Substanzen identifiziert werden, als auch in der Fluorophotometrie über die Messung der Fluoreszenzintensitäten quantitativ Konzentrationen bestimmt werden. Beide Methoden werden unter dem Begriff der Fluorimetrie zusammengefasst [Schwedt 1981]. Der Anteil der Energie des Anregungslichtes, der in Fluoreszenzlicht umgewandelt wird, wird als Quantenausbeute bezeichnet. Eine Verminderung der Quantenausbeute durch äußere Einflüsse wie z.B. Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und verwendetem Lösungsmittel nennt man Quenching. Beispiele für derartige Löschstoffe sind Schwermetall- und Halogenid-Ionen, Sauerstoff, Stickstoffoxid oder elementares Chlor [Ehlers 2002].

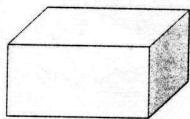
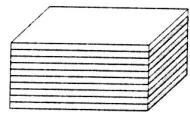
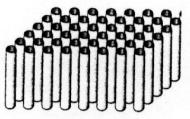
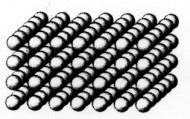
Vor allem in den Bereichen Biochemie und Medizin wurden einige Verfahren etabliert, die aus Forschung und Diagnostik nicht mehr wegzudenken sind. Fluoreszierende Moleküle werden dabei oft als Marker eingesetzt, um spezifische Elemente sichtbar zu machen. So sind beispielsweise bei der DNA-Sequenzierung nach Sanger die vier Basen der DNA unterschiedlich markiert, so dass nach Trennung der Moleküle anhand der Wellenlängen des emittierten Lichts auf die jeweils vorliegende Base rückgeschlossen werden kann. In der Immunologie werden häufig Antikörper mit fluoreszierenden Markern versehen, so dass die spezifischen Antigene anhand der Fluoreszenz erkennbar sind. Auch mikroskopisch lassen sich fluoreszierende Elemente sichtbar machen, was unter anderem bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ausgenutzt wird. Neben einer Reihe von Möglichkeiten zur extrinsischen Markierung gibt es aber auch Stoffe, die eine Eigenfluoreszenz aufweisen. Dazu gehören z.B. die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, die auch in Proteinen und Peptiden noch durch Fluoreszenz nachweisbar sind. Durch Detektion von fluoreszierenden Proteinen wie dem Green fluorescent protein (GFP) können biologische Vorgänge im Stoffwechsel verfolgt werden [Shimomura 2006].

1.3 Nanotechnologie

1.3.1 Nanopartikel

Nanomaterialien (gr. *vávvoç* = Zwerg) im weitesten Sinne weisen strukturelle Merkmale in einer Größenordnung von 1 nm bis zu mehreren hundert Nanometern in mindestens einer Dimension auf. Sie zeichnen sich durch ganz spezifische Eigenschaften aus, die von verschiedenen Parametern der Nanostrukturierung abhängig sind. Im Vergleich zu Festkörpern oder größeren Teilchen ergeben sich Änderungen in Bezug auf die elektrische Leitfähigkeit, die chemische Reaktivität und die optischen Eigenschaften [Martienssen 2005]. Deshalb kann man durch optische, magnetische und elektrische Messungen den Übergang vom Festkörper- zum Nanoverhalten verfolgen [Fahrner 2003]. Die Ursachen für diese veränderten physikalischen Eigenschaften sind vielfältig: Eine Besonderheit der Nanostrukturen ist, dass sowohl die Anzahl der Oberflächenatome im Vergleich zur Anzahl der Atome im Inneren der Struktur als auch die Oberflächenenergie im Vergleich zur Gesamtenergie von der Größenordnung her gleich sein können. Das heißt, dass die Oberflächeneigenschaften im Vergleich zu den Volumeneigenschaften in den Vordergrund treten. Auch sind die Leitungs- bzw. Valenzelektronen in ihrer Bewegungsfreiheit auf eine kleine Länge oder ein kleines Volumen eingeschränkt, woraus ein Grenzwert für die quantenmechanische Wellenlänge des niedrigsten elektronischen Zustands resultiert. Dies wirkt sich auf das optische Absorptionsspektrum aus. Ein weiterer Punkt ist, dass beispielsweise bei Nanoclustern aus Metallatomen aufgrund des räumlich eng begrenzten Bereiches nur schwer Versetzungen erzeugt werden können. Diese eingeschränkte Bewegungsfähigkeit ist für eine sehr harte Struktur verantwortlich [Kittel 1999].

Eine Klassifizierung der Nanomaterialien kann gemäß ihrer Dimensionalität erfolgen. Hierzu legt man die drei Richtungen im Raum als X , Y und Z fest. Auf das Material bezogen ergeben sich die Vektoren L_X , L_Y und L_Z , deren Betrag man jeweils mit der nanoskopischen Grenze L_0 vergleicht. Auf diese Weise erhält man vier Möglichkeiten der Konstellation, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind. Die Unterschiede ergeben sich durch die Abgrenzung im Raum und die daraus resultierende Dimensionalität [Martienssen 2005].

$L_{X,Y,Z} > L_0$	Keine Nanostruktur	Keine Begrenzung	Festkörper	
$L_{X,Y} > L_0 > L_Z$	Zweidimensionale Nanostruktur (2-D)	Eindimensionale Begrenzung (1-D)	Schichten	
$L_X > L_0 > L_{Y,Z}$	Eindimensionale Nanostruktur (1-D)	Zweidimensionale Begrenzung (2-D)	Drähte	
$L_0 > L_{X,Y,Z}$	Nulldimensionale Nanostruktur (0-D)	Dreidimensionale Begrenzung (3-D)	Punkte	

Tab. 1: Klassifizierung der verschiedenen Nanomaterialien. Je nach Abgrenzung im Raum ergeben sich unterschiedliche Dimensionalitäten [nach Martienssen 2005].

Relevant für die vorliegende Arbeit sind ausschließlich die punktförmigen Nanopartikel, die in allen drei Raumrichtungen die nanoskopische Grenze unterschreiten. Ein Nanopartikel ist allgemein definiert als eine Kugel oder ein kugelähnliches Molekül, das aus wenigen 10 bis einigen 10.000 Atomen besteht. Die Atome sind untereinander durch zwischenatomare Kräfte verbunden, stellen aber keinen Festkörper im eigentlichen Sinne dar [Fahrner 2003]. In der Umwelt findet man Partikel dieser Größenordnung zum Beispiel als Staubpartikel nach Vulkanausbrüchen oder Waldbränden und in Form von Auto- und Industrieabgasen. Vielfältig genutzt hingegen werden synthetisch hergestellte Nanopartikel, die in den unterschiedlichsten Bereichen von Wissenschaft und Technik eingesetzt werden können. Zur Vorgehensweise bei der Herstellung gibt es grundsätzlich zwei Ansätze: Die „Top-down“-Methode geht von einem Körper größeren Volumens aus, der soweit zerkleinert wird, bis er eine entsprechende Größe im Bereich von Nanometern erreicht hat. Im Verlauf der Zerkleinerung erscheinen die Partikel dabei kontinuierlich von makroskopischer bis zu nanoskopischer Größe geordnet. Beispiele für derartige technische Verfahren sind das Mahlen mit Eisenkugeln, Gaskondensation, Laserabtrag, thermische und Ultraschallzersetzung oder bei Metallverbindungen verschiedene Reduktionsmethoden. Der zweite Ansatz, die „Bottom-up“-Methode, basiert auf der gezielten Synthese der gewünschten Partikel aus Atomen, wobei die Größe des Produkts während des Herstellungsverlaufs zunimmt. Der Vorteil besteht darin,

dass man die Partikel kontrolliert nach einem gewünschten Bauplan konstruieren kann, was vor allem in den Aufgabenbereich der Fachgebiete Chemie und Physik fällt [Martienssen 2005; Fahrner 2003].

Die Anwendungsmöglichkeiten der synthetisch hergestellten Nanopartikel sind vielfältig. In Industrie und Technik findet man sie beispielsweise als optische Filter in Sonnenöl oder Hautmilch, als Schmutzabweiser für Autos und Fenster, in Einzelelektronentransistoren oder Flachbildschirmen [Fahrner 2003]. An dieser Stelle soll allerdings hauptsächlich auf den Einsatz in Biologie und Medizin eingegangen werden. Hier können Nanopartikel z.B. als partikuläre Wirkstoffträgersysteme für Substanzen wie Antikörper, Antigene, Toxine oder Viren eingesetzt werden. Dazu werden den an Makromoleküle assoziierten, in Lösung befindlichen Wirkstoffen Lösungsmittelmoleküle entzogen (Desolvatation), so dass die Wirkstoffe in eng vernetzte Nanopartikel eingeschlossen werden. Nach einer Härtung können die 150 bis 500 nm großen Partikel intravenös verabreicht werden. Im Körper reichern sie sich in Leber und Milz an, wo der Wirkstoff durch Abbau des Trägermaterials wieder freigesetzt wird. Leider ist es bisher nicht gelungen, marktreife Produkte zu entwickeln, bei denen Antikörper an der Außenseite des Trägers nach ausreichend langer Zirkulation zum Aufspüren bestimmter Zielzellen anhand deren Oberflächenantigene führen [Voigt 2005; Bauer 2006]. Da die Eigenschaften der Nanopartikel in vielerlei Hinsicht variiert werden können und eine Kopplung an verschiedenste Trägersubstanzen oder Hüllen möglich ist, werden die Partikel auf unterschiedlichste Weise als Marker eingesetzt. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die Oberflächenstrukturen mehrfach verändert, in der Hoffnung, die Partikel dadurch lenken oder beeinflussen zu können.

1.3.2 Quantenpunkte

Ebenfalls aus dem Bereich der Nanotechnologie entstammt der Begriff der Quantenpunkte. Als solche bezeichnet man dreidimensionale Nanokristalle aus halbleitenden Materialien, die aus etwa 10^3 bis 10^5 Atomen bestehen können [Atkins 2006]. Halbleiter sind Stoffe wie z.B. Silizium (Si), Germanium (Ge), Gallium-Arsenid (GaAs) oder Cadmium-Selenid (CdSe), deren Leitfähigkeit für elektrischen Strom zwischen den Extremen Leiter und Isolator angesiedelt ist. Der spezifische Widerstand dieser Stoffe wird durch Temperatur und

Beleuchtung beeinflusst. Da die Atome im Kristall bei Energiezufuhr durch Wärme oder Licht in Schwingung geraten, entstehen freie Elektronen, was eine Erhöhung der Eigenleitung zur Folge hat [Schafbauer 1999].

Die Herstellung von Quantenpunkten erfolgt entweder in Lösung oder durch Abscheidung der Atome auf einer Oberfläche. Mit dem Verfahren der Elektronenlithographie können sogar Quantenpunkte mit einer Größe von wenigen 10 nm erzeugt werden [Fahrner 2003]. Die verschiedenen Herstellungstechniken wirken sich direkt auf die Größe der Nanokristalle und damit deren optische Eigenschaften aus. Denn es hängt von der Größe eines Quantenpunktes ab, wie viel Energie nötig ist, um eine elektrische Leitfähigkeit zu erzeugen. Je kleiner der Radius eines Quantenpunktes ist, desto kurzwelliger muss bei Anregung durch elektromagnetische Strahlung die Wellenlänge sein. Auf diesem Weg kann man also die Farbe des Materials beeinflussen. Bei makroskopischen Halbleitermaterialien aus den gleichen Komponenten hingegen lassen sich die elektrischen Eigenschaften nicht derart beeinflussen [Atkins 2006].

Diese Halbleiter mit einstellbaren elektrischen Eigenschaften werden vor allem in der Elektronik bei der Herstellung von Transistoren eingesetzt. Aber auch in verschiedensten anderen Fachgebieten wie Chemie, Biologie und Medizin kommen die Quantenpunkte zum Einsatz. Hier spielen vor allem die besonderen optischen Eigenschaften eine Rolle. Denn nicht nur die Erzeugung von freien Elektronen durch Energiezufuhr, sondern auch die Energieabgabe durch Zurückkehren eines Elektrons in seine Lücke ist möglich. Dies entspricht dem Phänomen der Fluoreszenz [Weng 2006]. Durch Detektion der Fluoreszenzstrahlung können die Quantenpunkte beispielsweise mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Ähnlich wie bei vielen anderen organischen oder anorganischen Molekülen, die als Marker eingesetzt werden, können bestimmte Strukturen des Stoffwechsels auch mit Quantenpunkten markiert werden, wobei letztere stabiler sind und mehr Licht emittieren [Atkins 2006].

1.3.3 Risiken der Nanotechnologie

Die Branche der Nanotechnologie zählt nach wie vor zu den aufstrebenden Industriezweigen, da ständig neue, vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten entdeckt und weiterentwickelt werden. Doch gerade weil immer mehr Menschen in immer größerem Umfang damit in Kontakt kommen, dürfen auch mögliche Risiken der Nanotechnologie nicht unerwähnt bleiben. Denn dieselben besonderen Eigenschaften, welche die Nanopartikel von größeren Festkörpern unterscheiden und die man sich in vielerlei Hinsicht zunutze macht, können durch unabsehbare physikalische und chemische Interaktionen mit ihrer Umgebung potentiell eine Toxizität bewirken [Nel 2006; Priestly 2007].

Eine der wichtigsten Eintrittspforten für Nanopartikel ist das respiratorische System. Obwohl dies vor allem für die Substanzen gilt, denen der Mensch in der Umwelt in Form von Luftschadstoffen ausgesetzt ist, wird dieser Eintrittsweg durch die Therapien mit Aerosolen auch klinisch relevant [Eerikainen 2003]. In der Lunge können Nanopartikel oxidativen Stress verursachen, der über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu verstärkter Synthese proinflammatorischer Proteine führt und auf diese Weise das Gewebe schädigt [Schins 2000]. Es wurde sogar ein signifikanter Zusammenhang zwischen Partikelloberfläche und dem Ausmaß der durch oxidativen Stress induzierten Entzündung gezeigt [Brown 2001]. Trotz allem gilt es, hier weiterführende Forschungsarbeit zu leisten, da die Partikel in den bisherigen Studien an Tieren statt durch Inhalation hauptsächlich via Instillation in den Körper eingebbracht wurden [Medina 2007]. Des Weiteren ist es Nanopartikeln möglich, die phagozytotische Immunabwehr im Respirationstrakt zu umgehen und über das Epithel hinweg in den Blutkreislauf zu gelangen. Von hier aus können unterschiedlichste Organe bis hin zum Gehirn erreicht und möglicherweise geschädigt werden [Berry 1977; Nemmar 2002]. Auch über den Gastrointestinaltrakt oder die direkte Aufnahme durch die Haut können Nanopartikel in den Körper gelangen. Zu den in vitro nachgewiesenen Schädigungen zählen neben verstärkter Thrombozytenaggregation [Radomski 2005] auch zytotoxische morphologische Veränderungen von Zellen, proinflammatorische Vorgänge, Hemmung von Zellwachstum [Yamawaki 2006] und Induktion von Apoptose [Cui 2005]. Allerdings besteht auch hier weiterer Forschungsbedarf, da weder in vitro gewonnene Ergebnisse uneingeschränkt auf lebende Organismen übertragen noch Versuche an Nagetieren in gleicher Form auf den Menschen angewendet werden können [Medina 2007].

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Pharmaka

Bepanthen®, Roche, Grenzach-Wyhlen

DePeX, Serva, Heidelberg

Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), Merck, Darmstadt

Ethanol, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA

Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA), Roth, Karlsruhe

Harnstoff, Merck, Darmstadt

Hostaket®, Intervet, Unterschleißheim

Immersol™, Zeiss, Oberkochen

Isotonische NaCl-Lösung, Delta Select, Pfullingen

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Merck, Darmstadt

Liquemin®, Roche, Grenzach-Wyhlen

Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS), Serva, Heidelberg

Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$), Merck, Darmstadt

Natronlauge (NaOH), Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd (PFA), Merck, Darmstadt

Rompun® 2%, Bayer Vital, Leverkusen

Saccharose, Merck, Darmstadt

Salzsäure (HCl), Merck, Darmstadt

Tissue-Tek®, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande

Triton X-100, Sigma, St. Louis, USA

2.1.2 Einmalartikel

BAND-AID Sprühpflaster, Ethicon®, Johnson + Johnson, Norderstedt
Dialyseschläuche, Medicell International Ltd, London
Faden 3/0 Ethicon®, Mersilene®, Johnson + Johnson, Düsseldorf
Kanülen, BD Microlance™ 3, Becton Dickinson, Drogheda, Irland bzw. S.A. Fraga, Spanien
Leukosilk®, BSN medical, Hamburg
Mikrotiterplatten (96-Loch), Greiner, Frickenhausen
Polyethen-Schlauch, SIMS Portex, UK
Reaktionsgefäß, Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen, Injekt-F, B. Braun, Melsungen
Super Frost® Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen
Tuberkulinspritze (1 ml), B. Braun, Melsungen
Wägeschälchen, VWR, Ismaning
Wattestäbchen, TIP Goldhand, Düsseldorf

2.1.3 Instrumente

Bulldogklemmen (FST 18050-28), FST, Dumont, Schweiz
Klemme (FST 13003-10), FST, Dumont, Schweiz
Küvette Type Nr. 104.002F-OS, Hellma, Müllheim
Pinzetten (FST 11002-14, FST 11253-21), FST, Dumont, Schweiz
Scheren (FST 14000-12, FST 15001-08), FST, Dumont, Schweiz

2.1.4 Geräte

Binokulares Operationsmikroskop, Wild, Heerbrugg, Schweiz
Digitalkamera DMC 2, Polaroid
Fluoreszenzmikroskop Axioskop, Zeiss, Oberkochen
Fluorimeter FluoroLog, Horiba Jobin Yvon, München
Fluorimeter, GENios Plus, XFLUOR4 Version V 4.50

Fluorimeter, Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg

Heizplatte MR 3001, Heidolph Instruments, Schwabach

Kompressor Jun-Air, Dänemark

Kryomikrotom Leica CM 3050 S, Leica, Bensheim

Rotierendes Messer, Polytron®, Kinematica, Littau, Schweiz

Tischzentrifuge Biofuge pico, Kendro Heraeus, Hanau

Ultraschallgerät Vibracell™, Sonics & Materials, Danbury, CT. USA

Ultrazentrifuge Centricon T-1170, Kontron, Neufahrn

- Rotor Kontron TFT 55.38
- Gefäße: Nalgene™, Ultra Plus™, Centrifuge Ware, M & B Stricker, Oberschleißheim

Ultrazentrifuge Optima™, Beckman Coulter™, Fullerton, California

- Rotor TLA-55
- Gefäße: Microfuge® Tube, Polyallomer, Beckman

Waage, Sartorius, Göttingen

2.1.5 Lösungen

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

Zur Herstellung von 1 l 10facher PBS-Lösung wurden zuerst zwei Lösungen A und B benötigt:

- A) 1,4 M NaCl
100 mM K₂HPO₄

Mit H₂O bidest auf ca. 950 ml auffüllen.

- B) 100 mM KH₂PO₄

Mit H₂O bidest auf 500 ml auffüllen.

Lösung A wurde vorgelegt und unter Röhren mit einem magnetischen Rührstab mit B auf pH 7,4 titriert. Unter pH-Kontrolle wurde mit H₂O bidest auf 1 l aufgefüllt und vor der Verwendung autoklaviert.

Perfusionslösung

Für die Perfusionsfixierung einer Ratte mussten 300 ml einer Perfusionslösung hergestellt werden. Es wurde mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA) in 1x PBS (pH 7,4) gearbeitet. Die Herstellung erfolgte mit Mundschutz nach einem Standardverfahren: 12 g PFA, ca. 150 ml H₂O bidest. und 3 bis 4 Tropfen 10 M NaOH wurden auf einer Heizplatte bei 50 bis 60°C ca. 5 min lang durch Umrühren mit einem Magnetrührstab solange vermischt, bis die Lösung klar wurde. Anschließend wurden 30 ml 10x PBS hinzugegeben und die Lösung auf Eis bis zur Raumtemperatur abgekühlt. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von 1 M HCl auf 7,4 eingestellt. Mit H₂O bidest wurde auf ein Endvolumen von 300 ml aufgefüllt und die fertige Lösung abschließend durch ein Papierfilter filtriert.

2.1.6 Dialyseschläuche

Die Dialyseschläuche (Size 2 Inf Dia 18/32" - 14,3 mm; MWCO 12 – 14000 Daltons) wurden nach einem gängigen Standardverfahren gebrauchsfertig gemacht. Dazu wurden die Rohschläuche für 10 min in einem Erlenmeyerkolben in 2 l einer Lösung aus 1 mM EDTA mit pH 8,0 und 2% NaHCO₃ gekocht. Nachdem sie intensiv mit entsalztem Wasser ausgespült worden waren, wurden sie für weitere 10 min in 2 l einer 1 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) gekocht. Nach erneutem Ausspülen mit entsalztem Wasser wurden sie zur Vorbeugung bakteriellen Wachstums in 50% Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

2.2 Katheterisierung der Ratten

2.2.1 Auswahl der Tiere

Wesentlicher Bestandteil der Versuche war die systemische Verabreichung verschiedener Partikel und die Untersuchung deren Verhaltens im lebenden Organismus. Dazu wurde den ausgewählten Versuchstieren ein Katheter in die Vena femoralis gelegt. Es wurden Ratten des Stammes Wistar mit einer Masse von 200 bis 300 g verwendet, wobei in den einzelnen Versuchen das unterschiedliche Organgewicht berücksichtigt wurde. Die Ratten zeigten sich als groß genug für die Katheterisierung und hatten dabei ein ausreichend geringes intravasales Volumen, um mit einer überschaubaren Partikelmenge arbeiten zu können.

2.2.2 Anästhesie

Zur Narkose wurde zunächst eine Mischung aus 0,35 ml Ketamin (Hostaket®) zur Analgosedierung und 0,15 ml Xylazin 2% (Rompun® 2%) zur Muskelrelaxation in einer 1-ml-Tuberkulinspritze hergestellt. Die zu betäubende Ratte wurde mit der rechten Hand vorsichtig am Schwanz herangezogen, um ihr dann mit der flachen linken Hand ein weißes Papierhandtuch über den Nacken zu drücken. Dabei wurden Kopf und Hals zwischen Zeige- und Mittelfinger und der restliche Körper mit dem Handballen in ihrer Position fixiert. Nun konnte mit der rechten Hand beidseits in die Glutäalmuskulatur mit einer grauen Kanüle (BD Microlance™3 27G ¾" Nr. 20) je ca. 0,1 ml des Medikamentengemisches injiziert werden. Nachdem die Wirkung nach ca. 5 min eingesetzt hatte und die Ratte eingeschlafen war, wurde der Rest der Mischung intraperitoneal gespritzt. Wenn die Ratte dies nicht tolerierte, war entweder die Wartezeit noch nicht ausreichend oder die Medikamentendosis in der Glutäalmuskulatur musste um jeweils ca. 0,1 ml erhöht werden. Bei der intraperitonealen Injektion war darauf zu achten, dass sie weder bei zu geringem oder zu flachem Einstechen subkutan noch bei zu tiefem oder zu steilem Einstechen in den Darm verabreicht wurde. Die Schmerzausschaltung wurde nach weiteren 3 bis 5 min durch einen kurzen Kniff in einen Lauf der Ratte überprüft, der keine Reaktion hervorrufen sollte. Auf dieselbe Art war auch im

Verlauf der Operation stets die Narkosetiefe zu überprüfen und bei Bedarf durch erneute intraperitoneale Injektion von Ketamin aufrecht zu erhalten.

2.2.3 Lagerung, Fixierung und Materialvorbereitung

Zur weiteren Vorbereitung auf eine schonende Operation und einen möglichst beschwerdefreien postoperativen Zustand wurden die Augen der Ratte mit einer Augensalbe (Bepanthen®) bedeckt. Dorsal subkutan zwischen den Schulterblättern wurde ein Depot von ca. 0,5 ml isotonischer NaCl-Lösung injiziert, um das Risiko einer Volumendepletion zu senken. An den vier Läufen der Ratte wurde jeweils ein Klebestreifen von ca. 4 cm x 1 cm so befestigt, dass die Ratte auf dem Rücken liegend durch Durchstechen des überstehenden Klebebandes mit Stecknadeln auf der Korkunterlage fixiert werden konnte. Das Fell wurde in einem Bereich von ca. 2 cm x 3 cm in der zu katheterisierenden Leiste abrasiert und der Bereich anschließend mit 70% Ethanol desinfiziert. Durch die damit verbundene Befeuchtung konnte außerdem verhindert werden, dass Haare in den Situs verschleppt wurden. Auch das verwendete Operationsbesteck wurde vor Gebrauch mit 70% Ethanol desinfiziert.

Um später zügig die Katheterisierung durchführen zu können, wurde im Vorfeld auch das dazu benötigte Material hergerichtet. Als Katheterschlauch diente ein ca. 20 cm langer Polyethen-Schlauch (ID 0,58 mm, OD 0,96 mm). Die Enden sollten nicht schräg abgeschnitten werden, da die sonst entstehende Spitze später die Gefäßwand perforieren könnte. Die Spitze einer blauen Kanüle (BD Microlance™3 23G 1" Nr. 16) wurde mit Hilfe einer Klemme (FST 13003-10) abgebrochen, so dass das stumpfe Ende nun auf ein Ende des Katheterschlauches gesteckt werden konnte und somit als Adapter für Spritzen diente. Das Kathetersystem wurde mit einem Gemisch von 2 ml Heparin (Liquemin®) pro 100 ml NaCl luftfrei angefüllt und eine Tuberkulin-Spritze mit ca. 0,6 ml desselben Gemisches als Reservoir angehängt. Vom freien Ende des Schlauches her wurde mit wasserfestem Stift ein Abstand von 3 cm markiert. Eine weitere Tuberkulin-Spritze mit der entsprechenden Menge an zu applizierender Testsubstanz wurde bereitgelegt.

2.2.4 Präparation

Zunächst wurde die Haut im Bereich der rasierten Leiste mit einer anatomischen Pinzette (FST 11002-14) leicht angehoben und dann mit einer stumpfen Schere (FST 14000-12) im Verlauf des Ligamentum inguinale ein ca. 2 cm langer Hautschnitt gesetzt. Es folgte distal des Ligamentum inguinale eine vorsichtige Präparation in die Tiefe, indem die Schere geschlossen unter das Hautniveau gebracht wurde und dann durch kontrolliertes Öffnen der Schere Fett und Bindegewebsstrukturen beiseite gedrängt wurden. Dabei war ein äußerst vorsichtiges Vorgehen notwendig, um Blutgefäße, Nerven und Muskulatur nicht zu verletzen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter Verwendung eines binokularen Operationsmikroskops unter 12facher Vergrößerung durchgeführt, um ein exaktes Arbeiten zu ermöglichen. Die Freipräparation des Gefäßnervenstranges aus Vena, Arteria und Nervus femoralis erfolgte mit Wattestäbchen, da mit diesen wesentlich gewebeschonender vorgegangen werden konnte. Vor allem eine Schädigung des Nervs musste unbedingt vermieden werden, da die Ratte ansonsten bei Erwachen aus der Narkose die entsprechende Extremität als nicht mehr zum Körper gehörend ansehen würde. Die medial gelegene Vena femoralis wurde aus dem Gefäßnervenstrang entsprechend dem OP-Feld in möglichst maximaler Länge herauspräpariert. Der letzte Schritt zur Separation der Vene aus dem Gewebebett erfolgte mit Hilfe einer gebogenen Pinzette (14 cm), indem diese entlang des Gefäßverlaufes mehrfach geöffnet und geschlossen wurde.

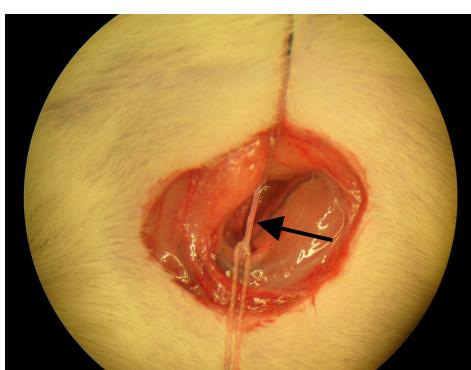


Abb. 5: Freipräpariertes Teilstück der Vena femoralis (Pfeil). Durch Einspannen zwischen zwei Fäden wurde es über das ursprüngliche Niveau im Situs angehoben.

Unter die freipräparierte Vene wurden mit Hilfe der gebogenen Pinzette zwei mit 70% Ethanol befeuchtete Fäden durchgezogen. Mit dem proximalen Faden wurde ein lockerer Knoten um die Vene gelegt und dieser nach oben abgelegt. Der distale Faden wurde an der Grenze von frei liegender Vene zum Gewebe drei Mal fest verknotet. Die möglichst distale Lage des Fadens war dabei wichtig, um eine ausreichende Länge frei liegender Vene für die Katheterisierung zur Verfügung zu haben. Die Enden der Fäden wurden jeweils paarweise mit leichtem Zug in die

entgegengesetzten Richtungen mit Pflasterstreifen (Leukosilk®) auf der Unterlage befestigt und der dazwischenliegende Venenabschnitt somit etwas angehoben (Abb. 5).

Anschließend wurde die Venenwand mit einer feinen Augenschere (FST 15001-08) im distalen aufgespannten Bereich zu ca. 1/3 quer angeschnitten. Um Zittern zu vermeiden und somit genauer arbeiten zu können, wurde die Augenschere mit einem in der anderen Hand gehaltenen Wattetupfer abgestützt. Gleichzeitig konnte so das initial austretende Blut abgetupft werden.

2.2.5 Katheterisierung

Um den Katheterschlauch in die Vene einführen zu können, wurde zunächst mit der rechten Hand eine abgewinkelte Uhrmacherpinzette (FST 11253-21) 0,5 bis 1 cm durch die Öffnung in das Gefäßlumen eingeführt und um ca. 1 mm geöffnet. Dadurch konnte das Lumen aufgedehnt werden, so dass nun der mit der linken Hand mit einer gebogenen Pinzette (14 cm) nahe am freien Ende gehaltene Katheterschlauch zwischen den Pinzettenarmen in die Vene vorgesoben werden konnte. Sobald der Katheter etwa 1 cm an der inneren Venenwand vorgesoben war, wurde die Venenwand mitsamt dem darunter liegenden Katheterschlauch mit der gebogenen Pinzette gefasst, um ein Zurückgleiten des Schlauches zu verhindern. Nun wurde die Uhrmacherpinzette in der rechten Hand gegen eine weitere

gebogene Pinzette (ebenfalls 14 cm) ausgetauscht, mit der der Schlauch vorsichtig gegen das Widerlager der anderen Pinzette 3 cm weit bis zur Markierung vorgesoben werden konnte. Hierzu musste der proximale Faden initial etwas gelockert werden. Dabei war darauf zu achten, dass die Krümmung des Schlauches dem natürlichen Gefäßverlauf entsprach und dass die Gefäßwand nicht perforiert wurde. War die richtige Position erreicht, wurde der Katheter mit einer Bulldogklemme (FST 18050-28) in der Vene fixiert. Zur Bestätigung der korrekten intravenösen

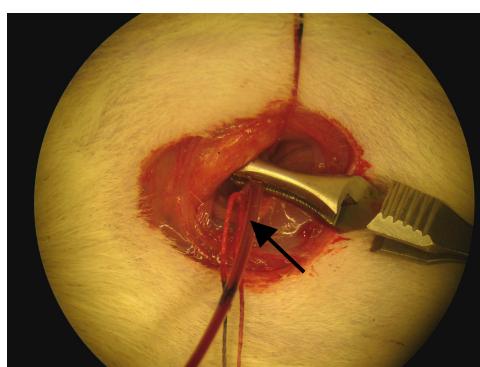


Abb. 6: Mit einer Bulldogklemme fixierter Katheter in der Vena femoralis (Pfeil). Die Aspiration von venösem Blut bestätigt die korrekte intravenöse Lage.

Lage konnte man nun über die angeschlossene Tuberkulinspritze Blut aspirieren (Abb. 6). Anschließend tauschte man die mit Heparin/NaCl gefüllte Spritze gegen die vorbereitete Spritze mit der entsprechenden Menge an Testsubstanz aus, applizierte die gewünschte Substanz und spülte das Totraumvolumen des Schlauchsystems von 130 bis 140 µl wiederum mit ausreichender Menge an Heparin/NaCl durch.

2.2.6 Entfernen des Katheters und Nachbereitung

Nach Applikation der Testsubstanz konnte der Katheter wieder entfernt werden. Dazu wurde der Schlauch vorsichtig wieder zurückgezogen, bis nur noch wenige Millimeter im Venenlumen verblieben waren. Dann wurde der vorher nur locker geknotete Faden ebenfalls drei Mal fest um die Vene verknotet, ohne den Katheterschlauch mit einzubeziehen. So wurde die Vene fest verschlossen, um den Katheter und die Bulldogklemme wieder komplett zu entfernen. Ratten verfügen über ausreichend Kollateralen, so dass die Unterbrechung der Vena femoralis in der Leiste keinen venösen Stau der betroffenen Extremität verursachte. Nachdem alle Fäden kurz oberhalb der Knoten abgeschnitten waren, wurde das OP-Feld gereinigt und die Haut wieder angenähert. Es folgte eine Einzelknopfnaht mit einem nicht resorbierbaren geflochtenen 3/0-Faden (Ethicon®). Über die gesäuberte Naht wurde ein Sprühpflaster aufgetragen. In diesem Zustand konnte man die Ratte in den gut mit Streu gefüllten Käfig legen, der in einem möglichst warmen Raum stehen sollte.

2.3 Organentnahme

Je nach Versuchsaufbau war eine bestimmte Verweildauer der Testsubstanz in der Ratte vorgegeben. Danach wurden die zu untersuchenden Organe entnommen.

Hierzu wurde die Anästhesie der Ratten wie bei der Katheterisierung bereits beschrieben durchgeführt. Sobald Schmerzfreiheit erreicht war, wurde die Ratte in Rückenlage gebracht und das Fell ventralseitig mit 70% Ethanol benetzt, wodurch das Verschleppen von Haaren in den Situs verringert werden konnte.

Als erster Schritt erfolgte die Blutentnahme aus dem schlagenden Herzen bei noch geschlossenem Situs. Nachdem das Herz durch Tasten des Herzschlags lokalisiert worden war, wurden mit einer 2-ml-Spritze und einer orangefarbenen Kanüle (BD Microlance™ 3 25G 1" Nr. 18) intrakardial 1 bis 2 ml Blut aspiriert. Noch vor Einsetzen der Gerinnung wurde das Blut in einem vorbereiteten 2-ml-Reaktionsgefäß zur Gerinnungshemmung mit 20 µl einer 500 mM EDTA-Lösung gemischt.

Zum Eröffnen der Bauchdecke wurde das Fell zunächst mit einer anatomischen Pinzette (FST 11002-14) etwas angehoben und die Haut mit einer stumpfen Schere (FST 14000-12) vertikal eröffnet. Die Bauchdecke wurde vom Rippenbogen bis zur Leiste abpräpariert und beidseits nach lateral weggeklappt. Am kaudalen Rand des OP-Feldes trat die unterschiedlich stark gefüllte Blase zum Vorschein.

Durch Punktions mit einer 2-ml-Spritze und grauer Kanüle (BD Microlance™3 27G ¾" Nr. 20) war es möglich, je nach Füllungszustand der Blase bis zu 2 ml Urin zu entnehmen.

Anschließend konnte der Darm nach lateral aus der Bauchhöhle gedrängt werden, um nacheinander die im Retroperitoneum gelegenen Nieren vom umgebenden Bindegewebe zu befreien und hilär abzutrennen. Linksseitig wurde auf die gleiche Art die kranial gelegene langgestreckte Milz entfernt. Von der unter dem Zwerchfell liegenden Leber wurden 1 bis 2 g des linken Leberlappens entnommen. Schließlich wurde durch einen Schnitt in den Brustkorb ein Zugang geschaffen, durch den Unter- und Mittellappen der rechten Lunge mit einer Schere herausgetrennt werden konnten.

Nach der Entnahme wurden die Organe direkt auf Wägeschälchen (7 ml) gelegt und Blut und Urin in 2-ml-Reaktionsgefäß gefüllt, um anschließend mit einer digitalen Waage die jeweiligen Massen auf 10 mg genau zu bestimmen.

2.4 Versuchsreihe mit Nanopartikeln

2.4.1 Verdünnungsreihe

Im weiteren Verlauf der Versuche sollte der Nachweis der Nanopartikel mit Hilfe der in Kapitel 1.2.4 erläuterten Fluorimetrie erfolgen. Dabei wird die Probe mit einer für die verschiedenen Nanopartikel jeweils spezifischen Wellenlänge angeregt, um dann die Intensität einer emittierten Fluoreszenzstrahlung von wiederum jeweils spezifischer Wellenlänge zu detektieren.

Für die Folgeversuche war es zur Planung der zu verwendenden Mengen an Nanopartikeln zunächst notwendig, die Größenordnung der Nachweisgrenze zu erfassen. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, bei der Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 als verdünnendes Lösungsmittel diente.

5 μ l Nanopartikel wurden wie unten aufgeführt mit 45 μ l bzw. 495 μ l PBS in 1,5-ml-Reaktionsgefäß und mit 4.995 μ l PBS in einem 15-ml-Reaktionsgefäß vereint.

Ohne Verdünnung:	5 μ l Nanopartikel	+	0 μ l PBS
Verdünnung 1/10:	5 μ l Nanopartikel	+	45 μ l PBS
Verdünnung 1/100:	5 μ l Nanopartikel	+	495 μ l PBS
Verdünnung 1/1.000:	5 μ l Nanopartikel	+	4.995 μ l PBS

Die Messungen erfolgten mit einem Fluorimeter (GENios Plus) in einer Mikrotiterplatte. In die Mikrotiterplatte wurden jeweils 5 μ l der separat hergestellten Verdünnungen und je weitere 95 μ l PBS pipettiert. Daraus resultierten je 100 μ l der Endverdünnungen 1:20, 1:200, 1:2.000 und 1:20.000. Als Negativkontrolle dienten 100 μ l PBS. Von jeder Verdünnung wurden drei verschiedene Proben gemessen. Der Versuch wurde mit den Nanopartikeln PtTFPP-PD-COOH (Platin-5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6)-pentafluorophenyl-porphyrin) und Ru(dpp)₃-PAN-COOH durchgeführt.

Einige variable Messgrößen mussten am Fluorimeter entsprechend der bekannten Eigenschaften der verwendeten Nanopartikel eingestellt werden. Dies waren zum einen die Exzitations- und die zu detektierende Emissionswellenlänge. Bei den Partikeln PtTFPP-PD-COOH wurde mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 405$ nm angeregt und die Intensität der Fluoreszenzstrahlung der Wellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 635$ nm gemessen. Bei den Partikeln Ru(dpp)₃-PAN-COOH wurde auf eine Exzitationswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 430$ nm und eine Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 612$ nm eingestellt. Zum anderen unterschied sich die Messung der verschiedenen Partikelsorten in der Zeitspanne zwischen Anregung und Detektion der Emission. Da bei den Partikeln PtTFPP-PD-COOH mehr Zeit bis zum Auftreten der Fluoreszenzstrahlung vergeht und diese dann länger anhält, wurde mit einer Verzögerung von 40 μs nach Anregung gemessen. Bei den Partikeln Ru(dpp)₃-PAN-COOH tritt die Fluoreszenzstrahlung unmittelbarer auf und wäre nach den vorher gewählten 40 μs bereits kaum mehr nachweisbar. Deshalb wurde die Messung sofort (Verzögerung von 0 μs) an die Anregung angeschlossen. Bei beiden Partikelsorten wurde mit 100 Lichtblitzen pro Messung angeregt. Die Zeitdauer, während der die Fluoreszenzstrahlung detektiert wurde, betrug bei beiden Messreihen 100 μs . Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

2.4.2 Verhalten der Nanopartikel bei Zentrifugation

Als nächstes sollte geprüft werden, ob und bei welcher Zentrifugalbeschleunigung sich die Nanopartikel abzentrifugieren lassen. Dazu wurden zunächst 210 μl einer 1:3-Stammlösung aus 70 μl Nanopartikeln und 140 μl PBS hergestellt. Dann wurden jeweils zwei Proben verschiedener Zusammensetzungen jeweils bei sieben verschiedenen Beschleunigungen 1 h lang bei Raumtemperatur zentrifugiert: 1.000 g, 3.000 g, 10.000 g, 30.000 g, 100.000 g, 150.000 g und 200.000 g.

Insgesamt benötigte man also je 14 der folgenden Proben. Probe 1 setzte sich zusammen aus 5 μl der Stammlösung und 150 μl PBS, Probe 2 aus 5 μl der Stammlösung und 150 μl eines Puffers aus

1x PBS

8 M Harnstoff

1% Triton X-100.

Die identisch behandelten Negativkontrollen bestanden aus 150 µl PBS bzw. 150 µl des genannten Puffers. Die je zwei Positivkontrollen wurden nicht zentrifugiert und entsprachen in ihrer Zusammensetzung den zu zentrifugierenden Proben, enthielten also je 5 µl der Stammlösung mit 150 µl der beiden Puffer.

Die Zentrifugationen mit 1.000 g, 3.000 g und 10.000 g wurden mit einer Haereus-Tischzentrifuge durchgeführt, deren Rotor einen Radius von $r = 85$ mm hatte. Bei 30.000 g, 100.000 g, 150.000 g und 200.000 g wurde eine Ultrazentrifuge (Optima™, Beckman Coulter™) mit einem TLA-55 Rotor mit Radius $r = 71,1$ mm verwendet. Die Ultrazentrifuge wurde immer mit speziellen 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Microfuge® Tube) betrieben. Die am Gerät einzustellende Umdrehungszahl pro Minute (revolutions per minute, rpm) wurde bei gegebener Erdbeschleunigung $g = 9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$ wie folgt berechnet:

$$\text{rpm} = f \cdot 60 \text{ s} = \frac{\omega}{2\pi} \cdot 60 \text{ s} = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{a_r}{r}} \cdot 60 \text{ s},$$

wobei die aufgeführten Variablen und Gleichungen als Grundlage dienten:

f	Frequenz in Hertz
revolutions per minute	$\text{rpm} = f \cdot 60 \text{ s}$
Winkelgeschwindigkeit	$\omega = 2\pi f$
Betrag der Zentrifugalbeschleunigung	$a_r = r \omega^2$

Daraus ergaben sich folgende Werte für die rpm-Einstellungen:

(1) Haereus-Tischzentrifuge, $r = 85$ mm:

$a_r = 1.000 \text{ g}$	$3,2 \times 10^3 \text{ rpm}$
$a_r = 3.000 \text{ g}$	$5,6 \times 10^3 \text{ rpm}$
$a_r = 10.000 \text{ g}$	$10 \times 10^3 \text{ rpm}$

(2) Ultrazentrifuge, TLA-55 Rotor, $r = 71,1$ mm:

$a_r = 30.000$ g	$19,4 \times 10^3$ rpm
$a_r = 100.000$ g	$35,5 \times 10^3$ rpm
$a_r = 150.000$ g	$43,4 \times 10^3$ rpm
$a_r = 200.000$ g	$50,2 \times 10^3$ rpm

Nach der Zentrifugation wurden $100 \mu\text{l}$ des Überstandes entnommen und zur Messung in die Mikrotiterplatte (Greiner, Frickehausen) pipettiert. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde wiederum in $150 \mu\text{l}$ PBS bzw. des hergestellten Puffers aufgenommen und davon ebenfalls $100 \mu\text{l}$ zur Messung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Der Versuch wurde identisch durchgeführt für die Nanopartikel PtTFPP-PD-COOH und Ru(dpp)₃-PAN-COOH, wobei die Messung mit den in 2.3.1 beschriebenen partikelspezifischen Einstellungen im Fluorimeter (GENios Plus) erfolgte.

2.4.3 Zentrifugation der Nanopartikel in Harnstoffverdünnungen

In der nächsten Versuchsreihe sollte untersucht werden, welchen Effekt die Konzentration von Harnstoff im Puffer auf die Abzentrifugierbarkeit der Nanopartikel hat. Im Vorversuch hatte der Puffer (neben 1x PBS und 1% Triton X-100) eine Harnstoffkonzentration von 8 M (Puffer 1). Also wurde zunächst ein weiterer Puffer ganz ohne Harnstoff nur aus 1x PBS und 1% Triton X-100 bereitgestellt (Puffer 2), der zur Verdünnung des harnstoffhaltigen Puffers diente. Von der folgenden Verdünnungsreihe wurden jeweils zwei Proben hergestellt:

4 M Harnstoff (Verdünnung 1:2):	$5 \mu\text{l}$ Nanopartikel + $500 \mu\text{l}$ Puffer 1 + $500 \mu\text{l}$ Puffer 2
2 M Harnstoff (Verdünnung 1:4):	$5 \mu\text{l}$ Nanopartikel + $250 \mu\text{l}$ Puffer 1 + $750 \mu\text{l}$ Puffer 2
1 M Harnstoff (Verdünnung 1:8):	$5 \mu\text{l}$ Nanopartikel + $125 \mu\text{l}$ Puffer 1 + $875 \mu\text{l}$ Puffer 2
0 M Harnstoff:	$5 \mu\text{l}$ Nanopartikel + $0 \mu\text{l}$ Puffer 1 + $1.000 \mu\text{l}$ Puffer 2

Alle Proben der Verdünnungsreihe wurden in der Ultrazentrifuge (Beckman CoulterTM) bei Raumtemperatur für jeweils 1 h bei 150.000 g (43×10^3 rpm) zentrifugiert. Von jeder Probe wurden $100 \mu\text{l}$ des Überstandes zur Messung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und der

restliche Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl des harnstofflosen Puffers 2 resuspendiert und davon wiederum 100 µl zur Messung in die Mikrotiterplatte überführt.

Der Versuch erfolgte wie auch schon in den vorherigen Versuchen mit den Nanopartikeln PtTFPP-PD-COOH und Ru(dpp)₃-PAN-COOH. Auch die Einstellungen der Messung mit dem Fluorimeter (GENios Plus) entsprachen den in 2.4.1 beschriebenen.

Mit den Partikeln Ru(dpp)₃-PAN-COOH wurde der Versuch zusätzlich in einer modifizierten Form durchgeführt. Die Verdünnungsreihe bezog sich wiederum auf die Konzentration von Harnstoff im Puffer, jedoch enthielt dieser zusätzlich noch 1% SDS. Als Ausgangssubstanz wurde ein Puffer 3 hergestellt aus

1x PBS

1% Triton X-100

1% SDS

8 M Harnstoff.

Der zum Verdünnen verwendete Puffer 4 enthielt dieselben Bestandteile wie Puffer 3, jedoch ohne den Harnstoff. Die Verdünnungsreihe setzte sich wie folgt zusammen:

8 M Harnstoff:	10 µl Nanopartikel	+	500 µl Puffer 3
1 M Harnstoff:	10 µl Nanopartikel	+	63 µl Puffer 3 + 437 µl Puffer 4
0,5 M Harnstoff:	10 µl Nanopartikel	+	31 µl Puffer 3 + 469 µl Puffer 4
0,25 M Harnstoff:	10 µl Nanopartikel	+	16 µl Puffer 3 + 484 µl Puffer 4

Es wurden wiederum je zwei Proben mit den Partikeln Ru(dpp)₃-PAN-COOH hergestellt und mit der Ultrazentrifuge bei 150.000 g für 1 h zentrifugiert (Raumtemperatur). Vom Überstand wurden 100 µl zum Messen in die Mikrotiterplatte pipettiert, der Rest des Überstandes wurde verworfen. Das Pellet wurde in weiteren 500 µl des jeweiligen Puffergemisches aufgenommen und auch hiervon 100 µl für die Messung verwendet. Von der Positivkontrolle, die 10 µl der Nanopartikel und 500 µl des Puffers aus 1x PBS, 1% Triton X-100, 1% SDS und 8 M Harnstoff enthielt, und der Negativkontrolle, die nur aus dem genannten Puffer bestand, wurden ebenfalls jeweils zwei Mal 100 µl ohne vorheriges Zentrifugieren gemessen.

2.4.4 Zentrifugation der Nanopartikel in Nierenlysat

Ziel der nächsten Versuche war es, aus einem Gemisch Nierenlysat und Nanopartikeln zuerst die Gewebsbestandteile durch Zentrifugation wieder abzutrennen, um danach die Nanopartikel im Fluorimeter wieder nachweisen zu können.

Versuch 1

Dazu wurden einer Ratte wie in 2.3 beschrieben die Nieren entfernt und diese mit einer kleinen Schere grob zerkleinert. Die Nieren wurden zusammen mit einem Puffer in ein Reaktionsgefäß (50 ml) gegeben, so dass die Endkonzentrationen 1x PBS, 1% Triton X-100 und 8 M Harnstoff betrugen, und für 60 s mit einem rotierenden Messer auf maximaler Stufe (30) homogenisiert.

Danach wurde für die Nanopartikel PtTFPP-PD-COOH und Ru(dpp)₃-PAN-COOH jeweils ein Probenpaar aus 5 µl Nanopartikel mit 150 µl des Gewebshomogenisats und aus 5 µl Nanopartikel mit 150 µl des bereits zur Homogenisierung verwendeten Puffers in 1,5-ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Alle Probenpaare wurden in der Tischzentrifuge für 1 h bei 10.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Auf diese Weise sollten größere Gewebsbestandteile entfernt werden. Zu 100 µl des Überstandes wurden 660 µl eines keinen Harnstoff enthaltenden Puffers aus 1x PBS und 1% Triton X-100 zusammen mit 40 µl 20% SDS gegeben, so dass im Endvolumen von 800 µl die Konzentrationen von 1% SDS und 1 M Harnstoff erreicht wurden. Die Proben wurden für 1 h bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine weitere Zentrifugation bei 10.000 g, durch die auch kleinere Gewebsbestandteile entfernt werden sollten, die erst durch das zugegebene SDS homogenisiert worden waren. Vom erhaltenen Überstand wurden 700 µl für eine weitere Stunde bei 150.000 g mit der Ultrazentrifuge pelletiert. Für die fluorimetrische Messung wurden nun vom Überstand 100 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert, während das Pellet in 700 µl eines Puffers aus 1x PBS, 1% Triton X-100, 1 M Harnstoff und 1% SDS aufgenommen wurde. Hiervon dienten ebenfalls jeweils 100 µl der Messung. Ohne vorherige Zentrifugation wurden die Positivkontrolle aus 5 µl Nanopartikel mit 700 µl Puffer (1x PBS,

1% Triton X-100, 1 M Harnstoff und 1% SDS) und die Negativkontrolle aus 700 µl desselben Puffers gemessen.

Versuch 2

Die Durchführung von Versuch 2 erfolgte analog zu Versuch 1. Zusätzlich zu den Probenpaaren aus anfangs 5 µl Nanopartikel mit 150 µl Gewebshomogenisat bzw. Puffer durchlief ein weiteres Probenpaar aus lediglich 150 µl Gewebshomogenisat alle genannten Schritte. Außerdem wurde ein Probenpaar hinzugefügt, bei dem in allen betroffenen Schritten die Zugabe von SDS entfiel. Infolgedessen konnte hier auch auf die einstündige Inkubation bei 65°C mit anschließender zweiter Zentrifugation bei 10.000 g verzichtet werden. Positiv- und Negativkontrolle wurden ebenfalls identisch zu Versuch 1 hinzugenommen.

Die Messung der Partikel PtTFPP-PD-COOH erfolgte zweifach: Zusätzlich zu der bisher üblichen Fluorimetereinstellung mit einer Verzögerung von 40 µs zwischen Anregung und Detektion der Fluoreszenzstrahlung wurde zum Vergleich eine weitere Messreihe ohne Messverzögerung (Verzögerung von 0 µs) erstellt.

Versuch 3

In Versuch 3 wurden die Nieren zweier Mäuse entnommen und mit einer digitalen Waage (Sartorius, Göttingen) deren Massen bestimmt. Die Nieren wurden einzeln mit einer kleinen Schere grob zerkleinert. Anschließend wurde ausgehend von den Massen jeweils die 9fache Menge eines Puffers aus 1x PBS und 8 M Harnstoff zugegeben. Die Proben wurden 60 s lang mit einem rotierenden Messer bei maximaler Stärke homogenisiert. Um dabei übermäßiges Schäumen zu vermeiden, wurde 10%iges Triton X-100 erst nach der Bearbeitung mit dem rotierenden Messer entsprechend der gemessenen Massen zugegeben. Zu den rechten Nieren wurden je 10 µl Nanopartikel pipettiert und durch vorsichtiges mehrmaliges Aufziehen in die Pipette eingemischt, wobei dieser und die folgenden Versuche nur noch mit PtTFPP-PD-COOH durchgeführt wurden. Die folgende Übersicht zeigt die verschiedenen Volumina der verwendeten Substanzen:

Maus 1:

linke Niere: 200 mg	rechte Niere: 160 mg
- 1.800 µl Puffer (1x PBS, 8 M Harnstoff)	- 1.440 µl Puffer
- 200 µl 10% Triton X-100	- 160 µl 10% Triton X-100
	- 10 µl Nanopartikel

Maus 2:

linke Niere: 130 mg	rechte Niere: 150 mg
- 1.170 µl Puffer (1x PBS, 8 M Harnstoff)	- 1.350 µl Puffer
- 130 µl 10% Triton X-100	- 150 µl 10% Triton X-100
	- 10 µl Nanopartikel

Von allen vier Proben und von einem Gemisch aus 5 µl Nanopartikeln und 3 ml Puffer (1x PBS, 1% Triton X-100 und 8 M Harnstoff) wurden je 1.400 µl entnommen und in 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Diese wurden mit der Tischzentrifuge (10.000 g, 1 h, Raumtemperatur) zentrifugiert, um größere Gewebsbestandteile zu entfernen. Weiterverwendet wurden 1.100 µl jedes Überstandes, zu dem je 55 µl 20% SDS zugegeben wurden, so dass die Endkonzentration des SDS 1% betrug. Alle Proben wurden bei 65°C für 1 h inkubiert und wiederum für 1 h bei 10.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Von dem nun weitgehend von Gewebsbestandteilen befreiten Überstand wurden 1.000 µl in der Ultrazentrifuge für 1 h bei 150.000 g zentrifugiert.

Für die Messung wurden 100 µl jedes Überstandes und jedes in 700 µl Puffer (1x PBS, 1% Triton X-100, 1 M Harnstoff und 1% SDS) aufgenommenen Pellets in eine Mikrotiterplatte pipettiert. 100 µl desselben Puffers dienten als Negativkontrolle, die Positivkontrolle stellten 100 µl eines Gemisches aus 5 µl Nanopartikel und 2 ml des Puffers dar, die vorher nicht zentrifugiert worden waren.

Versuch 4

Von der Grundstruktur her analog zu Versuch 3 wurde auch Versuch 4 durchgeführt. Nach entsprechender Berechnung ergaben sich für die verwendeten Substanzen folgende Volumina:

Maus 1:

linke Niere: 220 mg	rechte Niere: 260 mg
- 1.980 µl Puffer (1x PBS, 8 M Harnstoff)	- 2.340 µl Puffer
- 220 µl 10% Triton X-100	- 260 µl 10% Triton X-100
	- 10 µl Nanopartikel

Maus 2:

linke Niere: 300 mg	rechte Niere: 320 mg
- 2.700 µl Puffer (1x PBS, 8 M Harnstoff)	- 2.880 µl Puffer
- 300 µl 10% Triton X-100	- 320 µl 10% Triton X-100
	- 10 µl Nanopartikel

Im Unterschied zum Vorversuch wurde jeweils mit dem kompletten Gewebshomogenisat weitergearbeitet, von dem jede Probe auf zwei 2-ml-Reaktionsgefäße verteilt wurde. Die fünfte Probe bestand aus 2 ml einer Stammlösung aus 5 µl Nanopartikel und 3 ml Puffer (1x PBS, 1% Triton X-100 und 8 M Harnstoff). Nach der Zentrifugation bei 10.000 g wurde wiederum der komplette Überstand weiter verwendet. Die Volumina der einzelnen Proben wurden durch Aufziehen in eine 5-ml-Pipette bestimmt, um 20%iges SDS mit einem Volumen von 1/20 des Probenvolumens zuzugeben, so dass der SDS-Anteil wieder bei 1% lag. Nach der Inkubation bei 65°C erfolgte eine Dialyse, um den Harnstoff weitestgehend aus den Proben zu entfernen. Hierzu wurden vom vorbereiteten Dialyseschlauch ca. 10 cm lange Stücke abgeschnitten, in die die Proben gefüllt wurden. Die offenen Schlauchenden wurden dabei mit Plastikklammern verschlossen. So wurden die Proben zweimal für jeweils 1 h in eine Dialyseflüssigkeit von 1.750 ml, bestehend aus 1x PBS und 1% SDS, gelegt, wo unter leichtem Umrühren mit einem Magnetstab die Dialyse stattfand. Im Anschluss erfolgte die zweite Zentrifugation bei 10.000 g. Für die Ultrazentrifugation bei 150.000 g wurde wie auch schon in den vorangegangenen Schritten der gesamte Überstand verwendet, indem er auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt wurde. Die Messung erfolgte inklusive der Positiv- und Negativkontrolle analog zum Vorversuch mit jeweils 100 µl Probenvolumen.

Versuch 5

In Versuch 5 wurden wiederum einer Ratte beide Nieren entfernt und mit einer Schere zerkleinert. Analog zu den Versuchen 3 und 4 wurden abhängig von den jeweiligen Massen der Nieren zunächst Puffer (1x PBS und 8 M Harnstoff) und nach der Homogenisierung mit dem rotierenden Messer Triton X-100 und Nanopartikel in den folgenden Mengen zugegeben:

linke Niere: 1,43 g	rechte Niere: 1,50 g
- 12,87 ml Puffer (1x PBS, 8 M Harnstoff)	- 13,5 ml Puffer
- 1,43 ml 10% Triton X-100	- 1,5 ml 10% Triton X-100
	- 20 µl Nanopartikel

Beide Proben wurden wie im Vorversuch komplett weiterverwendet, indem sie zur Zentrifugation auf je 8 2-ml-Reaktionsgefäß aufgeteilt wurden. Auf die zusätzliche Probe aus Puffer und Nanopartikeln wurde verzichtet. Nach der Zentrifugation ergaben sich für die Überstände Volumina von 14,5 ml der linken und 15,0 ml der rechten Niere. Um auf eine Endkonzentration von 1% SDS zu kommen, wurden 0,73 ml bzw. 0,75 ml entsprechend 1/20 SDS hinzugefügt. Inkubation, Dialyse in ca. 15 cm langen Schlauchstücken, Zentrifugation und Ultrazentrifugation wurden analog zum vorhergehenden Versuch 4 jeweils mit den vollständigen Volumina durchgeführt. Zur Messung dienten je 100 µl der Überstände und der Pellets, die zuvor in 150 µl H₂O bidest aufgenommen worden waren. Direkt der Messung zugeführt wurden 100 µl eines alle Komponenten enthaltenden Puffers (1x PBS, 1% Triton X-100, 1 M Harnstoff und 1% SDS) als Negativkontrolle und 100 µl aus 5 µl Nanopartikeln in 3 ml desselben Puffers als Positivkontrolle. Um die Reproduzierbarkeit des von der Durchführung her ausgereiften Versuchs 5 zu prüfen, wurde er mit gleicher Arbeitsschrittfolge wiederholt.

2.4.5 Beeinflussung der Ergebnisse durch technische Verfahren

Verwendung unterschiedlicher Lösungsmedien

Ziel des Versuches war es, den Einfluss von Begleitsubstanzen, in denen die Nanopartikel gelöst sind, auf das Messergebnis der Fluorimetrie zu untersuchen. Dazu wurde eine Stammlösung aus Nanopartikeln (PtTFPP-PD-COOH) und H₂O im Verhältnis 5:1 hergestellt. Anschließend wurden in einer Mikrotiterplatte jeweils 5 µl der Stammlösung in 95 µl verschiedener anderer Lösungen im Fluorimeter mit bekannter Einstellung gemessen. Als Medien wurden verwendet:

- H₂O bidest
- 1x PBS
- Puffer aus 1x PBS, 8 M Harnstoff, 1% Triton X-100, 1% SDS
- 8 M Harnstoff
- 1% Triton X-100
- 1% SDS

Verfahren zum Auflösen des Pellets

Im folgenden Versuch wurden unterschiedliche Methoden und Substanzen zum Auflösen des Pellets verglichen. Als Ausgangsmaterial dienten 20 1,5-ml-Reaktionsgefäß aus fünf Probenpaaren mit 5 µl Nanopartikeln (PtTFPP-PD-COOH) und 500 µl eines Puffers aus 1x PBS, 1 M Harnstoff, 1% Triton X-100 und 1% SDS sowie fünf Probenpaaren aus 5 µl Nanopartikeln und 500 µl H₂O bidest. Alle Reaktionsgefäß wurden für 1 h bei 20°C mit 150.000 g ultrazentrifugiert. Von jedem Überstand wurden 100 µl zur Messung verwendet, der restliche Überstand wurde verworfen. Dem Pellet wurden entsprechend der Ausgangsproben 500 µl entweder des Puffers oder von H₂O bidest zugegeben. Beim jeweils ersten Probenpaar der Puffer- und der H₂O-Gruppe wurde das Pellet nur durch mehrfaches Einziehen in die Pipette in das neue Medium aufgenommen. Die beiden zweiten Probenpaare wurden anschließend zusätzlich für 1 h bei 65°C inkubiert. Bei den folgenden drei

Probenpaaren wurde das Pellet resuspendiert, indem für 15 s ein Ultraschallkopf mit 30%, 60% bzw. 90% seiner Leistung in das Reaktionsgefäß gehalten wurde. Als Negativkontrollen wurden 100 µl zweier Proben mit nur Puffer bzw. H₂O und als Positivkontrollen von 5 µl der Nanopartikel in 500 µl Puffer bzw. H₂O wiederum 100 µl gemessen.

2.4.6 Systemische i.v.-Injektion der Nanopartikel in Ratten

Die folgenden Versuche stellten die Hauptexperimente der Versuchsreihe dar, während die vorhergehenden Schritte der Etablierung einer geeigneten Methode dienten.

Nun wurden wie in 2.1 beschrieben Nanopartikel über je einen Katheter in der Vena femoralis in den Blutkreislauf zweier Ratten injiziert. Es wurde zunächst ein Volumen von 20 µl der Partikel PtTFPP-PD-COOH in 150 µl NaCl (Delta Select, Pfullingen) verwendet. Die Verweildauern betrugen 30 min und 2 h. Nach der angegebenen Zeit wurden mit der in 2.3 erläuterten Methode jeweils linke und rechte Niere, Leber und Lunge entnommen. Die Organe wurden gemäß des in den Vorversuchen 5 und 6 des Kapitels 2.4.4 angewendeten Verfahrens gewogen und entsprechend der Massen die neunfache Menge an Puffer (1x PBS, 8 M Harnstoff) hinzupipettiert. Nach der einminütigen Homogenisierung mit dem rotierenden Messer wurde 1/10 Volumen an 10%igem Triton X-100 dazugegeben, die Proben gemischt und 15 min stehen gelassen. Aufgeteilt auf mehrere 2-ml-Reaktionsgefäß wurde das gesamte Probenmaterial bei 10.000 g für 1 h zentrifugiert. Von den Überständen wurden erneut die Volumina bestimmt und 1/20 20% SDS zugegeben. Es folgte die einstündige Inkubation bei 65°C. Für die zwei anschließenden Dialyse Schritte wurden die Proben in ca. 15 cm lange Dialyseschlauchstücke umgefüllt, die an beiden Enden mit Plastikklemmen verschlossen wurden. Für jeweils 1 h wurden die Proben gegen 1.750 ml aus 1x PBS und 1% SDS dialysiert. Wiederum aufgeteilt auf mehrere 2-ml-Reaktionsgefäß wurde die zweite einstündige Zentrifugation bei 10.000 g zur Entfernung von Gewebebestandteilen durchgeführt. Der Überstand wurde in spezielle, maximal 25 ml fassende Zentrifugenrörchen (Nalgene™, Ultra Plus™) pipettiert und mit einer großen Ultrazentrifuge (Kontron TFT 55.38 Rotor, Centricon T-1170) für 1 h bei 150.000 g (37.000 rpm) abzentrifugiert. Vom Überstand wurden je 100 µl für die Messung im Fluorimeter verwendet und der restliche Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl H₂O bidest resuspendiert,

so dass auch hier 100 µl für die Messung zur Verfügung standen. Als Negativkontrolle wurden 100 µl 1x PBS gemessen. Die folgende Tabelle zeigt die im Versuch verwendeten Volumina.

Partikel: PtTFPP-PD-COOH (20 µl in 150 µl NaCl)

Verweildauer: 30 min

	linke Niere	rechte Niere	Leber	Lunge
m / g	1,47	1,53	1,51	0,86
V (Puffer) / ml	13,2	13,8	13,6	7,74
V (Triton X-100) /ml	1,47	1,53	1,51	0,86
V (Überstand) / ml	15	16	15	9
V (SDS) / µl	750	800	750	450

Verweildauer: 2 h

	linke Niere	rechte Niere	Leber	Lunge
m / g	1,34	1,54	1,46	0,79
V (Puffer) / ml	12,1	13,9	13,1	7,11
V (Triton X-100) /ml	1,34	1,54	1,46	0,79
V (Überstand) / ml	13,5	15,0	14,0	7,7
V (SDS) / µl	675	750	700	385

Die folgenden Versuche wurden immer nach demselben soeben dargestellten Schema durchgeführt. Das Volumen der injizierten Nanopartikel wurde auf 200 µl festgelegt und die Verweildauer auf 30 min und 24 h standardisiert. Die zu untersuchenden Proben wurden wie in 2.3 erläutert auf linke und rechte Niere, Leber, Lunge, Milz, Blut und Urin erweitert. Blut und Urin wurden nach Abpelletierung der größeren z.B. zellulären Bestandteile bei 10.000 g gleich bei 150.000 g ultrazentrifugiert und der Messung zugeführt, da hier kein Gewebeverbund homogenisiert werden musste. Alle Einzelexperimente wurden nach Möglichkeit doppelt durchgeführt, so dass von einer Partikel sorte im Idealfall vier Messreihen existieren. Nur von den Partikeln PtTFPP-PD-COOH wurde die doppelte Anzahl von acht Messreihen erstellt. Bei einer Negativkontrolle durchliefen die Proben ohne vorherige Nanopartikel-Injektion dieselben Schritte wie die zu analysierenden Organmaterialien.

Zur Messung wurden abhängig von der Partikelsorte zwei verschiedene Fluorimeter verwendet. Die Partikel PtTFPP-PD-COOH (8 Messreihen), PS-Pt (4 Messreihen) und PD-Pt-PEG (2 Messreihen aufgrund Materialmangel) wurden mit dem bekannten Gerät (GENios Plus) in einer Mikrotiterplatte gemessen. Für die Partikel Ru(dpp)₃-PAN-COOH (2 Messreihen), Ru(dpp)₃-PAN-PEG-NH₂ (4 Messreihen) und Ru(dpp)₃-PAN-PEG-OH (4 Messreihen) wurde ein genaueres Gerät verwendet, das am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg von Mitarbeitern etabliert und auf die Eigenschaften der Nanopartikel abgestimmt worden war. Für dieses Gerät wurden Mikrotiterplatten mit transparentem Boden verwendet.

2.4.7 Anfertigung von Gefrierschnitten

Um die Nanopartikel im Gewebe auch mit dem Fluoreszenzmikroskop nachweisen zu können, wurden Gefrierschnitte angefertigt. Zunächst wurden der zu untersuchenden Ratte analog zu Kapitel 2.2 Nanopartikel (PtTFPP-PD-COOH bzw. PD-Pt-PEG) intravenös verabreicht. Nach einer Verweildauer von 30 min wurde eine Perfusionsfixierung durchgeführt. Dazu wurde die Perfusionslösung aus Paraformaldehyd (PFA) in die zuführende Flasche eines Kompressors (Jun-Air) gefüllt und luftfrei in das Schlauchsystem weitergeleitet. Das freie Ende des Schlauchsystems stellte ein dünner Schlauch dar, der in die Aorta der Ratte eingeführt werden konnte.

Nach der Anästhesie wurden die Läufe der Ratten wie bei der Katheterisierung mit Klebebändern umwickelt und die Ratte durch diese mit Stecknadeln in Rückenlage auf einer Korkunterlage befestigt (siehe auch Kapitel 2.2 und 2.3). Nach Bestreichen des Fells mit 70% Ethanol wurde das Fell einschließlich des Peritoneums unter Zuhilfenahme einer chirurgischen Pinzette entlang der Linea alba mit einer Schere eröffnet und nach lateral aufgeklappt. Der Darm wurde nach rechts beiseite geschoben, so dass die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior stumpf mit einem Stück gefaltetem Papiertuch freipräpariert werden konnten. Mit Hilfe einer gebogenen Pinzette wurde ein Faden unter Aorta und Vena cava hindurchgeführt und ein lockerer Knoten gelegt. Mit zwei Klemmen wurden Arteria und Vena iliaca communis beidseits und mit einer Bulldogklemme die Aorta kaudal der Arteriae renales abgeklemmt. Nun konnte mit einer feinen Augenschere die Aorta quer angeschnitten

und das freie Schlauchende des Kompressorsystems in die Öffnung bis zur Bulldogklemme vorgeschoben werden. Durch Zuziehen und festes Verknoten des Fadens wurde der Schlauch in der Aorta fixiert und die Vena cava gleichzeitig punktuell verschlossen. Schließlich wurde die Vena cava kranial des Fadens angeschnitten und die Bulldogklemme entfernt. Durch Öffnen des Dreiwegehahns wurde der Kompressordruck von 0,2 bar in das System freigegeben und das Gefäßsystem der Ratte 3 min lang perfundiert. Nachdem das Kompressorsystem wieder verschlossen worden war, wurden Nieren, Leber, Lunge und Milz entnommen. Mit einer Rasierklinge wurden vorsichtig soweit möglich hilusnahe Stücke zur Anfertigung von Gefrierschnitten abgetrennt. Dabei durfte die Gewebestruktur nicht beschädigt werden. Die Organproben wurden in verschließbaren Plastikbehältnissen in einer Lösung aus 18% Saccharose und 1x PBS bei 4°C für mindestens 4 h aufbewahrt, bis sie in der Lösung abgesunken waren, um ein möglichst gleichmäßiges Einfrieren der Gewebe zu erreichen.

Die Präparate wurden zur Einbettung in ca. 1 x 1 x 1 cm große Formen aus Aluminiumfolie gelegt und mit flüssigem Gefriermedium (Tissue-Tek) umgossen. Zum Einfrieren wurden sie auf einen mit flüssigem Stickstoff umgebenen Metallblock gestellt. Die eingefrorenen Gewebeblöcke wurden bei –80°C gelagert bzw. zur weiteren Verarbeitung wiederum mit Tissue-Tek auf metallenen Präparatehaltern befestigt, so dass sie im Kryomikrotom befestigt werden konnten. Im Inneren des Gerätes herrschte eine Temperatur von –20°C. Es folgte die Anfertigung der Schnitte zunächst im Trimmschnitt der Dicke 50 µm bis zum Erreichen der relevanten Schnittebene. Die Schichtdicke der zu betrachtenden mikroskopischen Präparate betrug 10 µm. Die Präparate wurden auf Super Frost® Plus Objektträger aufgebracht und bei –20°C gelagert. Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Schnitte unter Verwendung des Einbettmediums DePeX möglichst luftblasenfrei mit einem Deckglas eingebettet. Die fertigen Schnittpräparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) unter Verwendung eines DAPI-Filters ausgewertet. Die Objektive lieferten 10-, 20- und 40fache Vergrößerung, wobei zur 40fachen Vergrößerung ein Immersionsöl (Immersol™, Zeiss) zwischen Objektträger und Objektiv eingebracht wurde. Mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera (DMC 2, Polaroid) wurden die Schnittbilder abfotografiert und einem Rechner mit entsprechender Software zugeführt.

2.5 Versuchsreihe mit Quantenpunkten

2.5.1 Verdünnungsreihe

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden durchgeführt mit Quantenpunkten (Q-Dots) der Bezeichnung PEG-PE-QD aus CdSe und ZnS. Die Halbwertsbreite (FWHM: Full Width at Half Maximum) betrug 28 nm, $E_{\max} = 535$ nm.

Zur Prüfung der Nachweisbarkeit wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, bei der 1x PBS als Verdünnungsmedium diente. Zunächst wurden die Stammlösungen nach folgendem Schema hergestellt:

Verdünnung 0:		5 μ l Q-Dots	+	0 μ l PBS
Verdünnung 1:	1 : 10	5 μ l Q-Dots	+	45 μ l PBS
Verdünnung 2:	1 : 100	5 μ l Q-Dots	+	495 μ l PBS
Verdünnung 3:	1 : 1.000	5 μ l Q-Dots	+	4.995 μ l PBS
Negativkontrolle:	0 : 1	0 μ l Q-Dots	+	5 μ l PBS

Zur Messung im Fluorimeter (GENios Plus) wurden jeweils in 3facher Ausführung 5 μ l der Stammlösungen der Verdünnungsreihe und 95 μ l PBS in eine Mikrotiterplatte pipettiert, so dass die Endverdünnungen 1:20, 1:200, 1:2.000 und 1:20.000 resultierten. Die Quantenpunkte wurden mit $\lambda_{\text{ex}} = 405$ nm angeregt und die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm detektiert. Alle Proben wurden mit den Verzögerungszeiten 0 μ s, 5 μ s, 10 μ s, 20 μ s und 40 μ s zwischen Exzitation und Emission gemessen. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob sich die Quantenpunkte durch eine länger anhaltende Fluoreszenzstrahlung von der gewebeeigenen Hintergrundstrahlung abgrenzen lassen. Das Experiment wurde mit einer weiteren Ausgangsprobe an Quantenpunkten derselben Sorte mit besserer Leuchtkraft wiederholt.

2.5.2 Verhalten der Quantenpunkte bei Zentrifugation

Wie auch bei den Nanopartikeln wurde untersucht, ob und bei welcher Zentrifugalbeschleunigung sich die Quantenpunkte abzentrifugieren lassen. Die hier verwendete Stammlösung bestand aus 110 µl der höherpotenten Quantenpunkte aus 2.5.1 und 110 µl 1x PBS. Auf Grundlage dieser Stammlösung wurden zwei Probenpaare in jeweils siebenfacher Ausführung hergestellt. Die Probenpaare 1 setzten sich zusammen aus 5 µl der Stammlösung und 150 µl PBS, während die Probenpaare 2 neben 5 µl der Stammlösung noch 150 µl eines Puffers aus 1x PBS, 8 M Harnstoff und 1% Triton X-100 enthielten. Je ein Probenpaar beider Zusammensetzungen wurde für 1 h bei 1.000 g, 3.000 g, 10.000 g, 30.000 g, 100.000 g, 150.000 g und 200.000 g zentrifugiert. 100 µl der Überstände wurden zur Messung in eine Mikrotiterplatte pipettiert, der restliche Überstand wurde jeweils verworfen. Jedes der Pellets wurde in 150 µl 1x PBS resuspendiert, so dass wiederum 100 µl für die Messung zur Verfügung standen. Als Negativkontrollen wurden vier Proben 1x PBS und vier Proben des Puffers eingesetzt. Die Messung mit $\lambda_{\text{ex}} = 405$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm wurde vergleichend mit den Verzögerungszeiten 0 µs und 10 µs durchgeführt.

2.5.3 Systemische i.v.-Injektion der Quantenpunkte in Ratten

Zur systemischen Verabreichung von je 200 µl Quantenpunkten wurde zwei Ratten wie in 2.2 beschrieben je ein Katheter in die Vena femoralis gelegt. Die Verweildauern der Quantenpunkte im Kreislauf der Ratten betrugen 30 min und 24 h. Die anschließende Organentnahme erfolgte analog zu 2.3. Die weiterführende Bearbeitung der Proben wurde nach dem Schema von 2.4.6 durchgeführt. Für die Messung in der Mikrotiterplatte war das Fluorimeter (GENios Plus) auf eine Exzitation von $\lambda_{\text{ex}} = 405$ nm und eine Emission von $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm eingestellt, als Verzögerungszeiten wurden 10 µs, 20 µs und 30 µs gewählt. Eine Negativkontrolle aus Gewebshomogenisaten ohne vorherige Injektion von Quantenpunkten wurde bei gleichen Einstellungen gemessen.

2.5.4 Bestimmung der Abklingzeiten der Fluoreszenz von Quantenpunkten

Da die Messgenauigkeit mit dem Fluorimeter GENios Plus, XFLUOR 4 für die Untersuchung der Quantenpunkte nicht ausreichend schien, wurden mit dem wesentlich präziseren und vielseitigeren Gerät FluoroLog (Horiba Jobin Yvon) weitere Messungen durchgeführt. Dazu sollten zunächst die Abklingzeiten der Fluoreszenz der verschiedenen in den Experimenten verwendeten Substanzen bestimmt werden. Die konstante Anregungswellenlänge betrug $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm, während die Emission bei $\lambda_{\text{em}} = 540$ nm detektiert wurde. Die Intensität dieser Fluoreszenzstrahlung wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es wurden drei Proben in folgender Zusammenstellung untersucht:

- 5 μl Quantenpunkte + 600 μl 1x PBS
- 600 μl Nierenlysat
- 5 μl Quantenpunkte + 600 μl Nierenlysat.

2.5.5 Bestimmung von Emissionsspektren

Nachfolgend sollten die Emissionsspektren der Quantenpunkte, des Nierenlysats und von Quantenpunkten und Nierenlysat in Kombination vergleichend ermittelt werden. Dazu wurden die zu untersuchenden Gemische in eine Präzisions-Küvette aus optischem Spezialglas (Schichtdicke 10 mm) pipettiert. Die Exzitationswellenlänge lag jeweils bei $\lambda_{\text{ex}} = 300$ nm. Die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung wurde in Abhängigkeit von der emittierten Wellenlänge λ_{em} in einem Intervall von 400 bis 600 nm aufgetragen. Die untersuchten Proben setzten sich wie folgt zusammen:

- 5 μl Quantenpunkte + 500 μl 1x PBS
- 25 μl Nierenlysat + 475 μl H₂O bidest
- 5 μl Quantenpunkte + 25 μl Nierenlysat + 475 μl H₂O bidest.

In einer weiteren Messreihe bei gleicher Gerätekonstellation wurden die Intensität der Hintergrundfluoreszenz und der Einfluss des umgebenden Lösungsmediums auf die detektierbare Emissionswellenlänge der Quantenpunkte untersucht. Wie im Vorversuch

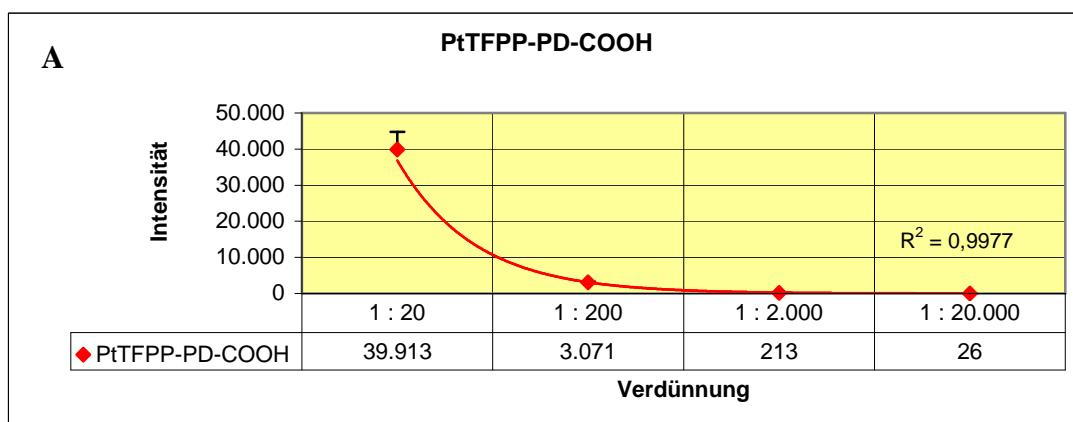
wurde die emittierte Fluoreszenzstrahlung im Intervall von 400 bis 600 nm dargestellt, nachdem die jeweilige Substanz mit $\lambda_{ex} = 300$ nm angeregt worden war. Zunächst wurden vier Proben zu je 600 μ l mit verschiedenen Lösungen hergestellt und vermessen: H₂O bidest, 1% SDS, 1% Triton X-100 und ein Gemisch aus 1x PBS, 1% SDS und 1% Triton X-100. Für den zweiten Teil der Messung wurden zu jeder der genannten Proben 5 μ l Quantenpunkte zugegeben und die so erhaltenen Gemische in gleicher Weise gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Versuchsreihe mit Nanopartikeln

3.1.1 Verdünnungsreihe

Der erste Schritt zur Analyse der Eigenschaften der Nanopartikel bestand im Erstellen einer Verdünnungsreihe. Hierzu wurde die Intensität der Fluoreszenz der Nanopartikel in den Verdünnungen 1:20, 1:200, 1:2.000 und 1:20.000 mit dem Fluorimeter GENios Plus gemessen. Für die jeweilige partikelspezifische Einstellung am Gerät wurde außerdem die Negativkontrolle aus 1x PBS gemessen, um die unabhängig von den Nanopartikeln zustande kommende Hintergrundfluoreszenz anzuzeigen. Die hierbei gemessenen Werte von 12 bei den Partikeln PtTFPP-PD-COOH und 1.070 bei den Partikeln Ru(dpp)₃-PAN-COOH wurden zur Fehlerkorrektur von den einzelnen Messwerten der entsprechenden Reihen subtrahiert. Abbildung 7 zeigt die beiden Messreihen mit den Mittelwerten aus den jeweils drei analysierten Proben. Die Intensitäten der Fluoreszenzstrahlung nehmen entsprechend der zunehmenden Verdünnung ab. Der erwartungsgemäß exponentielle Verlauf des Graphen bestätigt sich durch das errechnete Bestimmungsmaß (Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten R, wobei $-1 \leq R \leq 1$) von 0,99 bzw. 1,0, das im Rahmen der Messgenauigkeit auf eine gute Übereinstimmung schließen lässt.



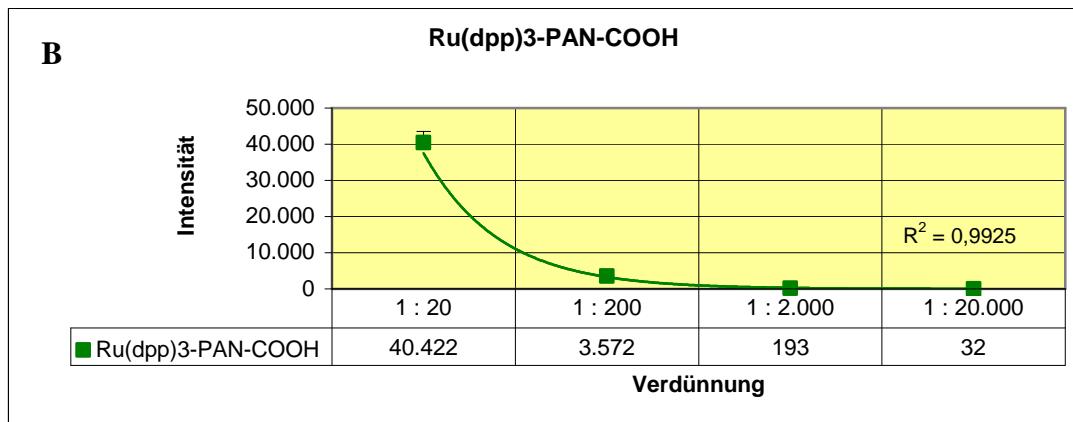


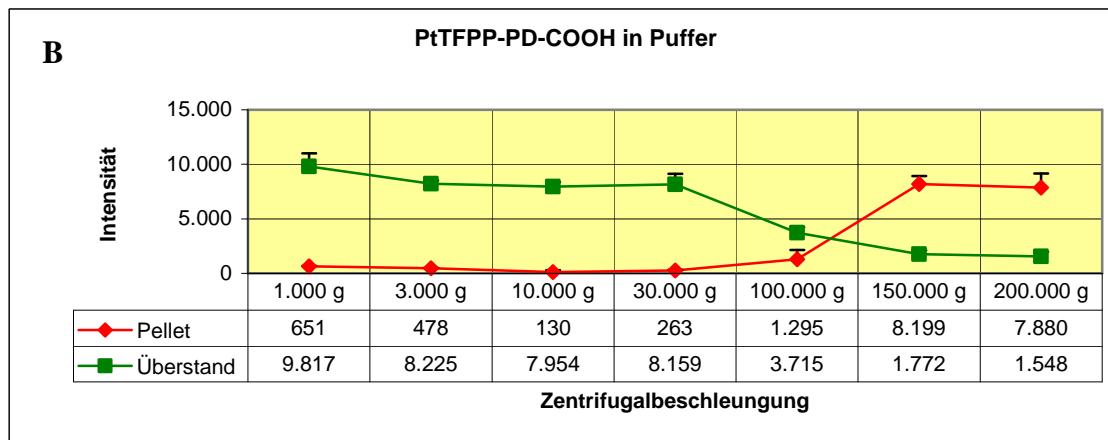
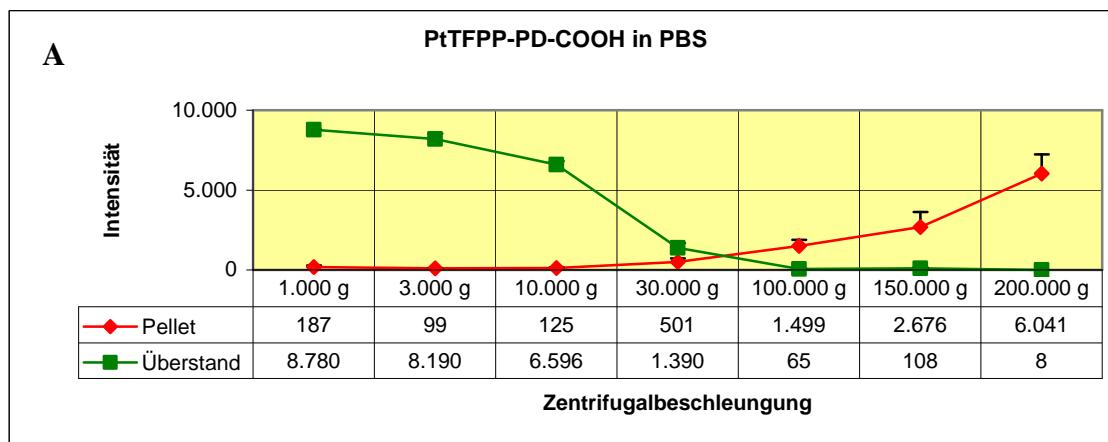
Abb. 7: Fluoreszenzstrahlung der Nanopartikel PtTFPP-PD-COOH (A) und Ru(dpp)₃-PAN-COOH (B) in Abhängigkeit von der Verdünnung. Die exponentielle Trendlinie wurde extrapoliert. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus je drei Proben plus Standardabweichungen.

3.1.2 Verhalten der Nanopartikel bei Zentrifugation

Bei der folgenden Messreihe wurden die Partikel PtTFPP-PD-COOH und Ru(dpp)₃-PAN-COOH zur Zentrifugation jeweils in 1x PBS und in einen Puffer, der zusätzlich 8 M Harnstoff und 1% Triton X-100 enthielt, gegeben. Die Werte der Negativkontrollen aus den beiden Puffern wurden von den Einzelwerten der jeweiligen Messreihen zur Korrektur der Hintergrundfluoreszenz subtrahiert. Das Verhalten der Partikel wird in den Diagrammen aus Abbildung 8 deutlich.

Bei den in PBS gelösten Partikeln PtTFPP-PD-COOH steigt der Anteil der Intensität der Fluoreszenzstrahlung im Pellet ab einer Zentrifugalbeschleunigung von 30.000 g, wobei ab 100.000 g der Anteil im Pellet den des Überstandes übersteigt (s. Abb. 8A). Mit zunehmender Zentrifugalbeschleunigung lässt sich die Intensität im Pellet weiter erhöhen, was im Versuch bis zu einem Maximum von 200.000 g aufgezeigt wurde. Betrachtet man die Summe der Intensitäten in Überstand und Pellet, so fällt ein starker Verlust in den mittleren Bereichen bei 30.000 g bis 150.000 g auf. Bei den in harnstoffhaltigem Puffer gelösten Partikeln steigt die Intensität im Pellet erst ab 100.000 g an, ein im Vergleich zum Überstand größerer Anteil im Pellet findet sich erst ab 150.000 g (s. Abb. 8B). Bezogen auf die Absolutwerte der Summen aus den Werten von Pellet und Überstand zeigen sich bei gleicher Messeinstellung bei den in Puffer gelösten Proben höhere Ergebnisse.

Die in PBS gelösten Partikel Ru(dpp)₃-PAN-COOH lassen sich wie auch die Partikel PtTFPP-PD-COOH ab einer Beschleunigung von 100.000 g so vom Überstand trennen, dass die Intensität im Pellet größer ist als im Überstand (s. Abb. 8C). Mit geringerer Zentrifugationskraft findet sich keine relevante Fluoreszenzstrahlung im Pellet, bei einer über 100.000 g hinausgehenden Beschleunigung kann die Ausbeute im Pellet gesteigert werden. Während bei den Partikeln PtTFPP-PD-COOH nach Lösung im harnstoffhaltigen Puffer eine höhere Zentrifugalkraft zum Abpelletieren notwendig war, lassen sich die Partikel Ru(dpp)₃-PAN-COOH auch bei der maximalen verwendeten Stärke von 200.000 g nicht in relevanten Mengen im Pellet nachweisen (Abb. 8D).



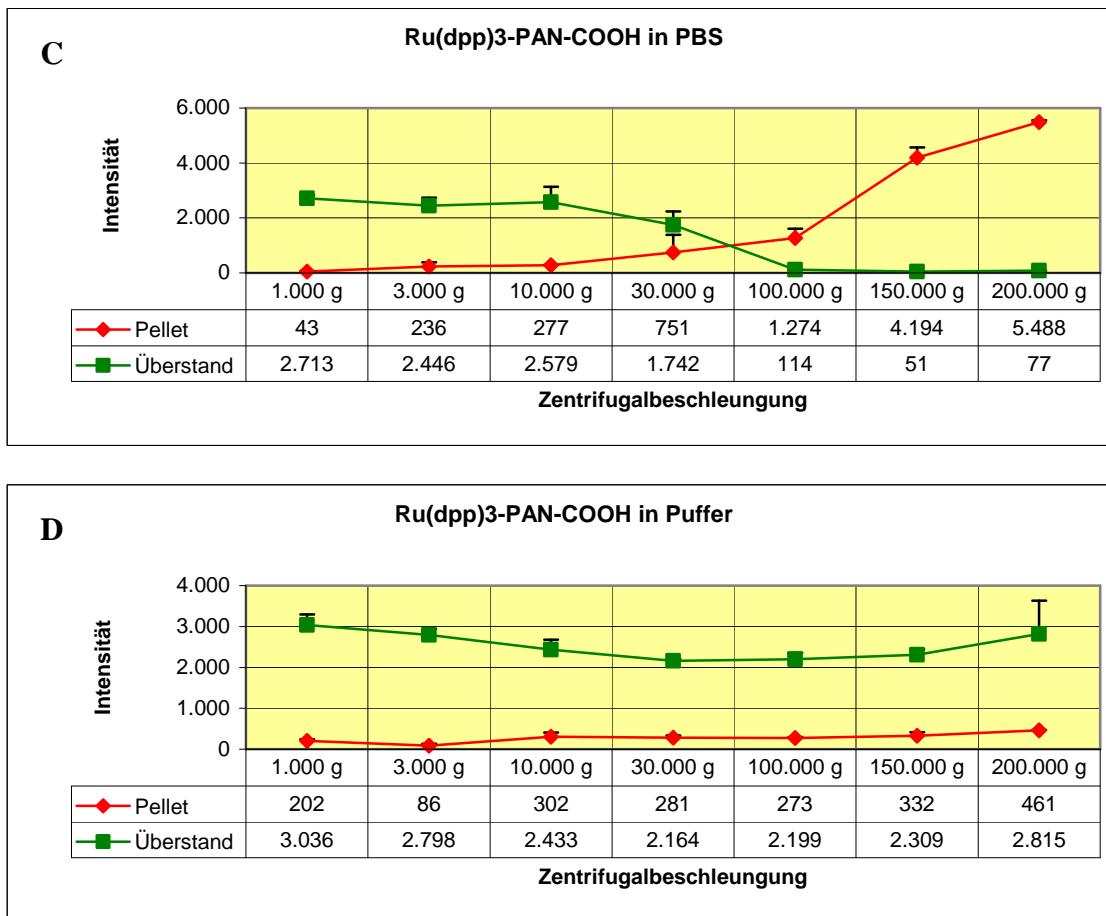
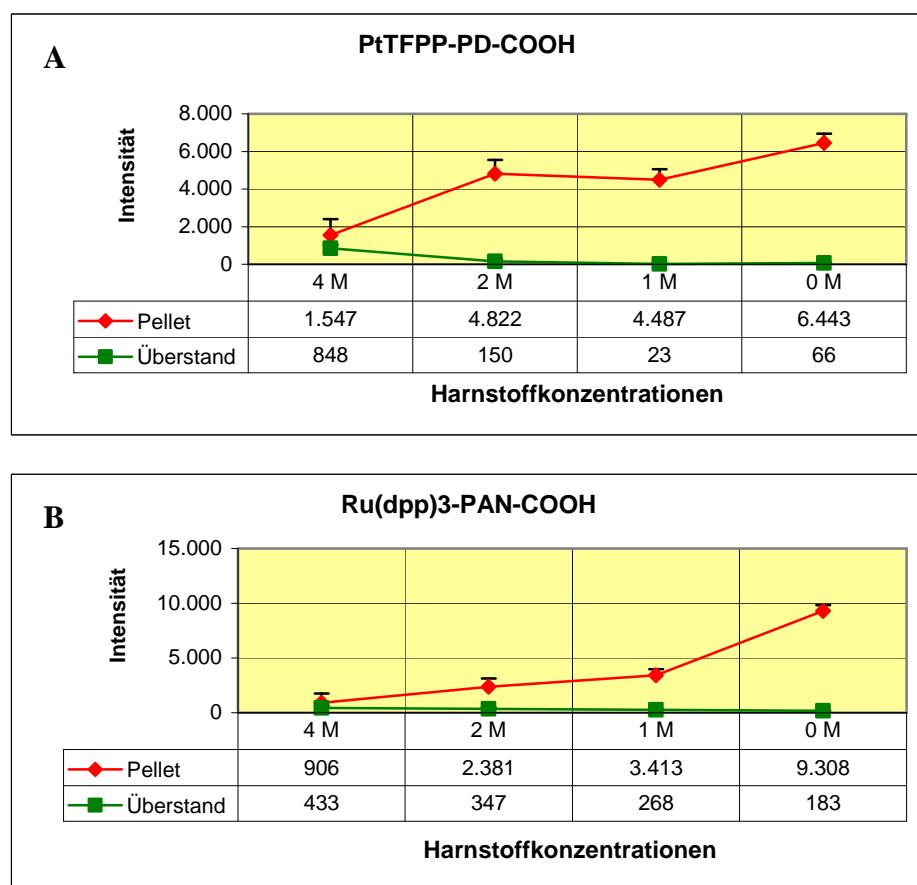


Abb. 8: Messung von Fluoreszenzstrahlung in Überstand und Pellet nach Zentrifugation. In A und B sind die Partikel PtTFPP-PD-COOH dargestellt, C und D zeigen die Partikel Ru(dpp)₃-PAN-COOH (Mittelwerte aus je zwei Proben plus Standardabweichungen).

3.1.3 Zentrifugation der Nanopartikel in Harnstoffverdünnungen

Möglicherweise verhinderte die hohe Harnstoffkonzentration das Pelletieren der Nanopartikel. Deshalb sollte die Abzentrifugierbarkeit der Nanopartikel in einem weiteren Versuch analysiert werden. Für die Zentrifugation mit einer konstanten Beschleunigung von 150.000 g wurden die Partikel in Puffern unterschiedlicher Konzentrationen an Harnstoff gelöst. Die erste Messreihe mit 4 M, 2 M, 1 M und 0 M Harnstoff ist vergleichend mit den Partikeln PtTFPP-PD-COOH und Ru(dpp)₃-PAN-COOH in Abbildung 9A und B dargestellt. Dabei fällt eine deutliche Abhängigkeit der Abzentrifugierbarkeit der Partikel von der Harnstoffkonzentration auf. Zwar findet sich auch bei der höchsten gewählten Konzentration von 4 M bei beiden Partikelsorten die höhere Intensität der Fluoreszenzstrahlung bereits im

Pellet, aber mit zunehmender Verdünnung steigt die Differenz aus Intensität im Pellet und im Überstand deutlich an. Das Maximum dieser Differenz wird bei Fehlen von Harnstoff im Medium erreicht. Eine weitere Messreihe (Abb. 9C) mit den Partikeln Ru(dpp)₃-PAN-COOH zeigt eine größere Spannbreite an Harnstoffverdünnungen auf. Dem in der Zentrifugationsreihe aus 2.4.2 bzw. 3.1.2 verwendeten Puffer entsprechend wurde als Maximalkonzentration des Harnstoffs 8 M gewählt. Hierdurch wurde das Abzentrifugieren der Partikel verhindert, so dass sich der größere Anteil an Fluoreszenzstrahlung im Überstand befand. In den stärkeren Verdünnungen wurde mit 1 M, 0,5 M und 0,25 M eine genauere Differenzierung vorgenommen. Es bestätigt sich die Abhängigkeit von der Konzentration, da die im Pellet gemessene Intensität wiederum bis zum Maximum bei minimaler Harnstoffkonzentration ansteigt. Die hinzugefügte, im Diagramm nicht erfasste Positivkontrolle zeigt mit einem Mittelwert von 6.746 eine Intensität, die höher ist als das Maximum des Überstandes, aber niedriger als die ab der Konzentration von 1 M Harnstoff im Pellet nachgewiesene Intensität. Der Mittelwert der Negativkontrolle ohne Nanopartikel von 160 wurde von den Einzelmesswerten der Reihe subtrahiert.



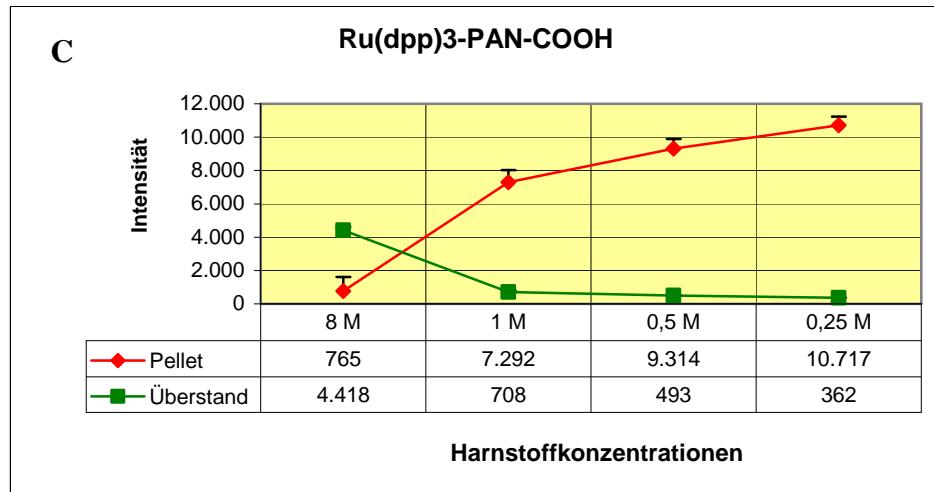


Abb. 9: Zentrifugation der Nanopartikel bei unterschiedlichen Harnstoffverdünnungen. Die Diagramme A und B vergleichen unterschiedliche Partikel bei gleichen Konzentrationen, C stellt eine Modifizierung von B dar (Mittelwerte aus je zwei Proben plus Standardabweichungen).

3.1.4 Zentrifugation der Nanopartikel in Nierenlysat

Versuch 1

In den bisherigen Versuchen wurden die Nanopartikel in verschiedenen Puffern nachgewiesen. Nun wurde dazu übergegangen, mit kompletten Gewebshomogenisaten zu arbeiten. Dazu wurden Proben erstellt, in denen 5 µl der Partikel mit jeweils 150 µl Nierenlysat bzw. Puffer vermischt wurden. Anschließend sollten die Bestandteile durch Zentrifugation wieder aufgetrennt werden, um die separierten Nanopartikel schließlich im Pellet nachweisen zu können. Die Bedingungen für die beiden Partikelsorten unterschieden sich lediglich in den Einstellungen für die Messung in Bezug auf die partikelspezifische Verzögerungszeit von 40 µs für PtTFPP-PD-COOH und 0 µs für Ru(dpp)₃-PAN-COOH. In Abbildung 10 kommt der Unterschied zwischen den Partikeln deutlich zum Ausdruck: Während es bei den Partikeln PtTFPP-PD-COOH gelang, Fluoreszenz im Pellet darzustellen, konnte bei den Partikeln Ru(dpp)₃-PAN-COOH keine Auf trennung erreicht werden. Bei letzteren fällt außerdem der Unterschied in der Intensität des Überstandes zwischen reinem Puffer und Nierenlysat auf. Das Nierenlysat liefert bei der hier fehlenden Verzögerungszeit deutlich höhere Werte als der Puffer, während bei den Partikeln PtTFPP-PD-COOH die

Messwerte bei Nierenlysat und Puffer in vergleichbarer Größenordnung liegen. Die Positiv- und Negativkontrollen zeigen in beiden Fällen die Randextreme der Messung an.

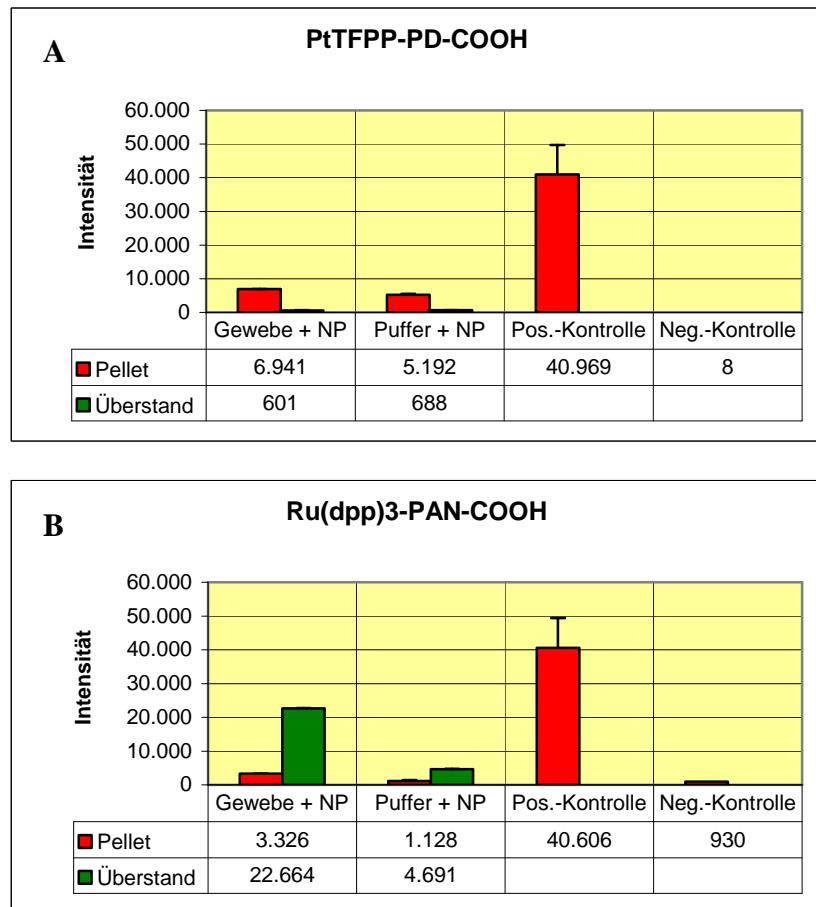


Abb. 10: Nanopartikel sollten aus Nierenlysat bzw. Puffer isoliert werden. A und B zeigen die Ergebnisse bei unterschiedlichen Partikelsorten, wobei in A mit einer Verzögerungszeit von 40 μ s gemessen wurde (Mittelwerte aus je zwei Proben plus Standardabweichungen). NP = Nanopartikel, Pos.-Kontrolle = Positivkontrolle, Neg.-Kontrolle = Negativkontrolle.

Versuch 2

Für die Partikel PtTFPP-PD-COOH konnte in Versuch 1 das Ziel erreicht werden, nach Vermischen von Nanopartikeln mit Nierenlysat und anschließender Zentrifugation Fluoreszenzstrahlung im Pellet nachzuweisen. In einem weiteren Versuch wurde nun zum einen eine Probe aus reinem Gewebshomogenisat hinzugefügt, so dass die Herkunft der gemessenen Intensitäten genauer interpretiert werden konnte. Zum anderen kam eine Probe hinzu, bei deren Verarbeitung in allen Schritten SDS weggelassen wurde, um möglicherweise

die Abpelletierung zu erleichtern. Die Partikel PtTFPP-PD-COOH wurden vergleichend bei den Verzögerungszeiten 40 µs und 0 µs gemessen. Die Ergebnisse der so erweiterten Messreihe zeigt Abbildung 11. Auf die Darstellung der Positiv- und Negativkontrollen wurde in der Abbildung verzichtet, da diese sich analog zu Versuch 1 verhielten. Zunächst werden die Partikel PtTFPP-PD-COOH mit einer Messverzögerung von 40 µs betrachtet. Es kann bei allen Proben, in denen Partikel enthalten waren, im Pellet eine im Vergleich zum Überstand deutlich größere Intensität der Fluoreszenzstrahlung nachgewiesen werden (Abb. 11A). Das Gewebe hingegen zeigt keine relevante Fluoreszenzstrahlung, der Wert im Überstand ist hier minimal höher als im Pellet. Die Proben mit Gewebe und diejenigen mit Puffer liefern vergleichbare Werte. Bei der Messung ohne Verzögerungszeit (Abb. 11B) wird bei den Gewebeproben nur in der Probe ohne SDS im Pellet ein höherer Wert erreicht als im Überstand, wobei der Unterschied in beiden Fällen nur sehr gering ausgeprägt ist. Nanopartikel in Puffer erzielen wiederum mit deutlicher Differenz ein Intensitätsmaximum im Pellet. Ohne Verzögerungszeit ist auch im Überstand des reinen Gewebes eine Intensität messbar, die in der Größenordnung der beiden anderen Gewebe enthaltenden Proben liegt. Der Messwert des Pellets beträgt hier etwa 1/5 des für den Überstand gemessenen Wertes. Während sich im Diagramm von Abb. 11C der Partikel Ru(dpp)₃-PAN-COOH beim reinen Gewebe erwartungsgemäß kein Unterschied zu Abb. 11B zeigt, ergibt sich hier für die übrigen Proben ein anderes Bild. In keinem Fall übertrifft der Wert des Pellets den des Überstandes, wobei die beiden Gewebe enthaltenden Proben einen etwa fünf bis sechs Mal so hohen Wert für den Überstand liefern wie die aus Partikeln und Puffer bestehende Probe. Zur Durchführung der Versuche muss angemerkt werden, dass bei den Proben ohne SDS das Auflösen des Pellets aufgrund dessen fester Konsistenz nach der Zentrifugation mit 150.000 g sehr schwierig war. In der Probe der Partikel Ru(dpp)₃-PAN-COOH musste nachträglich noch SDS zugegeben werden, um das Pellet wieder resuspendieren zu können.

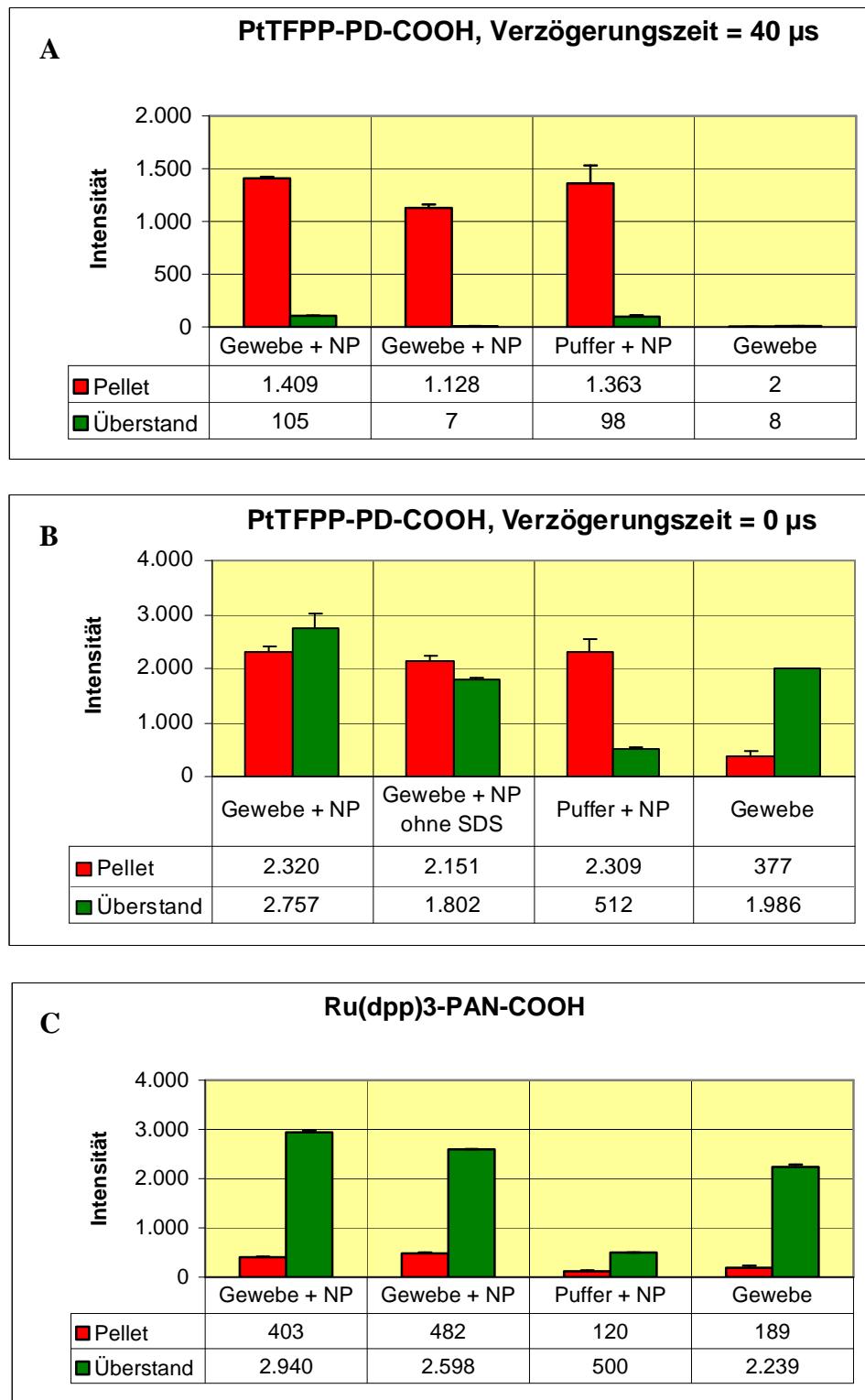


Abb. 11: Zentrifugation von Nanopartikeln in verschiedenen Medien. A und B zeigt die Partikel PtTFPP-PD-COOH gemessen bei unterschiedlichen Verzögerungszeiten, C die Partikel Ru(dpp)₃-PAN-COOH ohne Messverzögerung (Mittelwerte aus je zwei Proben plus Standardabweichungen). NP = Nanopartikel.

Versuch 3

Nachdem es nun gelungen war, Nanopartikel nicht nur von Puffer, sondern auch von Gewebe abzutrennen und anschließend nachzuweisen (s. Abb. 11A), wurde einen Schritt weiter gegangen. Die Durchführung wurde im Vergleich zum Vorversuch wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben im Wesentlichen beibehalten, aber die Ausgangsvolumina an Gewebshomogenisat bzw. Puffer wurden im Vergleich zum Vorversuch mehr als verzehnfacht. Das Volumen an Nanopartikeln wurde auf 10 µl verdoppelt, wobei nurmehr mit den Partikeln PtTFPP-PD-COOH gearbeitet wurde. Das Ergebnis der Auftrennung ist in Abbildung 12 dargestellt. Die Messung erfolgte mit einer Verzögerungszeit von 40 µs. Die Daten der Positiv- und der Negativkontrollen wurden zur besseren Darstellbarkeit der übrigen Messwerte nicht in die Graphik aufgenommen, da sie ein vergleichbares Bild wie in Versuch 1 liefern. Gegenübergestellt sind nun die Ergebnisse für Nanopartikel in Nierenlysat und in Puffer sowie für Lysat ohne Partikel. Dabei konnte weder in Kombination mit Gewebe noch mit Puffer im Pellet eine höhere Intensität der Fluoreszenzstrahlung erreicht werden als im Überstand. Während das Verhältnis Pellet zu Überstand bei der Probe mit Gewebe etwa 1:9 beträgt, liegt es in der Probe mit Puffer bei etwa 1:4. In der reinen Gewebeprobe lässt sich kaum Fluoreszenzstrahlung nachweisen, der höhere Wert findet sich wiederum im Überstand.

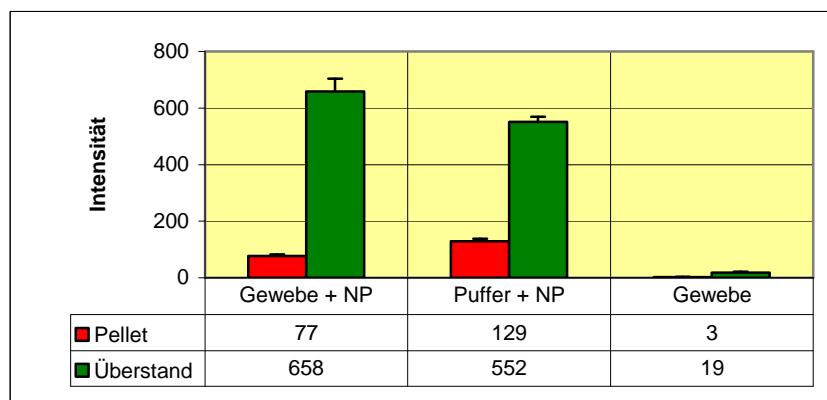


Abb. 12: Zentrifugation von 10 µl Nanopartikel im Lysat einer Niere einer Maus bzw. in Puffer und vom reinen Lysat der anderen Niere. Die Intensitätsmaxima finden sich jeweils im Überstand (Mittelwerte aus je zwei Proben plus Standardabweichungen). NP = Nanopartikel.

Versuch 4

Mit der bisherigen Vorgehensweise war es in Versuch 3 nicht möglich gewesen, Nanopartikel von dem wesentlich größeren Volumen an Nierenlysat abzuzentrifugieren und nachzuweisen. Aus Kapitel 3.1.3 ist allerdings bekannt, dass der im Homogenisierungspuffer enthaltene Harnstoff die Auf trennung deutlich behindert. Deshalb wurde nun versucht, durch Dialyse den Harnstoff aus dem Probenmaterial zu entfernen. Außerdem wurde das Gesamtvolumen des Probenmaterials nochmals vergrößert, indem das Lysat der Niere einer Maus komplett weiterverarbeitet wurde. Das Volumen an Nanopartikeln betrug unverändert 10 µl. Auf diese Weise wurde trotz des größeren Gesamtvolumens in allen Proben, denen Nanopartikel zugegeben worden waren, ein klares Intensitätsmaximum im Pellet erreicht (Abb. 13). Das deutlichere Ergebnis liefert die Probe in Kombination mit Puffer. Der Wert für den Überstand beträgt mit Gewebe lediglich etwa 1/30 bzw. mit Puffer 1/40 dessen des Pellets. Bei der nur aus Gewebe bestehenden Probe ist die nachgewiesene Fluoreszenzstrahlung im Vergleich zu den anderen Messwerten zu vernachlässigen. Positiv- und Negativkontrollen verhielten sich analog zu den Vorversuchen und wurden in Abbildung 13 nicht dargestellt.

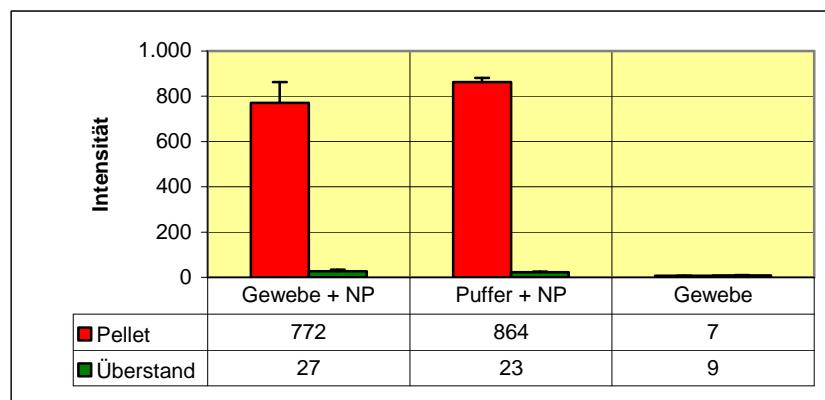


Abb. 13: Zentrifugation des gesamten Probenmaterials nach zusätzlicher Dialyse. Es finden sich deutliche Maxima in den Pellets der partikelhaltigen Proben (Mittelwerte aus je zwei Proben plus Standardabweichungen). NP = Nanopartikel.

Versuch 5

In Versuch 5 wurde statt der Mäusenieren mit Rattenieren gearbeitet, was dem angestrebten Endvolumen einer einzelnen Gewebeprobe etwa entsprechen sollte. Auch das Volumen der

Nanopartikel wurde auf 20 µl verdoppelt. Ansonsten wurde die Abfolge der Arbeitsschritte aus Versuch 4 beibehalten. Zur Messung kamen jeweils die zentrifugierten Probenpaare aus Nierenlysat mit Nanopartikeln, reinem Nierenlysat und der nicht zentrifugierten Positiv- und Negativkontrolle. Auf die Bearbeitung einer Probe aus Partikeln und Puffer wurde verzichtet. In Abbildung 14 sind die jeweiligen Mittelwerte aus beiden Messreihen mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Entscheidend ist die Messung der Partikel in Gewebe, die ein deutliches Maximum im Pellet zeigt. Der Wert des Überstandes beträgt etwa 1/50 davon. Im Gewebe ist wiederum keine relevante Fluoreszenzstrahlung nachweisbar. Die Positivkontrolle stellt mit ihrem niedrigeren Messwert in etwa die nicht zentrifugierte Form der Ausgangslösung in Puffer dar, da nach Zentrifugation das Pellet in einem geringeren Volumen resuspendiert wurde und somit die Konzentration der Partikel anstieg.

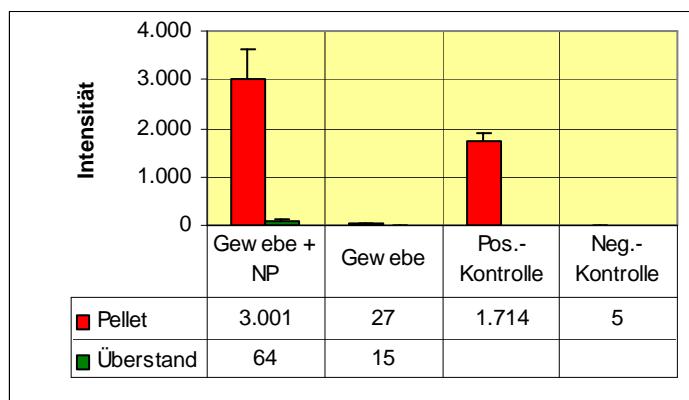


Abb. 14: Nanopartikel im Lysat einer Rattenniere und reines Nierenlysat nach Zentrifugation mit Positiv- bzw. Negativkontrolle in Puffer. Mittelwerte aus je zwei Proben plus Standardabweichungen. NP = Nanopartikel, Pos.-Kontrolle/ Neg.-Kontrolle = Positiv-/ Negativkontrolle.

3.1.5 Beeinflussung der Ergebnisse durch technische Verfahren

Verwendung unterschiedlicher Lösungsmedien

Als nächstes sollte geprüft werden, inwieweit sich das umgebende Medium bei der Messung von Nanopartikeln auf die Intensität der Fluoreszenzstrahlung auswirkt. Dazu wurden Nanopartikel wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben mit den verschiedenen Lösungsmitteln vermischt und im Fluorimeter gemessen. Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die jeweiligen Substanzen. Im Rahmen der Pipettier- und

Messgenauigkeit kann festgestellt werden, dass das Messergebnis von der Art des umgebenden Mediums nicht entscheidend beeinflusst wird. Der maximale Wert ergibt sich für den Puffer, der alle vorher einzeln getesteten Substanzen enthält. Dieses Ergebnis liegt bei etwa 130% des Durchschnitts der restlichen Messwerte.

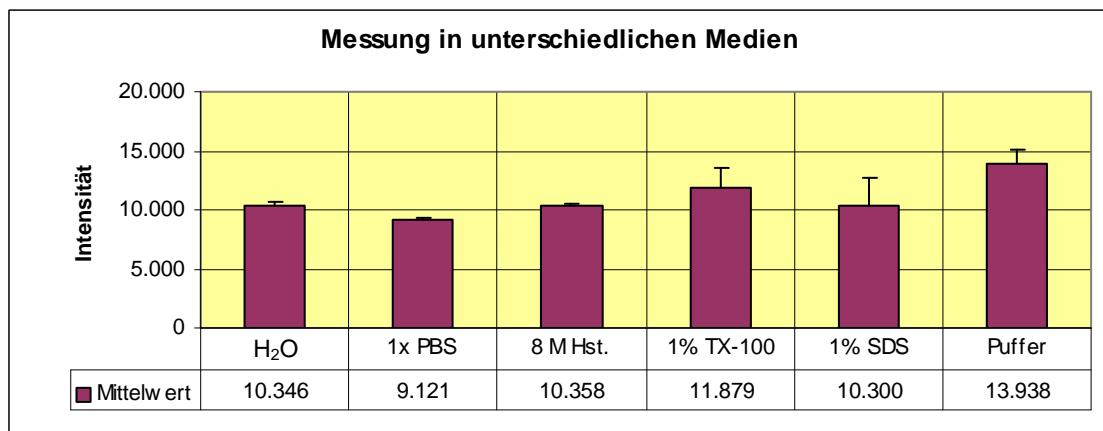


Abb. 15: Nanopartikel in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Während sich die Werte der Einzelsubstanzen in ihrer Größenordnung etwa entsprechen, liefert der alle Einzelkomponenten enthaltende Puffer den maximalen Wert (Mittelwerte aus zwei Proben plus Standardabweichungen).

Verfahren zum Auflösen des Pellets

Ein weiterer denkbarer Einflussfaktor auf das Messergebnis ist die Art und Weise, wie das Pellet aufgelöst wird. Um vergleichen zu können, ob ein Verfahren zu höheren Ergebnissen führt als andere, wurden Proben aus Nanopartikeln und einem Puffer aus 1 M Harnstoff, 1x PBS, 1% TX-100 und 1% SDS zunächst ultrazentrifugiert und das Pellet dann mit unterschiedlichen Methoden wieder resuspendiert. Bei den in Abbildung 16A veranschaulichten Ergebnissen fällt zunächst auf, dass die Standardabweichungen in vielen Fällen sehr hoch sind. Durch diese Ungenauigkeit verliert die Messreihe an Aussagekraft. Deshalb wurde eine weitere Messreihe angefügt, bei der statt des Puffers H_2O bidest verwendet wurde (Abb. 16B). Die im Puffer enthaltenen Detergenzien können schlechter pipettiert werden und sind somit möglicherweise für die Schwankungen bei der Messung verantwortlich. Trotzdem fällt auch bei Betrachtung der zweiten Messreihe kein Verfahren auf, das dem gewöhnlichen Resuspendieren per Pipette deutlich überlegen wäre. Vor allem bei der Ultraschallbehandlung liegen die Intensitäten im zweiten Teil sogar unterhalb derer,

die mit Pipette erreicht wurden. Während Positiv- und Negativkontrolle die Randextreme anzeigen, findet sich in den zentrifugierten Proben jeweils auch ein kleiner Teil der Fluoreszenzstrahlung im Überstand.

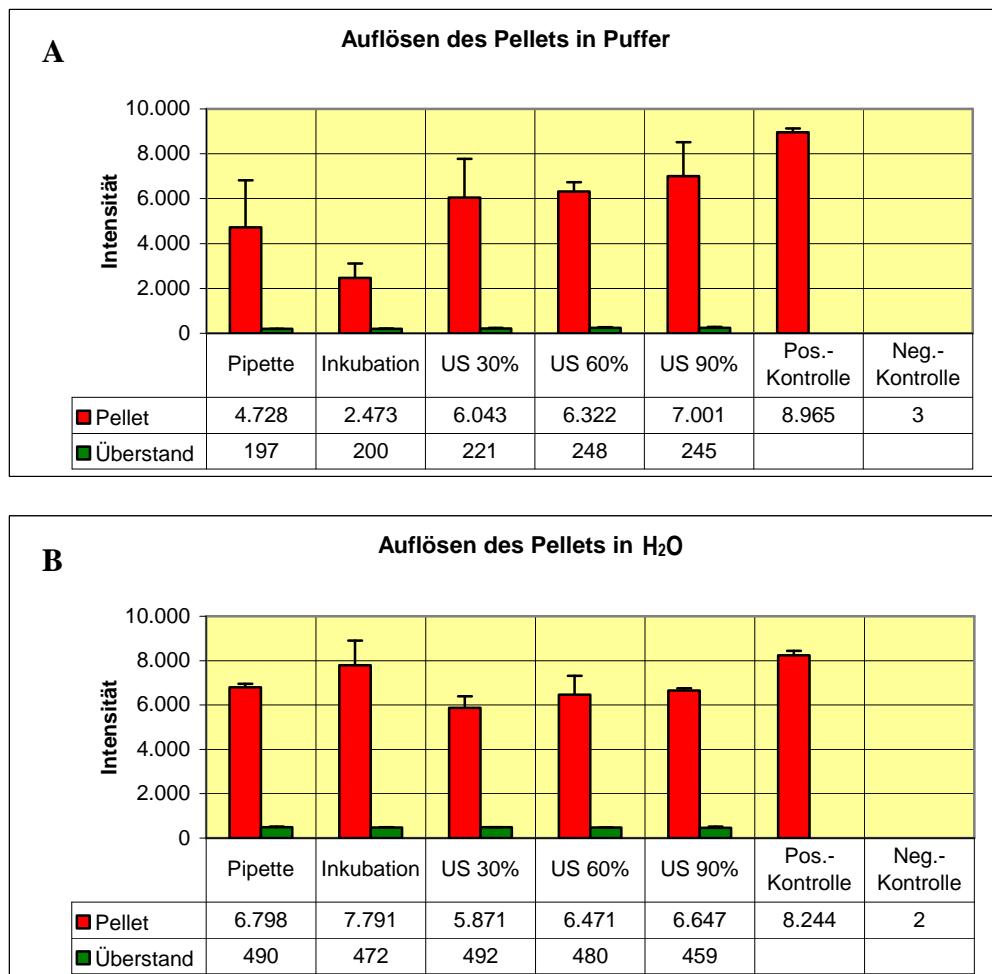
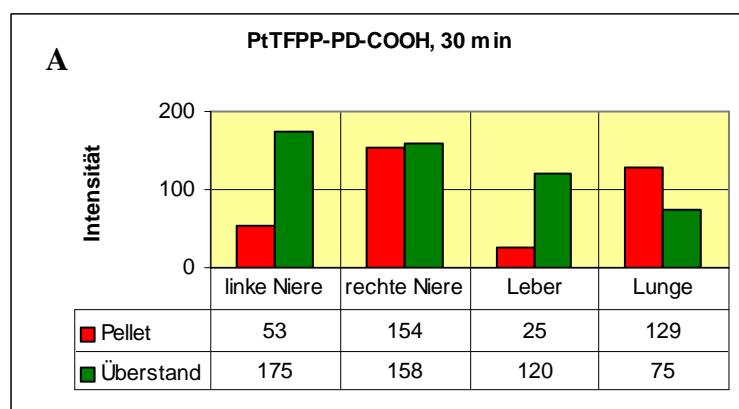


Abb. 16: Nach Ultrazentrifugation mit den angegebenen Methoden resuspendiertes Pellet und Überstand.
 In A wurde Puffer als Lösungsmittel verwendet, in B H₂O bidest. Angegeben sind die Mittelwerte aus je zwei Proben plus Standardabweichungen. US = Ultraschall, Pos.-Kontrolle/Neg.-Kontrolle = Positiv-/Negativkontrolle.

3.1.6 Systemische i.v.-Injektion der Nanopartikel in Ratten

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass nachträglich in Nierenlysat eingebrachte Nanopartikel nach mehreren Arbeitsschritten wieder abzentrifugiert und mit dem Fluorimeter erfasst werden können. Deshalb wurde nun dazu übergegangen, die Partikel

systemisch in Ratten zu injizieren, um sie analog in entnommenem Gewebsmaterial nachweisen zu können. Hierzu wurde zunächst ein Volumen von 20 μ l der Nanopartikel PtTFPP-PD-COOH zwei Ratten intravenös injiziert. Nach 30 min bzw. 2 h wurden die Organe Nieren, Leber und Lunge entnommen und entsprechend Kapitel 2.4.6 der Messung zugeführt. Durch Intensitätsmaxima in den Pellets sollten die Nanopartikel in bestimmten Organen lokalisiert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 veranschaulicht, wobei der mit PBS gemessene Gerätehintergrund wie auch in den folgenden Versuchen dieses Kapitels von den einzelnen Messwerten zur Fehlerkorrektur subtrahiert wurde. Es ergibt sich einzig in der Lunge bei einer Verweildauer von 2 h ein Wertepaar, bei dem das Pellet mit fast 700 den Überstand und alle anderen Messwerte wesentlich übertrifft. Auch in der anderen Probe des Lungengewebes findet sich im Pellet ein höherer Wert, allerdings ist die Differenz zwischen Pellet und Überstand weniger ausgeprägt. In den beiden Proben der Leber zeigt sich gleichermaßen eine höhere Intensität des Überstandes. In den Nieren sind alle Werte in etwa in gleicher Größenordnung. Obwohl in der Probe der linken Niere bei 30 min der Überstand überwiegt, lässt sich keine Tendenz hinsichtlich einer Verteilung von Nanopartikeln ausmachen. Da im Vergleich zu den Vorversuchen das injizierte Volumen der Partikel von 20 μ l, das sich hier zunächst auf das Gesamtvolumen der Ratte aufteilen musste, sehr gering erscheint, wird das wenig aussagekräftige Ergebnis verständlich. Deshalb wurde in den nachfolgenden Versuchen das verwendete Volumen auf 200 μ l erhöht.



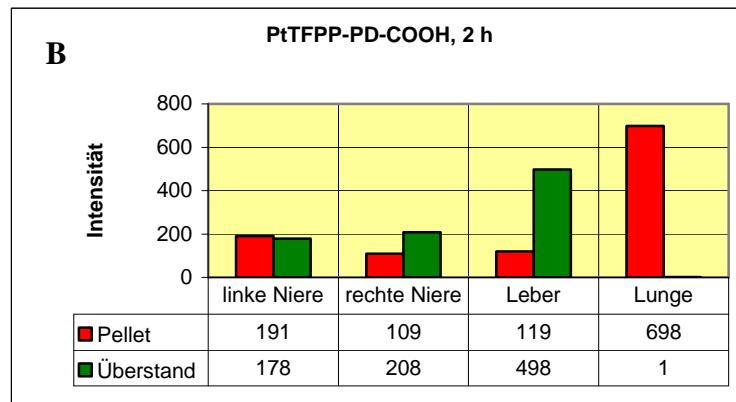


Abb. 17: Systemische Injektion von jeweils 20 μ l der Partikel PtTFPP-PD-COOH in zwei Ratten. A zeigt das Ergebnis bei einer Verweildauer von 30 min bis zur Entnahme der Organe, B bei einer Dauer von 2 h.

Neben der Erhöhung des Volumens auf 200 μ l wurde in den folgenden Messreihen den untersuchten Materialien noch Milz, Blut und Urin hinzugefügt. Die Verweildauern der Partikel in den Ratten betrugen für alle Sorten 30 min und 24 h. Zunächst wurde die Negativkontrolle ausgewertet, bei der die Probenmaterialien ohne vorherige Partikelinjektion verarbeitet und gemessen wurden (s. Abb. 18). Sofern Fluoreszenzstrahlung detektiert werden konnte, überwiegt in allen Fällen der Wert des Überstandes. Der maximal gemessene Wert liegt bei 8, was im sonst üblichen Maßstab der zum Vergleich herangezogenen Diagramme bereits nicht mehr zur Darstellung kommen würde. Es ist also unwahrscheinlich, dass der Gewebshintergrund die übrigen Messungen relevant verfälscht und im Pellet falsch hohe Werte erzeugt.

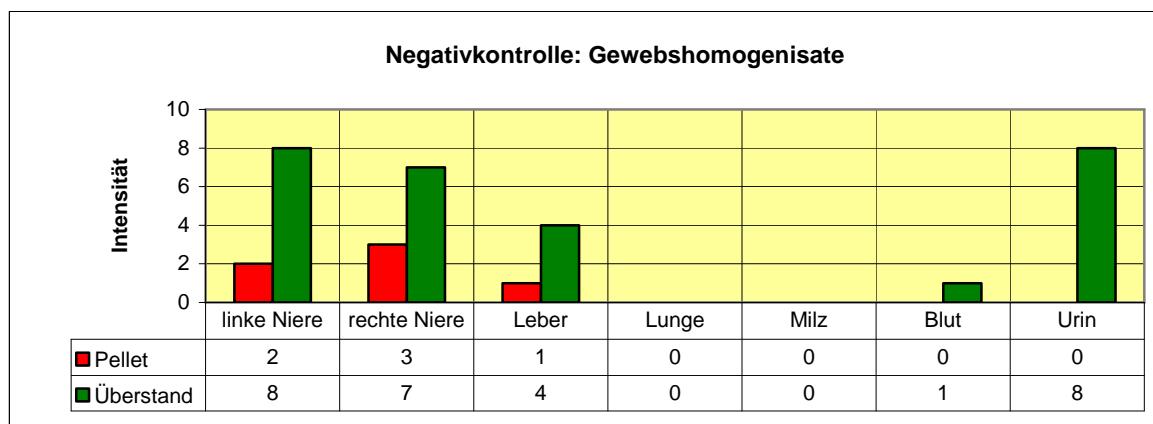


Abb. 18: Die Organe wurden ohne vorherige Nanopartikel-Injektion der Messung zugeführt. Die Messreihe dient als Negativkontrolle für die folgenden Versuche.

Der erste Versuch nach dem etablierten Schema wurde mit den Partikeln PtTFPP-PD-COOH durchgeführt, deren generelles Verhalten durch die Reihe an Vorversuchen bereits besser eingeschätzt werden konnte. Die in Abbildung 19 wiedergegebenen Ergebnisse lassen auf einen Nachweis von Nanopartikeln schließen, da bei Nieren, Leber, Lunge, Milz und Blut die Werte des Pellets die des Überstandes zum Teil deutlich übertreffen. Außerdem liegt die Intensität dieser Maxima in einer wesentlich höheren Größenordnung als die Werte der vorangegangenen Negativkontrolle. Am deutlichsten ausgeprägt ist der Nachweis der Nanopartikel in der Leber, wohingegen die Nieren so gut wie keine Intensitätserhöhung bieten. Für die beiden Verweildauern von 30 min und 24 h wurde der Versuch jeweils vier Mal durchgeführt. Vergleicht man die in Abbildung 19A und B abgebildeten Mittelwerte für beide Kategorien, so findet man ein ähnliches Bild. Sowohl die Verteilung der Maxima als auch deren Größenordnung entsprechen sich in etwa. Hinzu kommt, dass innerhalb einer Messgruppe die Streubreite der Werte so groß ist, dass kein charakteristischer Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden kann.

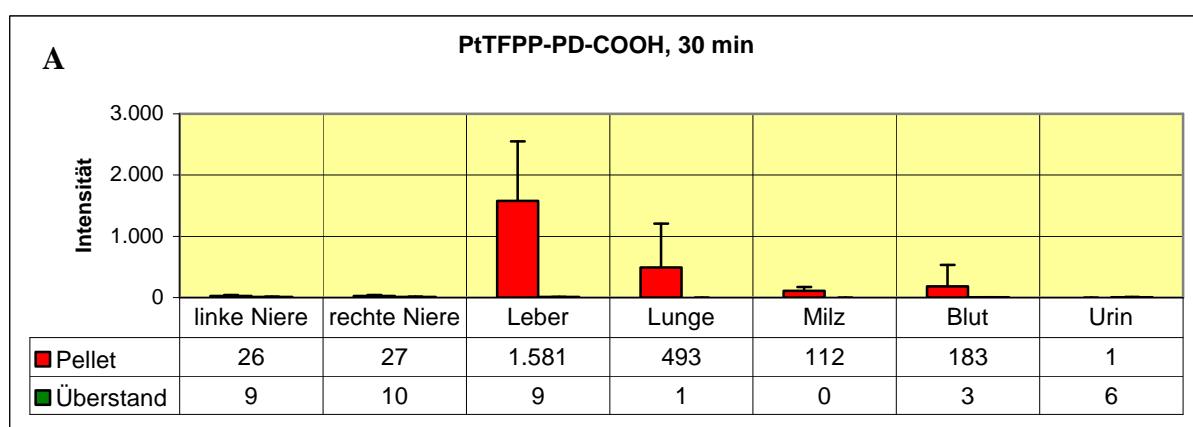
Auch die zusätzlich verwendeten Partikel PS-Pt wurden im Fluorimeter GENios Plus bei gleichen Einstellungen gemessen. Es zeigt sich wiederum ein deutliches Intensitätsmaximum im Pellet der Leber. Außerdem kann im Pellet von Lunge und Milz minimale Fluoreszenzstrahlung nachgewiesen werden, wohingegen in Nieren, Blut und Urin die Fluoreszenz im Überstand überwiegt. Das Fehlen von Fluoreszenzstrahlung im Pellet deutet darauf hin, dass sich keine Nanopartikel im Probenmaterial befunden haben. Die beiden Gruppen von 30 min und 24 h Verweildauer, bei denen in Abbildung 19C und D die Mittelwerte aus jeweils zwei Versuchen dargestellt sind, entsprechen sich in Verteilung und Größenordnung der Werte in etwa. Nur in der Probe der Leber ist der Wert im Pellet nach 24 h höher, wobei auch hier die Standardabweichungen sehr hoch sind.

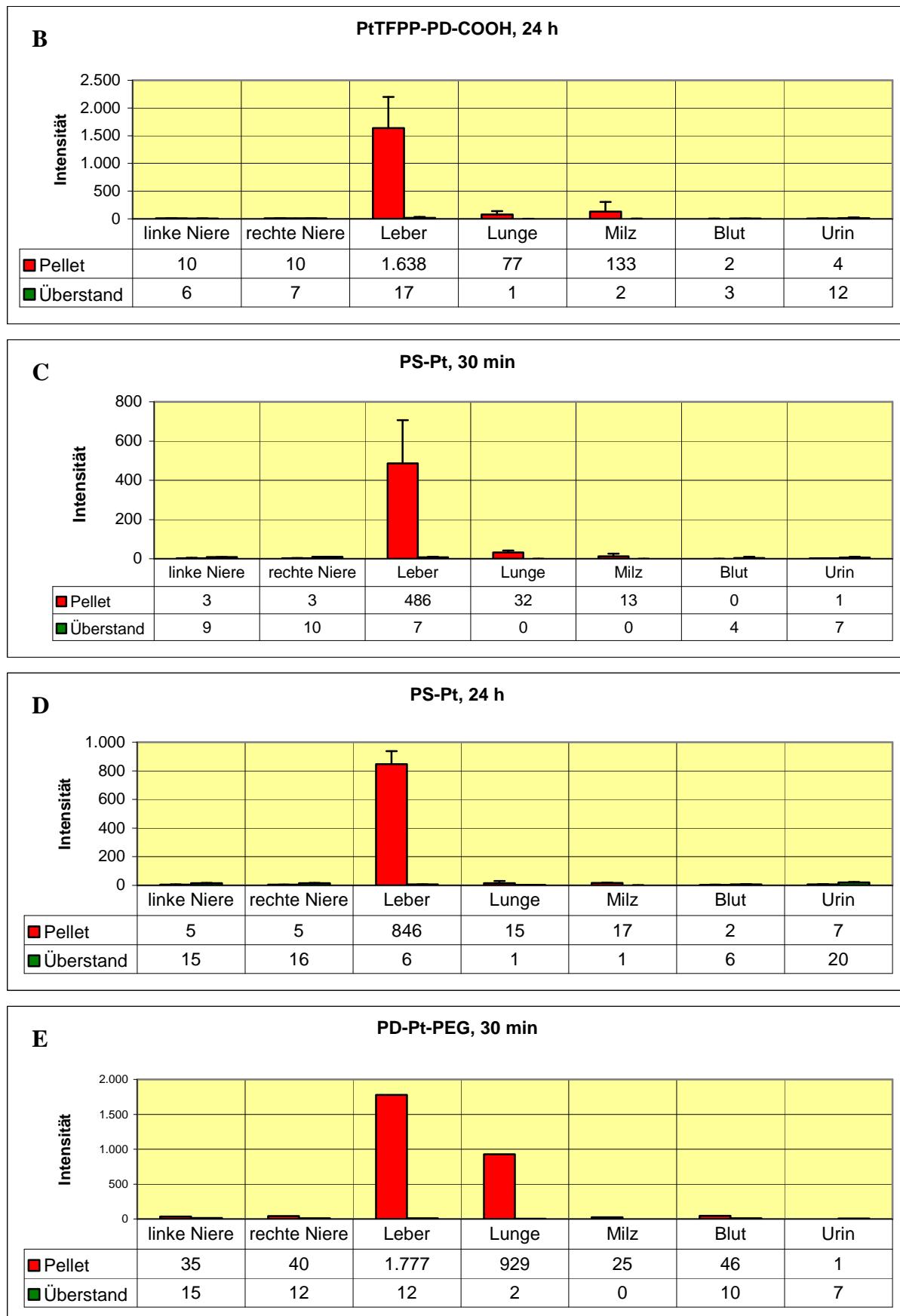
Von den Partikeln PD-Pt-PEG wurde aufgrund von Materialmangel für die Verweildauern 30 min und 24 h jeweils nur ein Versuch durchgeführt. Die Abbildungen 13E und F zeigen die Ergebnisse, die mit dem Fluorimeter GENios Plus gemessen wurden. Auffallend sind die hohen Intensitäten im Pellet von Leber und Lunge. Die Werte der Leber sind in beiden Versuchen in etwa gleich, während in der Lunge nach 24 h ein mehr als doppelt so hohes Ergebnis gemessen wurde. In den übrigen Proben sind die Messwerte sehr niedrig, so dass kein Hinweis auf den Verbleib von Nanopartikeln vorliegt.

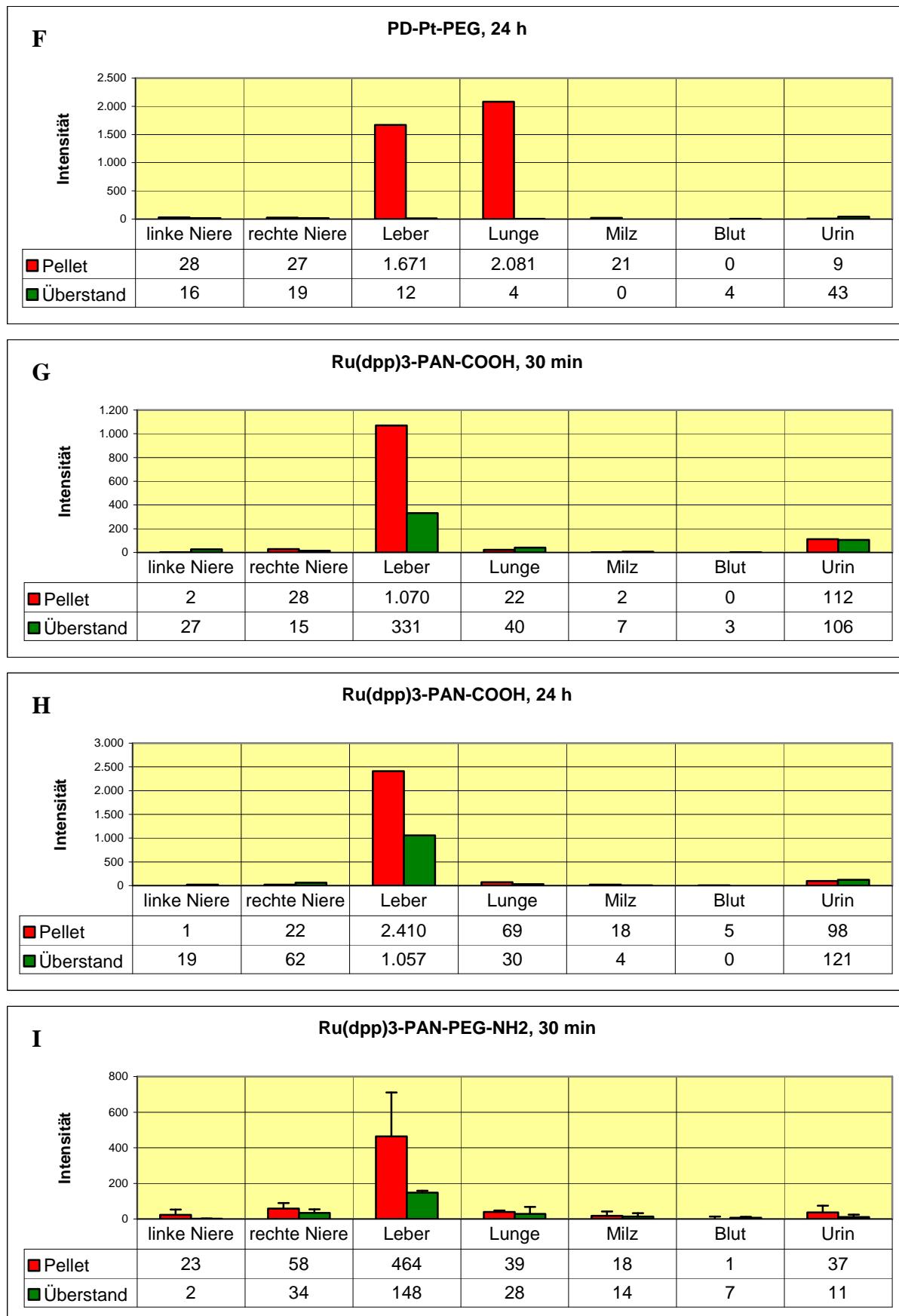
Die Partikel Ru(dpp)₃-PAN-COOH wurden wie auch die folgenden mit dem selbst gebauten Fluorimeter des Instituts für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg gemessen. Für die Verweildauern 30 min und 24 h wurde jeweils ein Versuch durchgeführt (Abb. 19G und H). Ein deutliches Maximum im Pellet findet man in beiden Fällen nur in der Leber. Allerdings ist die Differenz zum Überstand nicht so hoch ist wie in den Vorversuchen, da die Intensität des Überstandes 31% bzw. 44% des Wertes des Pellets beträgt. Die Messung der übrigen Proben ergab wiederum keine Hinweise auf Nanopartikel.

Für die Partikel Ru(dpp)₃-PAN-PEG-NH₂ wurden für die Verweildauern 30 min und 24 h jeweils zwei Versuche durchgeführt (Abb. 19I und K). Der erste Eindruck der Werteverteilung ähnelt dem der vorherigen Messreihe: In beiden Fällen findet sich das Maximum im Pellet der Leber, wobei für den Überstand wiederum 1/3 bzw. gut die Hälfte des Wertes des Pellets gemessen wurde. Die Absolutwerte liegen allerdings unter denen der vorangegangenen Messungen.

Auch von den letzten getesteten Partikeln Ru(dpp)₃-PAN-PEG-OH wurden je zwei Versuche für 30 min und 24 h Verweildauer durchgeführt (Abb. 19L und M). Das Maximum im Pellet der Leber ist relativ zu den anderen Werten der beiden Reihen gesehen jeweils sehr ausgeprägt, obwohl die Absolutwerte noch unter denen der Partikel Ru(dpp)₃-PAN-PEG-NH₂ liegen. Im Vergleich zum Überstand hebt sich das Pellet hier wieder deutlich ab.







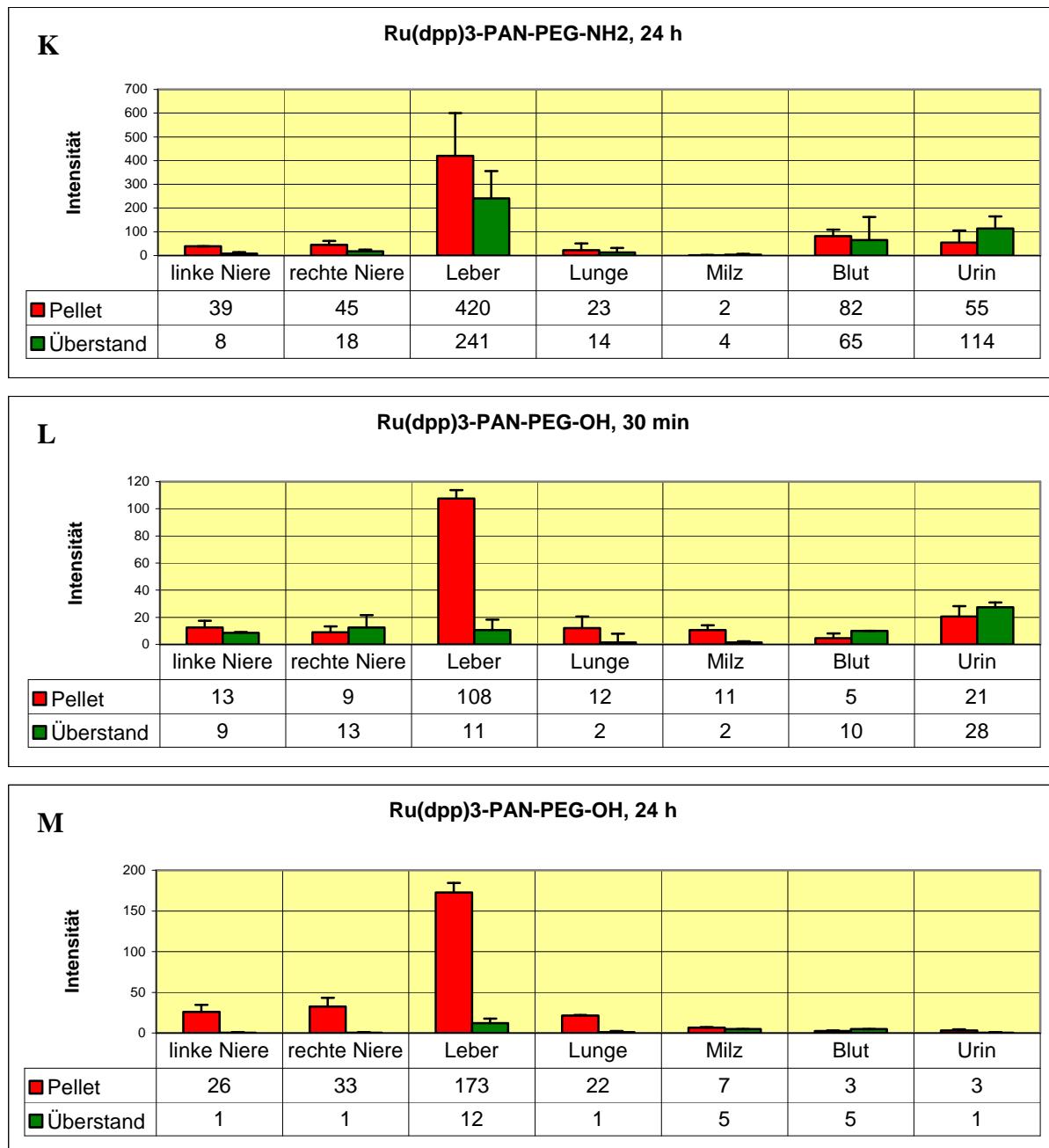


Abb. 19: Analysiert wurden sechs verschiedene Partikelsorten, wobei jeweils die Werte der Verweildauern 30 min und 24 h zu einem Diagramm zusammengefasst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte plus Standardabweichungen, sofern mehr als eine Probe vorlag. Allen Proben gemeinsam ist ein Intensitätsmaximum im Pellet der Leber, das auf das Vorliegen von Nanopartikeln hinweist.

3.1.7 Gefrierschnitte

Durch die Versuche, die den Nachweis der fluoreszierenden Nanopartikel in homogenisiertem Gewebematerial zum Ziel hatten, konnten Informationen zum Verbleib der Partikel im Organismus des Versuchstieres gewonnen werden: Unabhängig von den verschiedenen Modifikationen und funktionellen Gruppen wurden in allen Fällen Nanopartikel in der Leber detektiert. Für die Partikel PD-Pt-PEG ergab sich außerdem ein deutlicher Nachweis von Fluoreszenz in der Lunge. Nun sollte dieses Ergebnis durch Schnittpräparate aus perfusionsfixiertem Gewebe, die nach der Beschreibung von Kapitel 2.4.7 angefertigt wurden, mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) veranschaulicht werden. Beispielahaft wurden die Partikelarten PtTFPP-PD-COOH und PD-Pt-PEG ausgewählt. Als geeignet für die Darstellung zeigte sich der DAPI-Filter, da hier das Gewebsmaterial in verschiedenen Blautönen erscheint, während sich die rot leuchtenden Nanopartikel davon deutlich abheben.

Zunächst werden verschiedene Aufnahmen der Leber vergleichend betrachtet (Abb. 20). Man erkennt den typischen histologischen Aufbau der Leber mit ihren um die Venae centrales angeordneten Leberläppchen. Erwartungsgemäß finden sich hier zahllose rot fluoreszierende Nanopartikel, die in Kontrast zum unmarkierten blauen Gewebshintergrund stehen. Allerdings lassen sich die zahlreicher vorhandenen Partikel PtTFPP-PD-COOH (Abb. 20A und B) wesentlich besser darstellen als die Partikel PD-Pt-PEG (Abb. 20C und D), die erst bei genauem Hinsehen erkennbar sind. Die Abbildungen 14A und C geben bei 10facher Vergrößerung einen groben Überblick über die jeweiligen Schnittpräparate. Detailliertere Informationen lassen sich aus den Abbildungen 14B und D herauslesen, die je einen kleineren Bildausschnitt bei 40facher Vergrößerung zeigen. Hier erkennt man, dass die Nanopartikel zum überwiegenden Teil den Hepatozyten vom Lumen der Sinusoide her anliegen. Dies entspricht der Lokalisation der von Kupffer-Sternzellen, die zum mononukleären phagozytierenden System gehören. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Makrophagen die Nanopartikel als fremd erkannt und im Rahmen der Entgiftungs- und Ausscheidungsfunktion der Leber phagozytiert haben. Die in den Abbildungen dargestellten Fluoreszenzmarkierungen lassen keine direkten Rückschlüsse auf Größe oder Gestalt der Partikel zu, da es sich zum einen um Konglomerate handeln kann und zum anderen die Eigenleuchtkraft der Partikel diese größer erscheinen lässt.

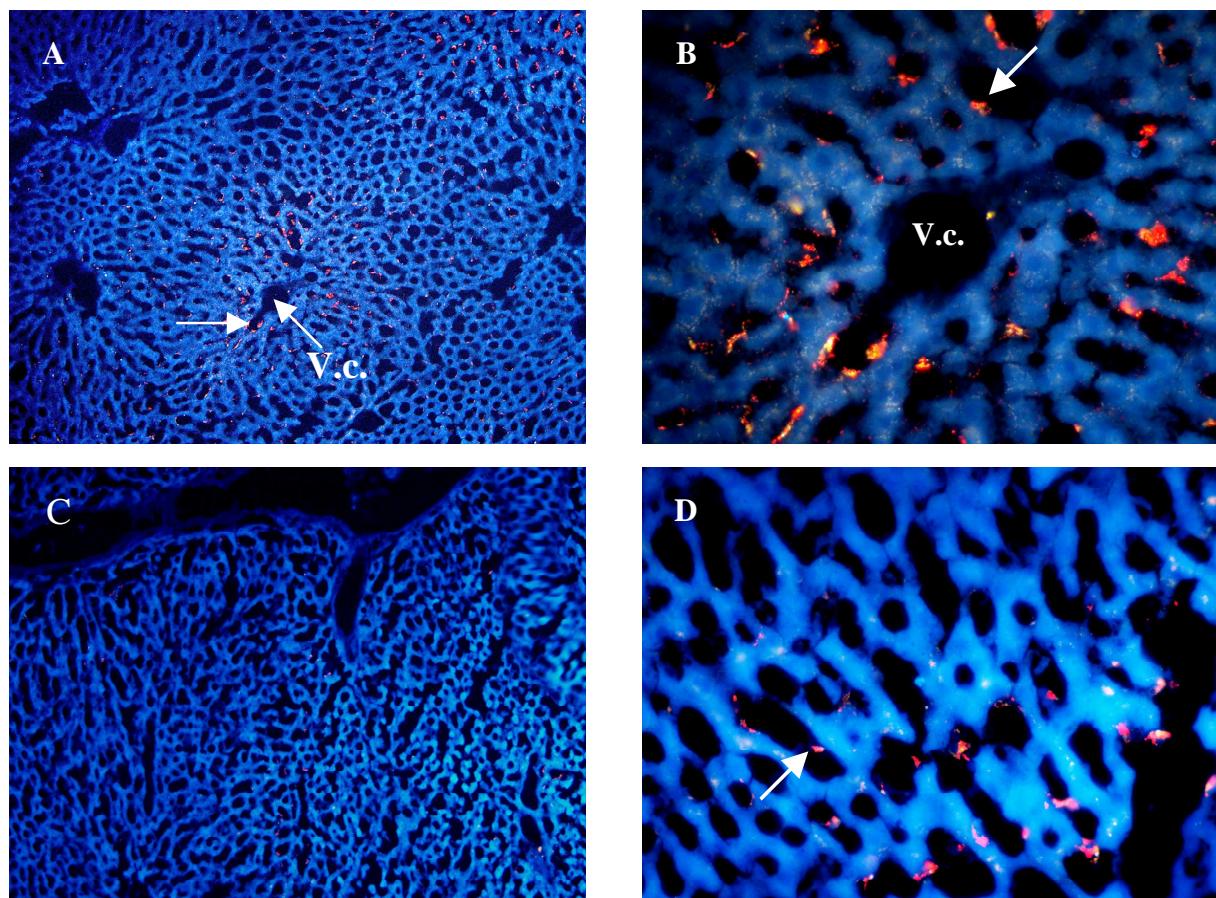


Abb. 20: Schnittpräparate der Rattenleber im Fluoreszenzmikroskop mit DAPI-Filter. A und B zeigen Präparate mit den Partikeln PtTFPP-PD-COOH, während in C und D die Partikel PD-Pt-PEG verwendet wurden. Es wurde jeweils 10fach und 40fach vergrößert. Pfeile = rot fluoreszierende Nanopartikel, V.c. = Vena centralis.

Nachdem für die Partikel PD-Pt-PEG auch in der Lunge fluorimetrisch der Nachweis von Nanopartikeln gelungen war, wird in einem entsprechenden Schnittbild ebenfalls mikroskopisch nach einem Korrelat gesucht. Abbildung 21 zeigt ein Präparat in 10- und 40facher Vergrößerung, das die gesuchten Fluoreszenzmarkierungen aufweist. Zwar weniger zahlreich als in der Leber, dafür aber nicht minder deutlich heben sich die rot leuchtenden Partikel vom blauen Lungengewebe ab. Man erkennt neben vielen Alveolen auch Bronchioli terminales, die in Bronchioli respiratorii übergehen, und Ductus alveolares. Die Nanopartikel haften an der Alveolarwand. Auch von Alveolarmakrophagen weiß man, dass sie den Epithelzellen intraalveolär anliegen, weshalb es sich auch in der Lunge um phagozytierte Nanopartikel handeln könnte.

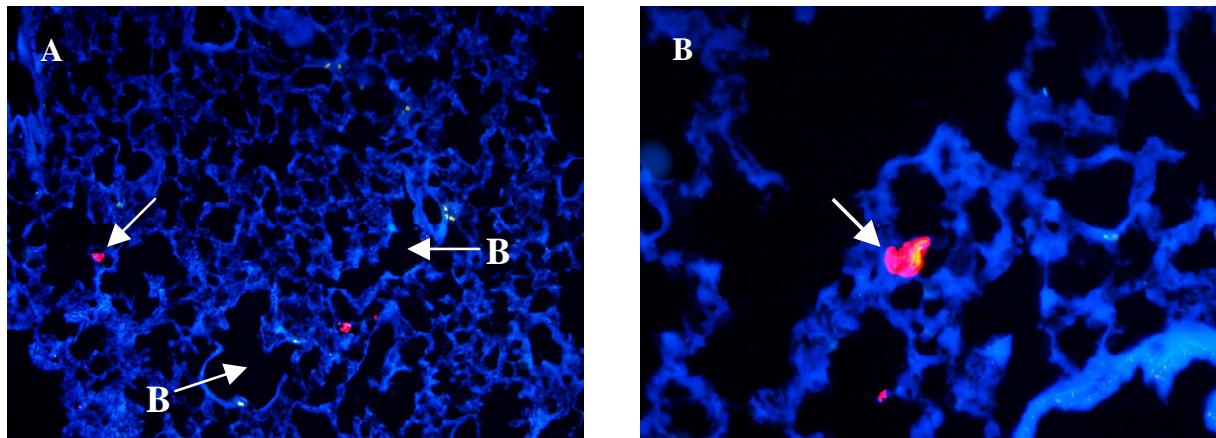
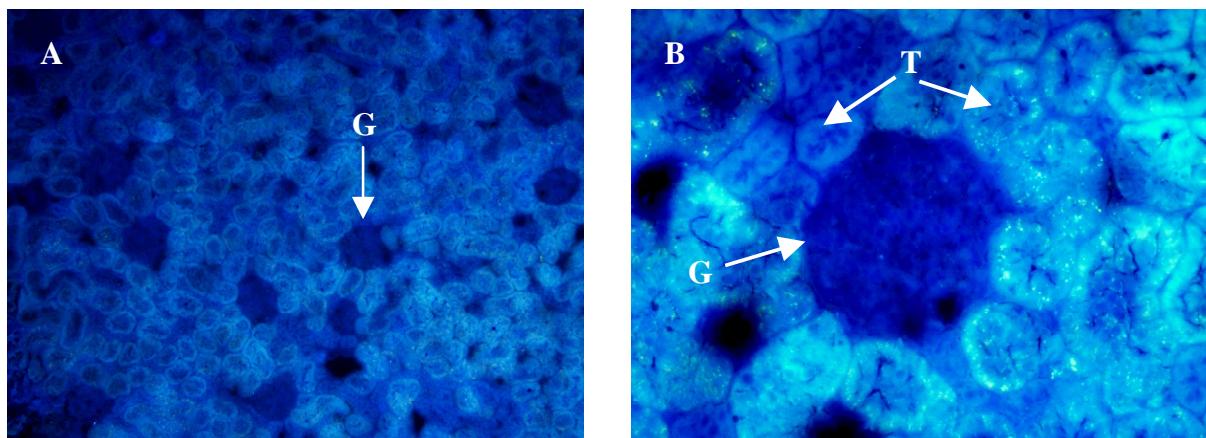


Abb. 21: Schnittpräparat der Rattenlunge im Fluoreszenzmikroskop mit DAPI-Filter. Es wurden die Partikel PD-Pt-PEG verwendet. A zeigt das Präparat bei 10facher, B bei 40facher Vergrößerung. Pfeile = Nanopartikel, B = Bronchioli.

Auch Niere und Milz wurden ungefärbt fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es konnten aber in keinem der Schnittpräparate rote Fluoreszenzmarkierungen gefunden werden, was die Ergebnisse der Fluorimetrie bestätigt. Im gezeigten Ausschnitt aus der Nierenrinde können in den verschiedenen Blautönen des Gewebes die Nierenkörperchen vom tubulären System unterschieden werden (Abb. 22A und B). Die 40fache Vergrößerung zeigt ein einzelnes Nierenkörperchen umgeben von proximalen und distalen Tubuli. Im Gewebe der Milz findet sich zwar ein etwas größeres Farbspektrum, aber auch hier sieht man keine rot fluoreszierenden Nanopartikel (Abb. 22C und D). Deutlich grenzt die derbe Milzkapsel als blaue Linie das Organ nach außen hin ab. Eingebettet in der roten Pulpa ist ein Milzknötchen (Malpighi-Körperchen) zu erkennen, das aus Keimzentrum und umgebendem Randwall besteht.



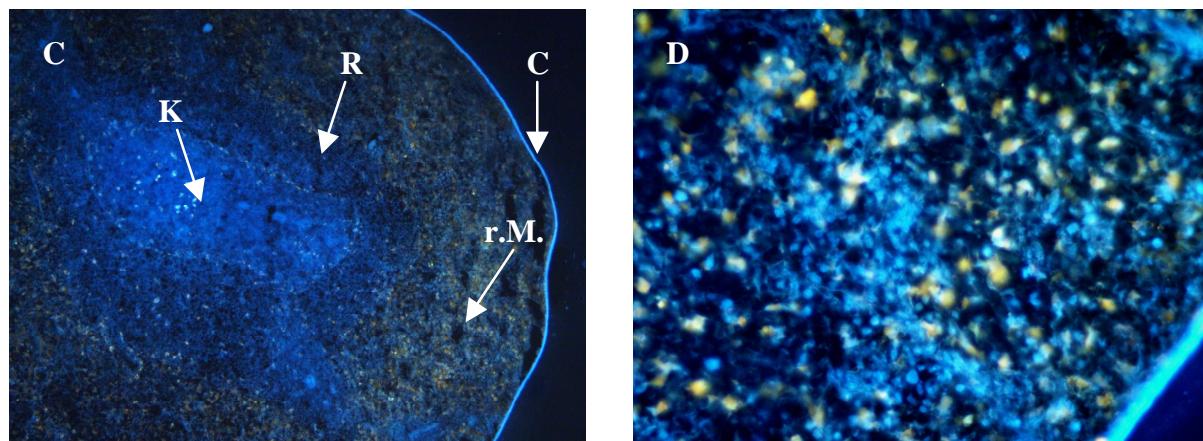


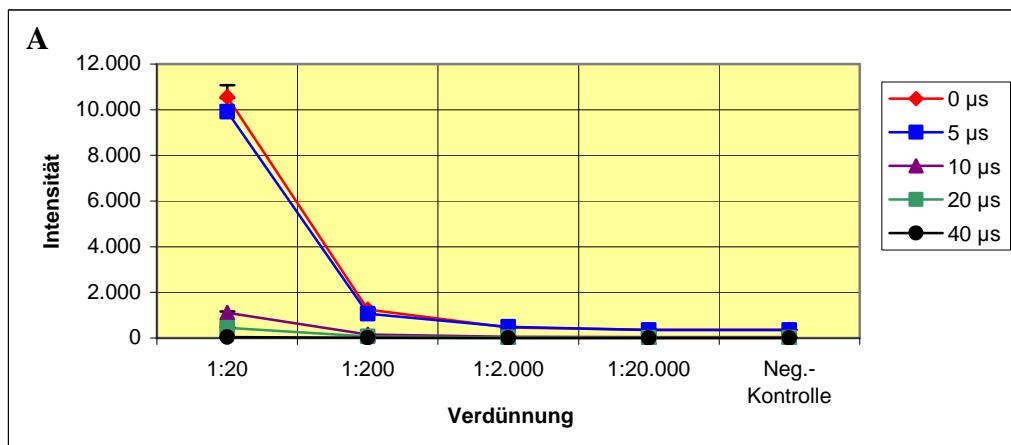
Abb. 22: Niere und Milz einer Ratte nach i.v.-Injektion von Nanopartikeln. A und B zeigen die Niere, C und D die Milz jeweils bei 10- und 40facher Vergrößerung. Die Schnittpräparate weisen keine Nanopartikel auf. G = Nierenkörperchen, T = Tubuli, C = Milzkapsel, r.M. = rote Milzpulpa, K = Keimzentrum, R = Randwall; K und R bilden ein Milzknötchen (Malpighi-Körperchen).

3.2 Ergebnisse der Versuchsreihe mit Quantenpunkten

3.2.1 Verdünnungsreihe

In ähnlicher Weise wie bei den Nanopartikeln sollten auch bei den Quantenpunkten durch verschiedene Versuche deren Eigenschaften analysiert werden. Die Zielsetzung war wiederum, die Quantenpunkte nach systemischer Injektion in Ratten in Geweben nachweisen zu können. Hierzu wurde von den verwendeten pegylierten CdSe/ZnS-Quantenpunkten zunächst eine Verdünnungsreihe erstellt, die jeweils in dreifacher Ausführung mit dem bereits bei den Nanopartikeln gebrauchten Fluorimeter (GENios Plus) gemessen wurde. Die Einstellungen für die Exzitations- und Emissionswellenlängen betrugen $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$. Um festzustellen, ob durch länger anhaltende Fluoreszenzstrahlung eine Messung nach Verzögerungszeit möglich ist, wurden die Werte der initialen Messung mit denen nach Verzögerungen von $5 \mu\text{s}$, $10 \mu\text{s}$, $20 \mu\text{s}$ und $40 \mu\text{s}$ verglichen. Durch die verzögerte Detektion der Emission sollte später die nur kurz andauernde Hintergrundfluoreszenz der Gewebshomogenisate minimiert werden. Die in Abbildung 23A veranschaulichten Ergebnisse zeigen zum einen eine gemäß der Verdünnung abnehmende Intensität der Fluoreszenz, wobei es nicht möglich war, aus den Messwerten eine exponentielle Kurve zu extrapolieren, wie es

bei den Nanopartikeln gelungen war. Zum anderen fällt auf, dass sich die Ergebnisse der unterschiedlichen Verzögerungszeiten in zwei Gruppen einteilen lassen: Die Werte v.a. der geringsten Verdünnung bei 0 μ s und 5 μ s sind vergleichsweise hoch und unterscheiden sich kaum. Zwischen 5 μ s und 10 μ s ist ein großer Sprung, durch den die Werte bei 10 μ s, 20 μ s und 40 μ s zur zweiten Gruppe zusammenfasst werden können. Es ist hier in allen drei Fällen kaum noch Fluoreszenzstrahlung nachweisbar. In einer zweiten Versuchsreihe wurde mit Quantenpunkten der gleichen Art gearbeitet, die aber eine wesentlich größere Leuchtkraft aufwiesen. Abbildung 23B zeigt das Ergebnis, wobei bei gleichen Einstellungen wie in Abbildung 23A die Werte für die geringste Verdünnung bei Verzögerungszeiten von 0 μ s und 5 μ s die Kapazität des Gerätes zur Detektion überstiegen. Bei Betrachtung sich entsprechender Werte in beiden Diagrammen (z.B. Verdünnung 1:200, Verzögerung 0 μ s) wird deutlich, dass die Intensität der zweiten Partikel um über das 30fache stärker ist. Da deshalb die Nachweisbarkeit verbessert wird, wurde in den folgenden Versuchen nur mehr mit den potenteren Partikeln weitergearbeitet. Eine exponentielle Kurve konnte allerdings auch hier nicht aus den Messwerten extrapoliert werden.



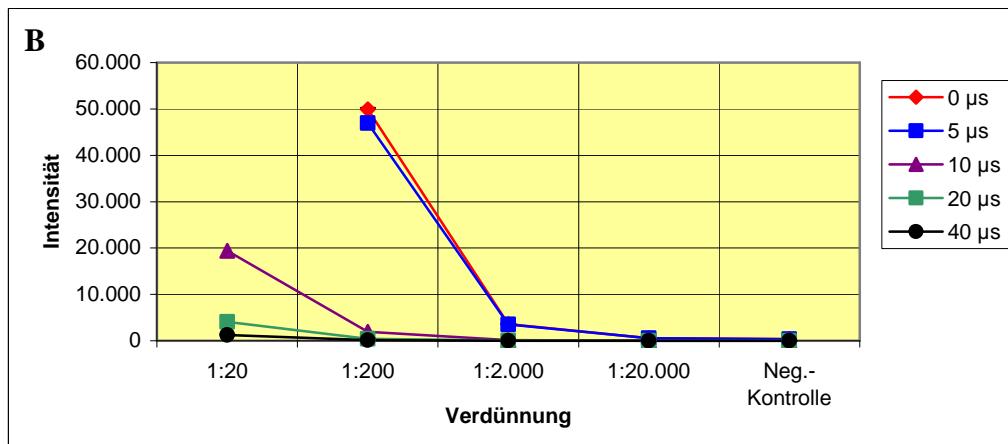


Abb. 23: Verdünnungsreihen von Quantenpunkten. In A und B sind Quantenpunkte mit unterschiedlicher Leuchtkraft dargestellt (Mittelwerte aus je drei Proben plus Standardabweichungen).

3.2.2 Verhalten der Quantenpunkte bei Zentrifugation

Im nächsten Versuch sollte ermittelt werden, wie sich die Quantenpunkte bei Zentrifugation verhalten. Sie wurden einmal in PBS und einmal in einem Puffer aus PBS, 8 M Harnstoff und 1% Triton X-100 bei verschiedenen Zentrifugalbeschleunigungen zentrifugiert, um anschließend die Intensitäten der Fluoreszenzstrahlung in Überstand und Pellet zu messen. Alle Versuche wurden doppelt durchgeführt. Die Mittelwerte der Negativkontrollen wurden von den jeweiligen Einzelwerten zur Fehlerkorrektur subtrahiert. In PBS ließen sich die Quantenpunkte ab einer Beschleunigung von 100.000 g abzentrifugieren (Abb. 24A). Bei steigender Zentrifugalbeschleunigung nimmt der im Pellet gemessene Anteil weiter zu. Im Puffer aus PBS, Harnstoff und Triton X-100 waren die Quantenpunkte ebenfalls ab einer Zentrifugalbeschleunigung von 100.000 g im Pellet nachweisbar (Abb. 24B). Allerdings sind die Absolutwerte hier geringer, und die Werte innerhalb der Messreihe schwanken sehr. Dies spiegelt sich auch in den größeren Standardabweichungen wider. Beide Messungen wurden jeweils ohne Messverzögerung und mit einer Verzögerungszeit von 10 μ s durchgeführt. Die dabei erhaltenen Verläufe der Messreihen entsprechen sich, wobei die Absolutwerte nach 10 μ s nur mehr etwa 1/10 der Werte bei initialer Messung betragen. Aufgrund des identischen Kurvenverlaufes sind jeweils nur die Messungen ohne Messverzögerung graphisch dargestellt.

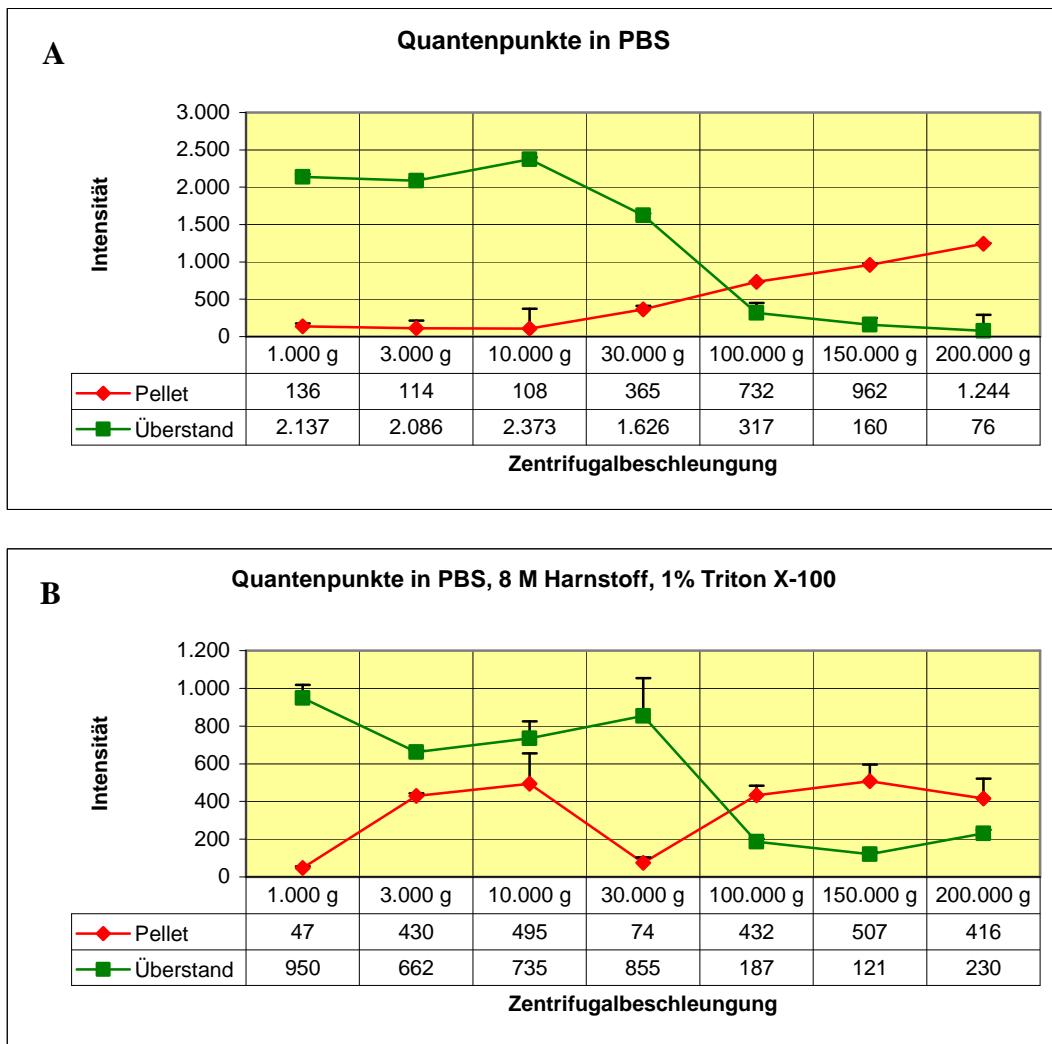
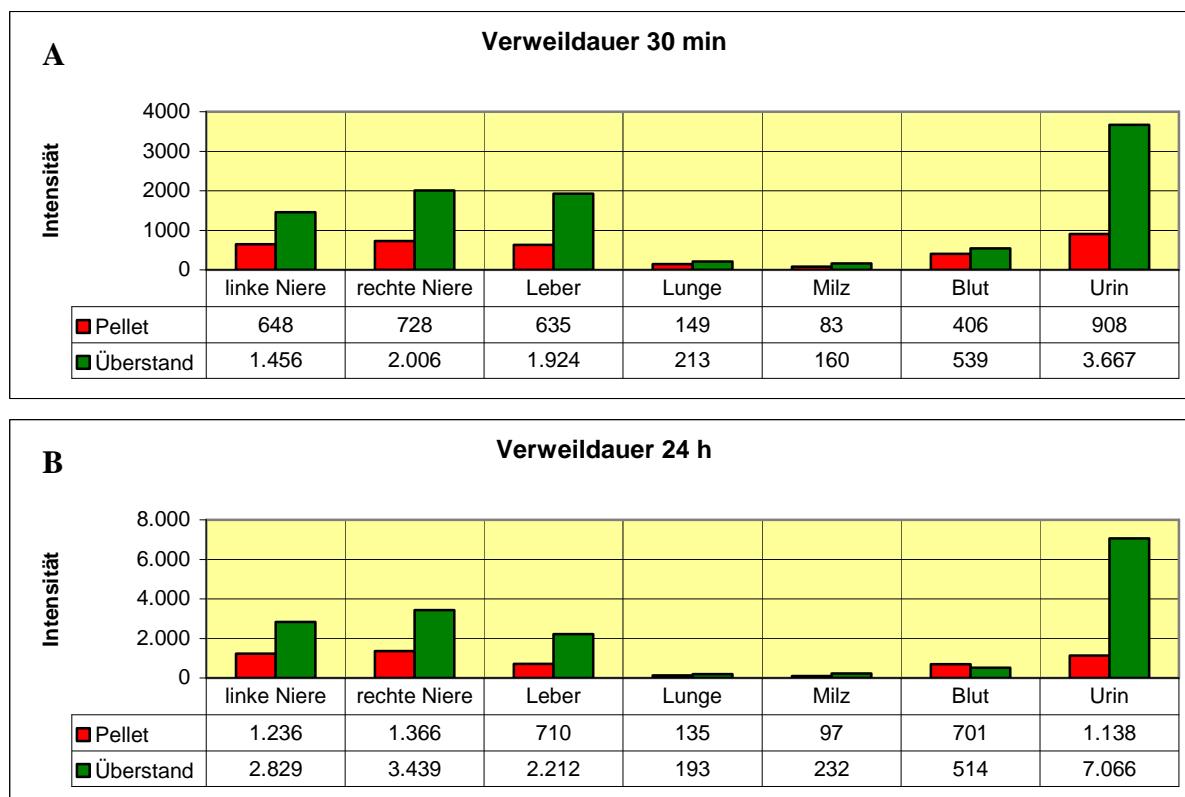


Abb. 24: Zentrifugation der Quantenpunkte bei verschiedenen Zentrifugalbeschleunigungen. In A diente PBS als umgebendes Medium, in B ein Puffer aus PBS, Harnstoff und Triton X-100. Dargestellt sind die Messreihen ohne Verzögerungszeit (Mittelwerte aus zwei Proben plus Standardabweichungen).

3.2.3 Systemische i.v.-Injektion der Quantenpunkte in Ratten

Anschließend wurden die Quantenpunkte intravenös in zwei Ratten injiziert. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zum entsprechenden Versuch mit Nanopartikeln mit Verweildauern von 30 min und 24 h. Für die Messung wurden die Einstellungen der vorangegangenen Versuche mit Quantenpunkten beibehalten. Als Verzögerungszeiten wurden in beiden Fällen 10 µs, 20 µs und 30 µs miteinander verglichen. Die Ergebnisse der verschiedenen Messverzögerungen unterscheiden sich in der Relation zueinander nicht, lediglich die Absolutbeträge der Werte differieren: Während die höchsten Werte nach 10 µs

erreicht werden, betragen die Werte nach 20 µs noch knappe 40% und nach 30 µs nur noch etwa 10% davon. Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse bei einer Verzögerungszeit von 10 µs sowie bei gleicher Einstellung die Negativkontrolle der Gewebshomogenisate ohne vorherige Injektion von Quantenpunkten (Abb. 25). Dabei fällt auf, dass in keinem Fall der Wert des Pellets den des Überstandes wesentlich übertrifft. Auch im Vergleich der beiden Messreihen sowohl untereinander als auch mit der Negativkontrolle kann weder bezüglich der Verteilung noch der Größenordnung der Werte ein entscheidender Unterschied festgestellt werden. In der Zusammenschau der Messreihen werden noch einmal die gewebetypischen Eigenschaften der Organe deutlich: In Nieren, Leber und Urin ist vor allem im Überstand viel Hintergrundfluoreszenz detektierbar, während in Lunge, Milz und Blut vergleichsweise wenig Fluoreszenzstrahlung nachweisbar ist. Da es also mit der bei Nanopartikeln bewährten Methode nicht möglich war, die Quantenpunkte vom Gewebe zu differenzieren, wurden die Eigenschaften von Quantenpunkten in weiteren Versuchen genauer analysiert.



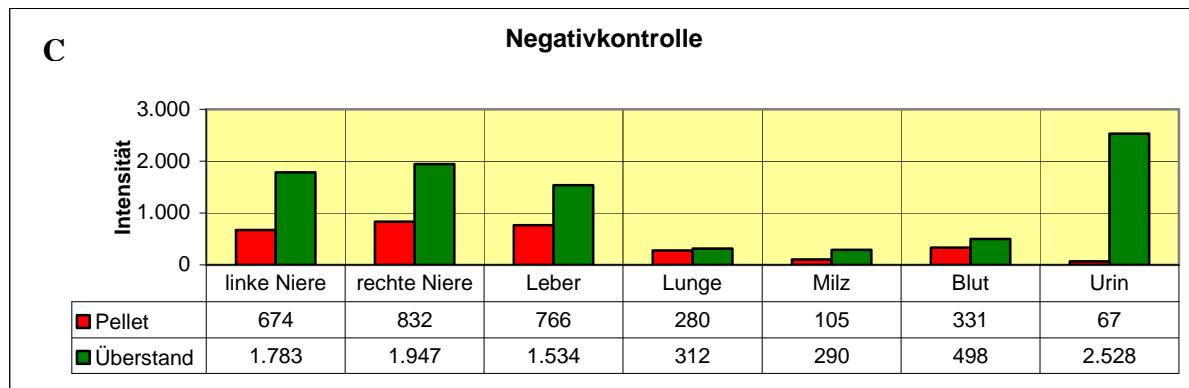


Abb. 25: Systemische i.v.-Injektion von Quantenpunkten in Ratten. In A und B sind Verweildauern von 30 min bzw. 24 h dargestellt, C zeigt die Negativkontrolle bei gleichen Bedingungen. Die Messverzögerung betrug jeweils 10 μ s.

3.2.4 Bestimmung der Abklingzeiten der Fluoreszenz von Quantenpunkten

Um präzisere Informationen über die Eigenschaften der Quantenpunkte zu erreichen, wurden zunächst mit dem vielseitigeren Fluorimeter FluoroLog (Horiba Joben Yvon) eine Messreihe erstellt, bei der die Proben wiederum aus den Komponenten Quantenpunkte, Nierenlysat und einem Gemisch aus beiden bestanden. Die Anregung erfolgte mit einer für die Quantenpunkte geeigneten Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm. Hier wurde die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung bei einer konstanten Wellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 540$ nm in Abhängigkeit von der Zeit detektiert. Diese Emissionswellenlänge entsprach in etwa der bisher verwendeten, weshalb man die Fluoreszenzstrahlung der Quantenpunkte hier gut erfassen können sollte. Abbildung 26 zeigt vergleichend den Verlauf der Einzelmessungen. Die Anregung der Proben durch das Gerät erfolgte nach einer Zeitdauer von etwa 100 ns. Hier steigt die Intensität bei allen Proben schlagartig an. Man erkennt eine deutliche Staffelung, bei der die Quantenpunkte allein den höchsten Wert in einer Größenordnung von 10^5 erzielen, das Nierenlysat den geringsten im Bereich von 10^4 . Bei der Interpretation der Darstellung muss berücksichtigt werden, dass es sich um eine logarithmische Skalierung der y-Achse handelt, so dass geringe Unterschiede im Graphen wesentliche Differenzen der Messwerte bedeuten. Die Fluoreszenzstrahlung der Quantenpunkte hält im Vergleich zu der des Nierenlysats wesentlich länger an. Bereits ca. 100 ns nach der Anregung ist im Nierenlysat kaum mehr Fluoreszenz nachweisbar, während die Quantenpunkte sich sogar noch nach 1.500 ns signifikant von den anderen Messreihen unterscheiden. Diese Konstellation wäre eventuell für

eine zeitverzögerte Messung von Proben geeignet, da auf diese Weise die Hintergrundfluoreszenz minimiert werden kann. Allerdings zeigt die Messung des Gemisches aus beiden Substanzen, dass die Fluoreszenz der Quantenpunkte wie auch im Vorversuch durch Komponenten des Lösungsmittels erheblich unterdrückt wird. Bereits weniger als 200 ns nach Anregung ist die Intensität wieder so weit abgesunken, dass eine Differenzierung zur Hintergrundstrahlung unmöglich wird. So verringert sich der zeitliche Rahmen, in dem eine zeitverzögerte Messung sinnvoll wäre, auf den Bereich von etwa 80 bis 150 ns nach Anregung. Ein Gerät wie das primär verwendete Fluorimeter GENios Plus könnte Messungen dieser Präzision nicht leisten und ist somit für den Nachweis der Quantenpunkte in dieser Form ungeeignet.

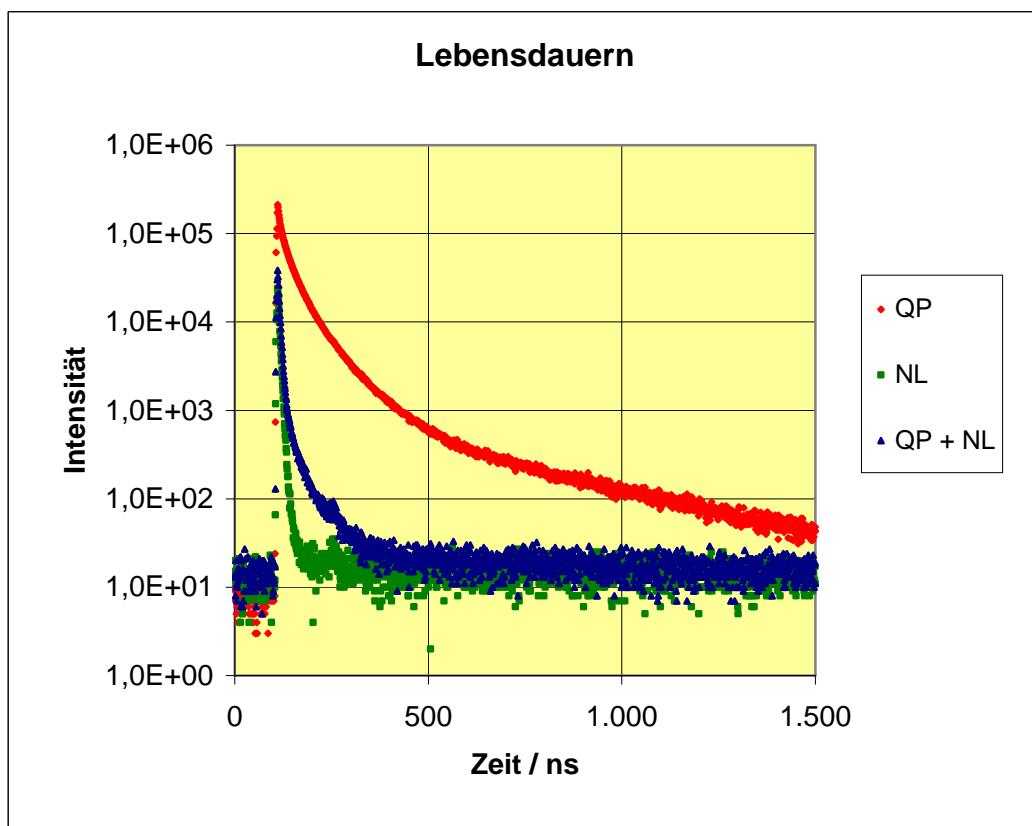


Abb. 26: Lebensdauern der Fluoreszenzstrahlung von Quantenpunkten (QP), Nierenlysat (NL) und der Kombination beider Substanzen nach Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$. Durch Zusatz des Nierenlysats wird die Emission der Quantenpunkte wesentlich unterdrückt.

3.2.5 Bestimmung von Emissionsspektren

Weiterhin wurden verschiedene Emissionsspektren aufgenommen. Dadurch sollte vor allem geklärt werden, ob die Wellenlängen zur Detektion der Fluoreszenzstrahlung sinnvoll gewählt wurden. Analysiert wurden eine Probe mit Quantenpunkten, eine mit Nierenlysat und eine aus in Nierenlysat gelösten Quantenpunkten (Abb. 27). Nachdem die Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 300$ nm angeregt worden waren, wurde die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung für den Wellenlängenbereich λ_{em} von 400 bis 600 nm dargestellt. Für die Quantenpunkte ergab sich ein Intensitätsmaximum bei 541 nm. Das Maximum des Nierenlysats liegt bei 504 nm, wobei hier die Intensität im anschließenden höheren Wellenlängenbereich nur sehr langsam abfällt. Auch in der kombinierten Messung der beiden Komponenten lassen sich die unterschiedlichen Maxima voneinander abgrenzen.

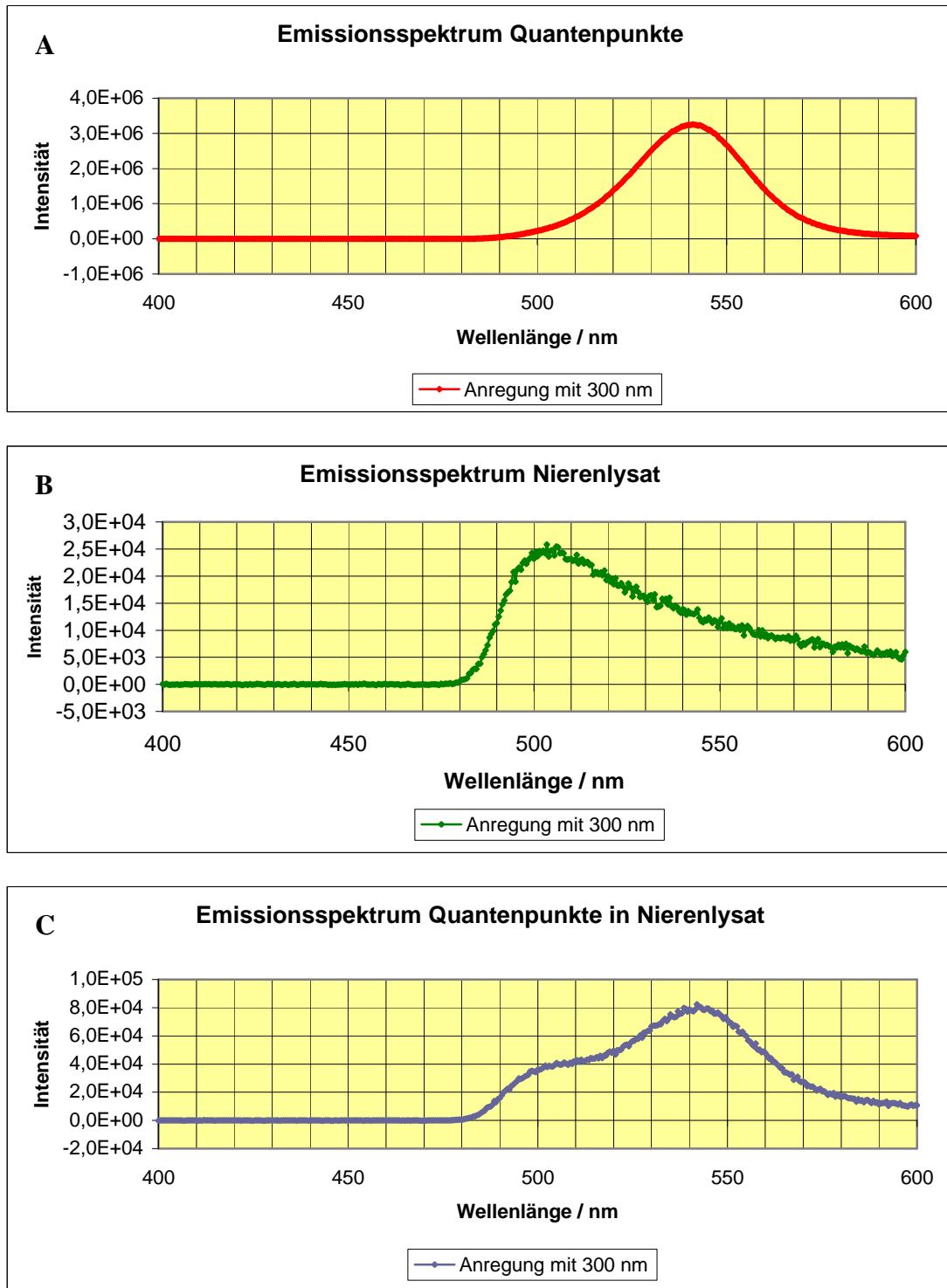


Abb. 27: Emissionsspektren von Quantenpunkten, Nierenlysat und einer Kombination beider Komponenten. Zu sehen sind die unterschiedlichen Maxima der emittierten Fluoreszenzstrahlung.

Das größere Problem bei der Messung der Proben wird deutlich, wenn man die drei Kurven übereinander gelegt betrachtet (Abb. 28): Während die Größenordnung des Intensitätsmaximums der Quantenpunkte allein bei 10^6 liegt, fällt sie bei der Kombination mit

Nierenlysat bei gleicher Konzentration der Quantenpunkte um zwei Zehnerpotenzen ab. Somit unterscheiden sich die Werte der zu messenden Substanz und die der Hintergrundfluoreszenzstrahlung kaum noch.

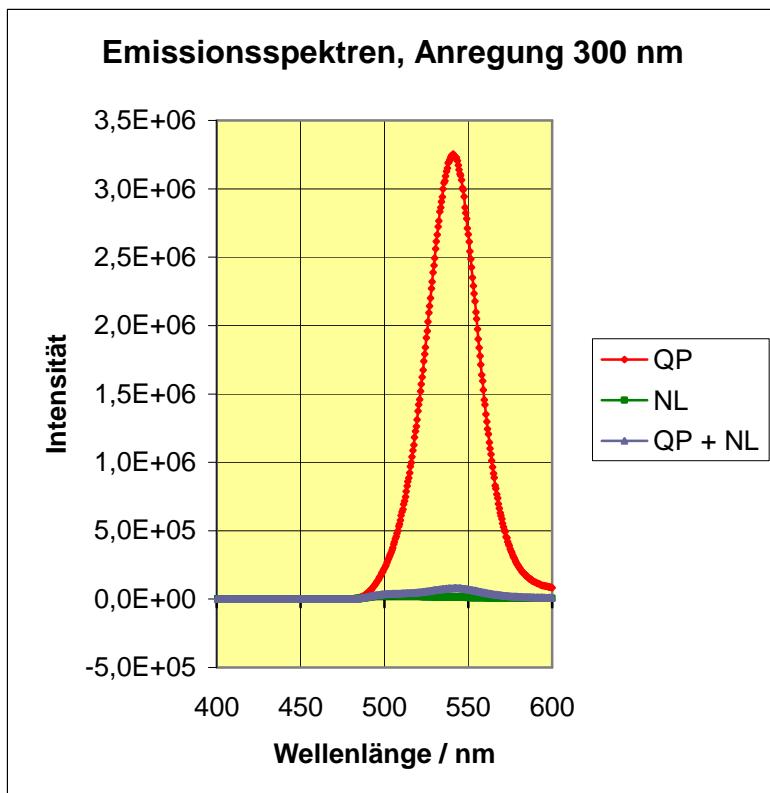


Abb. 28: Emissionsspektren von Quantenpunkten (QP), Nierenlysat (NL) und einer Kombination beider Komponenten. Die Darstellung betont den Unterschied in der Größenordnung der Messreihen.

Um die für die Unterdrückung der Emissionsstrahlung verantwortliche Substanz zu identifizieren, wurden in mehreren Einzelmessungen die Lösungsmittel selbst und deren Einfluss auf die Intensität der Fluoreszenzstrahlung von Quantenpunkten untersucht. Abbildung 29A zeigt die Emissionsspektren der Lösungsmedien. Alle Substanzen weisen gleichermaßen ein Intensitätsmaximum bei ca. 465 nm auf im Vergleich zum Maximum des kompletten Nierenlysats von 504 nm. Die Werte unterscheiden sich nur wenig, wobei das Gemisch aus PBS, Triton X-100 und SDS sowie Triton X-100 die höchsten und H₂O bidest die geringsten Werte liefern. Im zweiten Versuchsteil (Abb. 29B) wird deutlich, dass die Größenordnung der Fluoreszenz der Quantenpunkte in ihrem Maximum bei 541 nm wesentlich höher liegt. Dies kommt in H₂O bidest maximal zur Ausprägung. Der im entsprechenden Wellenlängenbereich noch erkennbare Gipfel der Lösungsmittel fällt im

Vergleich dazu kaum mehr ins Gewicht. In Kombination mit einem anderen Lösungsmittel als Wasser wird die Fluoreszenz allerdings deutlich unterdrückt. Mit Triton X-100 fällt die Intensität bereits um mehr als die Hälfte ab, SDS eliminiert die Emissionsstrahlung beinahe vollständig. Deshalb ist es allem Anschein nach auf die Anwesenheit von SDS zurückzuführen, dass im verwendeten Puffergemisch aus PBS, Triton X-100 und SDS der Nachweis der Quantenpunkte nicht gelingt.

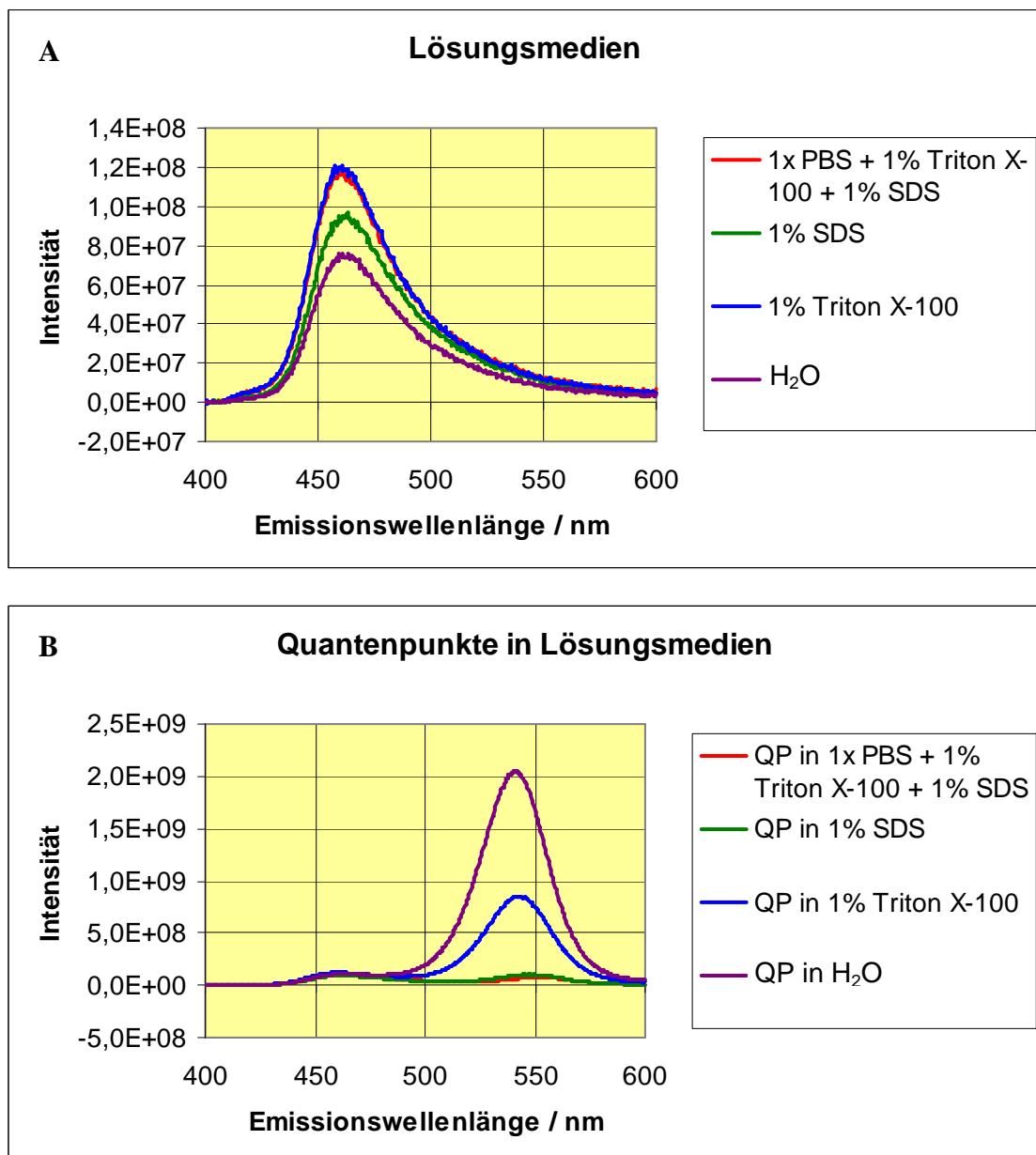


Abb. 29: Emissionsspektren der Lösungsmedien (A) und der Quantenpunkte im Gemisch mit den Einzelkomponenten (B). Während die Quantenpunkte (QP) in H₂O bdest optimal nachweisbar sind, wird das Signal durch andere Komponenten des Lösungsmittels zum Teil fast vollständig unterdrückt.

4. Diskussion

4.1 Fluorimetrischer Nachweis

4.1.1 Nanopartikel

Bevor die Ergebnisse im Einzelnen diskutiert werden können, muss vorausgeschickt werden, dass die fluorimetrischen Messergebnisse in erster Linie eine qualitative Interpretation zulassen. Die quantitative Beurteilung ist nur sehr eingeschränkt möglich. Insbesondere beim Vergleich von Intensitäten verschiedener Messreihen darf sich eine Schlussfolgerung nicht auf die Betrachtung von Absolutwerten stützen, sondern sollte vielmehr aus der Interpretation der Größenordnungen und Relationen zueinander resultieren. Da mit den verschiedenen Partikeln insgesamt eine sehr große Anzahl an Messreihen durchgeführt wurde, deren wesentliche Aussagen eine gemeinsame Richtung erkennen lassen, wurde in den Einzelversuchen auf eine Erhöhung der Anzahl an Vergleichsproben verzichtet.

Der erste Teil der Versuche diente dazu, sich mit den Eigenschaften der Nanopartikel vertraut zu machen und auf der Basis dieser Erkenntnisse eine für die standardisierte Anwendung geeignete Nachweismethode zu etablieren. Es wurde zunächst mit den Partikeln PtTFPP-PD-COOH und Ru(dpp)₃-PAN-COOH gearbeitet. Gemessen wurden erstere bei Wellenlängen von $\lambda_{\text{ex}} = 405$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 635$ nm und die zweitgenannten bei $\lambda_{\text{ex}} = 430$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 612$ nm. Die vorangestellten Verdünnungsreihen bestätigen durch den in Abbildung 7 dargestellten exponentiellen Verlauf des Graphen, dass die Einstellungen der Wellenlängen und Zeiten am Fluorimeter sinnvoll gewählt wurden und dass eine gute Messgenauigkeit erzielt wird. Von entscheidender Bedeutung für das gesamte Verfahren ist das Verhalten der Nanopartikel bei Zentrifugation. Da man stets bestrebt ist, mit einer möglichst geringen Menge an Partikeln auszukommen und diese bei der Verteilung im Organismus des Versuchstieres zusätzlich erheblich verdünnt werden, ist man darauf angewiesen, aus einem gegebenen Probenvolumen das Fluoreszenzmaterial möglichst vollständig zurückzugewinnen. Nur so erhält man fluorimetrisch detektierbare Konzentrationen. Die Zentrifugation könnte hierfür ein geeignetes Verfahren darstellen. In PBS erscheinen beide verwendeten

Partikelsorten ab einer Zentrifugalbeschleunigung von 100.000 g im Pellet. Bei Zentrifugation mit 150.000 g sollte man also mit ausreichender Sicherheit Nanopartikel aus dem Probenvolumen abzentrifugieren können. Andersherum betrachtet, muss man bei weniger starker Zentrifugation nicht befürchten, die nachzuweisenden Nanopartikel bereits ins Pellet zu verlieren, sondern kann der Ultrazentrifugation in späteren Versuchen eine schwächere Zentrifugation zur Entfernung größerer Gewebsbestandteile voranstellen. Auffällig ist jedoch, dass bei Zusatz von Harnstoff und Triton X-100 das Pelletieren erschwert ist und bei einer der Partikelsorten sogar überhaupt nicht mehr möglich ist. Dies wurde weiter untersucht, da auch in späteren Proben Substanzen zum Homogenisieren des Gewebes zugesetzt werden müssen. Durch einen entsprechenden Versuch (s. Abb. 9) wurde bestätigt, dass eine zu hohe Konzentration an Harnstoff das Abzentrifugieren behindert. Man wird also versuchen müssen, die Harnstoffkonzentration möglichst gering zu halten.

Schließlich wurde der Einfluss des kompletten Gewebshomogenisats auf das Abpelletieren der Nanopartikel untersucht, dem zum Zeitpunkt der Ultrazentrifugation neben 1 M Harnstoff auch 1% Triton X-100 und 1% SDS zugesetzt waren. Während die Partikel PtTFPP-PD-COOH einen deutlichen Nachweis von Fluoreszenz im Pellet zeigen, konnte für Ru(dpp)₃-PAN-COOH ein Abzentrifugieren nicht nachgewiesen werden (Abb. 10). Es sollte deshalb versucht werden, das Verfahren zu verbessern, um eine möglichst breite Anwendung zu ermöglichen. Zur besseren Interpretation der Ergebnisse wurde der Versuch zunächst wiederholt und durch zusätzliche Messungen erweitert: Bei einer Probe aus reinem Nierengewebshomogenisat ist nach einer Verzögerungszeit von 40 µs keine Fluoreszenz mehr nachweisbar (Abb. 11A), wohl aber bei sofortiger Messung (Abb. 11B und C). Dies zeigt deutlich, dass Fluoreszenzstrahlung, die durch Gewebshintergrund entsteht, schnell abklingt und somit das Hintergrundrauschen bei ausreichender Langlebigkeit der Fluoreszenz der eingesetzten Partikel durch Messen nach einer Verzögerungszeit minimiert werden kann. Ist das nicht der Fall, so findet sich die Fluoreszenzstrahlung des Gewebes hauptsächlich im Überstand. Die Dichte der nicht zuletzt aufgrund der Homogenisierung niedermolekularen Gewebsbestandteile ist offensichtlich ausreichend gering, dass diese nicht durch die Zentrifugation erfasst werden und somit im Überstand verbleiben. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da es so nicht zu einem bloßen Abzentrifugieren sämtlicher korpuskulärer und möglicherweise fluoreszierender Bestandteile der Lösung kommt, sondern sehr wahrscheinlich eine tatsächliche Trennung zwischen Nanopartikeln und Gewebsbestandteilen

erfolgt. Deshalb finden sich bei Messungen der Nanopartikel PtTFPP-PD-COOH in Gewebe für Pellet und Überstand annähernd gleiche Werte: Im Pellet wird die Fluoreszenz hervorgerufen durch die abzentrifugierten Partikel, im Überstand hingegen entstammt sie den fluoreszierenden Anteilen des Gewebes (Abb. 11B). Die Messung der Partikel Ru(dpp)₃-PAN-COOH unterscheidet sich darin, dass der Nachweis partikelspezifischer Fluoreszenz im Pellet nicht gelang. Mögliche Ursachen können sein, dass das Abzentrifugieren nicht erfolgreich war und deshalb die Fluoreszenz der Partikel im großen Volumen des Überstandes untergeht, oder dass die Fluoreszenz der Partikel durch eine Substanz unterdrückt wird und somit lediglich der Nachweis im Pellet nicht gelang. Der Verzicht auf SDS brachte statt eines verbesserten Nachweises sogar erniedrigte Werte im Pellet, so dass in Anbetracht der wesentlich schlechteren Resuspendierbarkeit des Pellets SDS wieder im vollem Umfang eingesetzt wurde. Eine Unterdrückung der Fluoreszenz der Partikel durch das Homogenisat im Vergleich zum Puffer kann nicht ausgeschlossen werden, scheint die Messung aber keinesfalls wesentlich zu beeinträchtigen. Da zumindest für die Partikel PtTFPP-PD-COOH der Nachweis bisher erfolgreich war, wurden nun die Bedingungen erschwert, indem die Partikel in wesentlich größeren Volumina gelöst wurden. Dies entspricht eher der angestrebten Konstellation für Versuchstiere. Leider konnte der Nachweis der Partikel hier nicht reproduziert werden. Trotz einer Messverzögerung von 40 µs überwiegt die Fluoreszenz im Überstand (Abb. 12). Deshalb wurde noch einmal an den in den Kapiteln 2.4.3 bzw. 3.1.3 erläuterten Versuch der Harnstoffverdünnungsreihe angeknüpft und unter der Annahme, dass der Harnstoff hauptverantwortlich für den erschwerten Nachweis ist, der Harnstoffanteil in der Probe minimiert. Da ein primäres Verdünnen der Harnstoffkonzentration auf Werte unter 1 M aufgrund der notwendigen Homogenisierung des Gewebes nicht sinnvoll schien, wurde im Anschluss an die Lysierung das Verfahren der Dialyse angewendet. Dieses sollte unmittelbar vor der Ultrazentrifugation den Harnstoff möglichst vollständig aus den Proben entfernen. Der Effekt zeigt sich sehr deutlich, da trotz weiter erhöhten Probenvolumens ein eindeutiger Nachweis von partikelspezifischer Fluoreszenz im Pellet zu sehen ist (Abb. 13). Auch bei weiterer Vergrößerung des Volumens durch Verwenden von Ratten- statt Mäusenieren ließ sich das Ergebnis reproduzieren (Abb. 14).

Um nun noch einmal die Wechselwirkungen der Fluoreszenz von Nanopartikeln mit anderen Bestandteilen der Lösung aufzuschlüsseln und auszuschließen, dass der Nachweis bei vorhandenen Partikeln aufgrund von Quencheffekten rein an der Detektion scheitert, wurde

eine weitere Messreihe durchgeführt (Abb. 15). Ein konstantes Volumen an Nanopartikeln wurde in verschiedenen Medien gelöst und die Werte der Fluoreszenzstrahlung miteinander verglichen. Im Rahmen der Messgenauigkeit ergaben sich keine wesentlichen Schwankungen, weshalb keine der beteiligten Substanzen als störend deklariert werden kann. Nicht einmal die Probe in Kombination mit Harnstoff liefert erniedrigte Fluoreszenzwerte. Daraus kann gefolgt werden, dass in vorangegangenen Versuchen nicht das Messen der Partikel unterdrückt, sondern schon deren Abzentrifugieren unter dem Einfluss von Harnstoff verhindert wurde. Die Auftrennung von Lösungen in ihre Bestandteile mit Hilfe von Zentrifugation beruht auf den Dichteunterschieden der einzelnen Komponenten und ist bei zunehmender Viskosität der Lösung erschwert. Durch den Zusatz von Harnstoff, dessen Dichte etwa $1,32 \text{ g/cm}^3$ beträgt, erhöhen sich bei einer Konzentration von 8 mol/l im Vergleich zur wässrigen Lösung sowohl die Dichte um etwa 12% als auch die Viskosität um über 66% [Kawahara 1966]. Die Versuche haben gezeigt, dass diese Veränderungen der physikalischen Bedingungen ausreichen, um die Nanopartikel in Lösung zu halten. Als letztes technisches Verfahren wurden noch unterschiedliche Methoden zum Auflösen des Pellets verglichen. Die Überlegung, eine zusätzliche Inkubation oder die Zuhilfenahme von Ultraschall könnte die Ausbeute beim Resuspendieren optimieren, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die mit zusätzlichen Hilfsmitteln erzielten Ergebnisse unterscheiden sich nur unwesentlich von denen nach klassischer Resuspension per Pipette (Abb. 16).

Der nächste große Abschnitt in der Entwicklung der Nachweismethode bestand darin, die nach Zusammenmischen der Nanopartikel mit den Lösungsmedien gelungene Auftrennung auch nach systemischer Applikation der Partikel in den Organismus einer Ratte zu erreichen. Die zunächst 20 μl der Partikel PtTFPP-PD-COOH konnten aber weder nach 30 min noch nach 2 h Zirkulationsdauer in einem der getesteten Organe detektiert werden (Abb. 17). Nachdem mit einer weiteren Negativkontrolle mit Proben aller untersuchten Organe sichergestellt wurde, dass in keinem Fall Hintergrundrauschen eine Fluoreszenzstrahlung im Pellet verursacht (Abb. 18), wurde der Versuch mit dem zehnfachen Partikelvolumen von 200 μl wiederholt. Wie aus den Einzeldiagrammen von Abbildung 19 ersichtlich ist, reicht dieses Volumen aus, um im Gewebe einzelner Organe nachweisbare Mengen an Partikeln anzureichern. So findet sich beispielsweise in den Messreihen der genannten Partikel im Pellet von Leber und Lunge eine derart hohe Intensität an Fluoreszenzstrahlung, die nur durch die fluoreszierenden Eigenschaften der Nanopartikel verursacht sein kann. Die

Vorgehensweise zum Nachweis der Partikel erweist sich demnach als praktikabel und wird in dieser Form auch auf alle anderen Partikelarten angewendet. Da jedoch in vorangegangenen Versuchen die Detektion der zweiten Partikelart nicht erfolgreich war, werden nur alle Messungen der Partikel mit dem Farbstoff PtTFPP weiterhin mit dem Fluorimeter GENios Plus durchgeführt. Die Ru(dpp)₃ als Farbstoff enthaltenden Partikel wurden mit dem speziell abgestimmten und genaueren Fluorimeter des Lehrstuhls für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg gemessen, was den gewünschten Nachweis schließlich ebenfalls ermöglichte (Abb. 19G bis M).

4.1.2 Quantenpunkte

Mit dem Ziel, für die Quantenpunkte ein vergleichbares Nachweisverfahren zu entwickeln wie es bei den Nanopartikeln gelungen war, wurde auch hier zunächst eine Verdünnungsreihe erstellt. Die mit dem Fluorimeter GENios Plus bei den Wellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ gemessenen Werte aus Abbildung 23 bestätigen die erwartete Tendenz, dass mit zunehmender Verdünnung und Verzögerungszeit die gemessene Strahlungsintensität abnimmt. Jedoch lässt sich aus keiner der zu einer bestimmten Messverzögerung gehörenden Wertegruppen eine exponentiell abnehmende Funktion extrapolieren. Denkbare Ursachen wären, dass entweder bereits bei der Verarbeitung Ungenauigkeiten entstanden sind oder die technischen Voraussetzungen des Fluorimeters eine präzisere Messung nicht zulassen. Außerdem fällt der große Sprung in der Intensität zwischen den Verzögerungszeiten 5 und 10 μs auf, weshalb man für die Zerfallszeit der Fluoreszenz der Quantenpunkte ein Zeitintervall im Bereich zwischen 5 und 10 μs vermuten kann. Vom zeitlichen Verlauf der Strahlungsemision her unterscheiden sich die Quantenpunkte somit nur wenig vom Gewebshintergrund. Die zweite Messung mit potenteren Partikeln bestätigt die getroffenen Aussagen, auch wenn die beiden Werte für 0 und 5 μs Messverzögerung der Verdünnung 1:20 aufgrund der großen Strahlungsintensität vom Gerät nicht angezeigt werden konnten. Die Einstellungen am Gerät wurden dafür bewusst nicht verändert, um die Vergleichbarkeit der beiden Messreihen zu wahren.

In der folgenden Versuchsreihe sollte das Verhalten der Quantenpunkte bei Zentrifugation analog zu den Versuchen mit Nanopartikeln ausgetestet werden. Es zeigte sich, dass ab einer

Zentrifugalbeschleunigung von 100.000 g im Pellet mehr Fluoreszenzstrahlung nachgewiesen werden konnte als im Überstand (Abb. 24). Bei einer Zentrifugation mit 150.000 g sollten sich die Quantenpunkte einer Probe demzufolge im Pellet aufkonzentrieren lassen. Die großen Schwankungen der Messwerte bei den in PBS, 8 M Harnstoff und 1% Triton X-100 gelösten Quantenpunkten lassen sich durch eine aufgrund der höheren Viskosität des Gemisches erschwerde Pipettierbarkeit erklären. Die Absolutwerte dieser Messreihe betragen nur etwa die Hälfte der in PBS gemessenen Werte, was auf Quenching durch Lösungsmittelzusätze hindeutet. Wäre die Intensitätsminderung auf erschwerde Zentrifugierbarkeit zurückzuführen, würde man die erniedrigten Werte nicht bereits im Überstand erwarten. Dass die Werte bei Messung nach 10 μ s auf etwa 1/10 ihres Ausgangswertes abgefallen sind, deckt sich mit der aus dem Vorversuch abgeleiteten Lebensdauer der Quantenpunkte. Anschließend sollten auch die Quantenpunkte nach systemischer Injektion in Ratten in Gewebeproben nachgewiesen werden. Eine Negativkontrolle ohne Quantenpunkte, bei der die Intensität von Fluoreszenzstrahlung in Gewebeproben ohne Verzögerungszeit gemessen wurde, liefert für die Organe Niere und Leber sowie den Urin vergleichsweise hohe Absolutwerte im Bereich von etwa 15.000 (nicht dargestellt). Deshalb wurde versucht, durch Messen nach 10 μ s bei noch detektierbarer Restfluoreszenz der Quantenpunkte den Gewebshintergrund zu minimieren (Abb. 25). Da sich aber in keiner der Proben im Pellet eine den Überstand übersteigende Fluoreszenz findet, sondern die Verteilung der Werte weitgehend der Negativkontrolle entspricht, kann kein Hinweis auf das Verbleiben der Quantenpunkte gefunden werden.

Um aber präzisere Darstellungen und damit auch bessere Interpretationsmöglichkeiten zu erhalten, wurden mit dem vielseitigeren Fluorimeter FluoroLog, mit dem sowohl im Hinblick auf Wellenlängen als auch in zeitlicher Hinsicht kontinuierliche Messungen durchgeführt werden können, weitere Versuche angeschlossen. Zunächst sollte eine eindeutige Aussage zu den Lebensdauern der einzelnen Substanzen gemacht werden, die nicht auf indirekten Schlussfolgerungen beruht wie im vorangegangenen Versuch. Eine Gegenüberstellung des zeitlichen Verlaufes der emittierten Strahlung von Quantenpunkten, Nierenlysat und dem Gemisch aus beiden Komponenten wird in Abbildung 26 veranschaulicht. Es wird deutlich, dass selbst die Lebensdauer der Quantenpunkte allein maximal im Bereich von wenigen Mikrosekunden liegt, so dass man den Vorteil der zeitverzögerten Messung mit einem Fluorimeter geringer Genauigkeit nicht nutzen kann. Initial unterscheidet sich die detektierte

Strahlung von der Fluoreszenz des Nierenlysats um etwa eine Zehnerpotenz, was für eine Differenzierung ausreichend scheint. Betrachtet man allerdings das Gemisch aus Nanopartikeln und Nierenlysat, so fällt ein erhebliches Quenching der Fluoreszenz im Vergleich zu den reinen Partikeln auf: Der Unterschied zum reinen Nierenlysat bezüglich der Lebensdauer übersteigt hier kaum die 100 ns. Selbst der initiale Absolutwert bietet kaum einen Intensitätsunterschied zwischen Gemisch und Nierenlysat und kann deshalb zur Differenzierung nicht herangezogen werden. Dies würde nach der bisherigen Methode ein Herausfiltern der erwünschten Strahlung zum Nachweis der Partikel im Gewebe auch bei sofortiger Messung unmöglich machen. Da dies aber nicht eindeutig aus dem Diagramm ersichtlich ist und es sich um eine logarithmische Skalierung der Ordinate handelt, die Aussagen über eine Differenzierbarkeit von Werten nur bedingt zulässt, sollten weitere Messungen diesen Sachverhalt näher beleuchten.

Es wurden in der Folge bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 300$ nm die Emissionsspektren von Quantenpunkten, Nierenlysat und einem Gemisch aus Quantenpunkten und Nierenlysat aufgenommen (Abb. 27). Die Emissionsmaxima von 541 nm für die Quantenpunkte und 504 nm für das Nierenlysat lassen sich deutlich voneinander abgrenzen. Damit liegt die Emissionswellenlänge, die vom vorher verwendeten Fluorimeter GENios Plus durch den zur Verfügung stehenden Filter von 535 nm vorgegeben ist, zwar nicht optimal, aber sehr nahe am Maximum der Quantenpunkte. Jedoch verdeutlicht die einheitliche Skalierung in Abbildung 28 ein weiteres Mal, dass es zu einem extremen Quenching der Fluoreszenzstrahlung der Quantenpunkte durch Komponenten des Gewebshomogenisats kommt. Weitere Messungen sollten den Einfluss der beteiligten Lösungsmittel im Einzelnen näher beleuchten (Abb. 29). Das gemeinsame Maximum der Einzelsubstanzen bei ca. 465 nm liegt im noch kurzwelligeren Bereich als das des Gesamthomogenisats und befindet sich damit in gutem Abstand vom Maximum der Quantenpunkte. Außerdem war es bei der Messung des Nierenlysats (Abb. 27B und C) gar nicht in Erscheinung getreten, so dass dadurch keine Verfälschung des Messergebnisses zu befürchten war. Eine endgültige Bestätigung und Aufschlüsselung des Hauptproblems der Messung geht aus Abbildung 29B hervor: Schon Triton X-100 bewirkt ein deutliches Quenching, aber in Anwesenheit von SDS, sowohl einzeln als auch im Gemisch mit den anderen Komponenten, ergibt sich beinahe eine vollständige Auslöschung des Signals. Da aus den Versuchen mit Nanopartikeln bekannt ist, dass auf SDS bei der praktischen Durchführung

des Nachweisverfahrens nicht verzichtet werden kann, ist mit der bisher angewendeten Methode unabhängig von der Zeitspanne zwischen Anregung und Messung ein Nachweis der Quantenpunkte nicht möglich.

4.2 Anwendung in der molekularen Bildgebung

4.2.1 Chemisch-physikalische Modifizierbarkeit der Nanomaterialien

Durch die beschriebenen Versuche wird deutlich, wie vielgestaltig die verschiedenen Nanomaterialien sind und wie sehr sich selbst geringe Modifikationen auf deren physikalische und chemische Eigenschaften auswirken. Es muss also versucht werden, möglichst viele dieser veränderbaren Größen sinnvoll zu kombinieren, um optimale Versuchsbedingungen zu schaffen. In erster Linie geschieht dies durch die Wahl des Farbstoffs. Es sind im Wesentlichen drei Gruppen von lumineszenten Farbstoffen bekannt, die zur Markierung von Biomolekülen Verwendung finden können. Die erste Gruppe umfasst die seltenen Erdmetall-Chelate wie Europium(III)- oder Terbium(III)-Komplexe, die sich allerdings nur im UV-Bereich anregen lassen [Diamanidis 1990; Sinha 1982; Rakicioglu 1999]. Zur zweiten Gruppe zählen u.a. die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Platin-Komplexe der Porphyrine mit Lebenszeiten zwischen 40 μ s und 1 ms. Nachteil dieses Farbstoffs ist, dass die emittierte Strahlung leicht von Sauerstoff und anderen Quenchern unterdrückt wird [Kürner 2001]. Die dritte Gruppe beinhaltet neben Osmium- und Rhenium-Komplexen auch die ebenfalls in dieser Arbeit gebrauchten Ruthenium-Komplexe mit Polypyridyl-Liganden. Deren Lebensdauern betragen zwischen 100 ns und 10 μ s [Szmacinski 1996; Guo 1997; Guo 1998; Juris 1988] bei weniger starker Beeinflussung durch Quencher. Die Bedeutung der Lebensdauer der Lumineszenz zur Unterscheidung von Strahlung durch Gewebshintergrund wurde bereits in der Diskussion der durchgeführten Versuche zum Ausdruck gebracht.

Entscheidende Parameter, die in unmittelbarem Zusammenhang mit dem gewählten Farbstoff stehen, sind die materialspezifischen Wellenlängen. Um die fluoreszierenden Partikel in der optischen Bildgebung möglichst vielseitig einsetzen zu können, müssen sowohl die anregende als auch die abgegebene Strahlung Gewebe gut durchdringen können und dürfen dort nicht

absorbiert oder gestreut werden. Dieses Durchdringungsvermögen ist weitgehend abhängig von der Wellenlänge: Unterhalb von 700 nm, also auch im Hauptbereich des sichtbaren Lichtes, steht die Absorption durch endogene Chromophore wie Hämoglobin, Melanin oder Lipide im Vordergrund, so dass nur eine Eindringtiefe von wenigen Millimetern erreicht wird. Oberhalb von 900 nm kann die Absorption durch Wasser Strahlung abfangen [Licha 2002; Tromberg 2000; Hawrysz 2000; Gurfinkel 2004; Frangioni 2003]. Der niedrigste Absorptionskoeffizient für Gewebe ergibt sich also zwischen 700 nm und 900 nm, im sogenannten infrarotnahen Bereich (NIR), wo ein maximales Durchdringungsvermögen von bis zu mehreren Zentimetern erzielt wird [Licha 2002; Tromberg 2000; Hawrysz 2000; Gurfinkel 2004]. Allerdings liegen sowohl die verwendeten Nanopartikel als auch die Quantenpunkte mit Exzitationswellenlängen von ca. 400 nm und Emissionswellenlängen von etwa 600 nm in einem kurzwelligeren Bereich außerhalb des optimalen NIR-Bereiches. Die Versuche selbst wurden dadurch aber nicht beeinträchtigt, da die Bildgebung nicht *in vivo* erfolgte und somit auch keine unbeteiligten Gewebeschichten durchdrungen werden mussten.

Um dem auch in den durchgeföhrten Versuchen oft erheblichen Problem des Quenching entgegenzuwirken, kann es hilfreich sein, die Lumineszenzfarbstoffe in eine geeignete Matrix einzubetten. Polyacrylnitril (PAN) und seine Derivate beispielsweise können die Farbstoffe von äußeren Einflussfaktoren wie Sauerstoff abschirmen [Buchenska 1997; Korte 1999]. Sie weisen eine ausgesprochen schlechte Permeabilität für Gase und ionische sowie neutrale chemische Stoffe auf und sind aufgrund ihres amphiphilen Charakters sowohl in hydrophilen als auch in lipophilen Substanzen löslich. Hinzu kommt, dass die so eingekapselten Nanomaterialien keine Tendenzen zeigen zu aggregieren oder zu sedimentieren. Unter den verschiedenen polyacrylnitrilbasierten Copolymeren erwies sich Polyacrylnitril mit einem Acrylsäureanteil von 5% (w/w) als am besten geeignet, da hier niedriges Quenching durch Sauerstoff, hohe Quantenausbeute, lange Lebensdauern und ein kleiner Durchmesser der Nanopartikel erreicht werden konnten [Kürner 2001]. Die Quantenpunkte aus den beschriebenen Versuchen weisen keinen derartigen Schutz vor einer Unterdrückung des Signals auf, was sich in den gewonnenen Ergebnissen widerspiegelt.

4.2.2 Verhalten der Nanomaterialien im Körper

Neben dem rein technischen Nachweis der Nanopartikel standen zudem deren Zielstrukturen im Körper im Mittelpunkt des Interesses. Um als potentielle Vehikel zur Darstellung der Nierenfunktion dienen zu können, war eine Anreicherung in den Nieren angestrebt. Was allerdings in allen Messreihen (Abb. 19) gleichermaßen zum Ausdruck kommt, ist ein Kumulieren der Nanopartikel in der Leber. Bei den beiden Farbstoffen PtTFPP und Ru(dpp)₃ zeigte sich bei den Leberproben eine im Vergleich zum Überstand deutlich erhöhte Intensität der Fluoreszenzstrahlung. Dabei entsprechen sich die Wertepaare der Verweildauern von 30 min und 24 h innerhalb einer Partikelsorte jeweils ungefähr in ihrer Größenordnung. Bei manchen Partikeln, insbesondere der Sorte PD-Pt-PEG, findet sich zusätzlich eine deutliche Anreicherung auch in der Lunge. Zu den Quantenpunkten kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, da nach systemischer Injektion kein Nachweis gelungen ist.

Schon wesentlich frühere Arbeiten verfolgten den Weg von kolloidalen Teilchen im Körper nach intravenöser Injektion, um sie gegebenenfalls als Transporter zur selektiven Verteilung von Medikamenten einsetzen zu können. Als Zielstruktur sollte beispielsweise das Gewebe bestimmter Tumoren dienen [Gregoriadis 1980; Juliano 1980; Couvreur 1980]. Jedoch ist seit damals das Problem bekannt, dass die Mehrzahl dieser Partikel von Leber und Milz aufgenommen werden [Weinstein 1981; DeKeyser 1990; Makino 2003]. Bei einer genauen Aufschlüsselung konnten Rolland et al. in allen Zelltypen der Leber (Hepatozyten, Endothelzellen und von Kupffer-Sternzellen) Partikel lokalisieren, wobei der weitaus größte Teil in den von Kupffer-Sternzellen zu finden war [Rolland 1988]. Dieses Ergebnis ist nicht nur mit den fluorimetrischen Messungen, sondern auch mit den fluoreszenzmikroskopischen Bildern der vorliegenden Arbeit (Abb. 20) sehr gut in Einklang zu bringen. Die Abbildungen zeigen, dass die Lokalisation der im Lebergewebe erheblich angereicherten Nanopartikel sich mit der Lage der von Kupffer-Sternzellen in den Sinusoiden zur Deckung bringen lässt.

Daraus ergaben sich zwei Ansätze: Einerseits kann man den Transport in die Leber als erwünscht ansehen und versuchen, auf diese Weise z.B. Behandlungsmöglichkeiten für dort lokalisierte Krankheiten wie die Leishmaniose oder Erkrankungen des retikuloendothelialen Systems zu etablieren [Alving 1979; Huang 2005]. Im vorliegenden Fall könnte das heißen, ein Bildgebungsverfahren zur Darstellung der Leber zu entwickeln. Oder aber man sucht nach

Möglichkeiten, wie die Phagozytose der Partikel verhindert werden kann. Eine frühe Überlegung bestand darin, das retikuloendotheliale System durch große Mengen vorweg injizierter unbeladener Plazebo-Teilchen z.B. aus Dextransulfat zu blockieren [Proffitt 1983; Bradfield 1980]. Allerdings stellt dieses Verfahren keine praktikable Alternative für die klinische Anwendung dar [Illum 1984]. Weitere Forschungen haben ergeben, dass auch physikalisch-chemische Eigenschaften wie Größe, Ladung oder Löslichkeit der Partikel die phagozytotische Aufnahme beeinflussen [Illum 1982; Xiankai 2005]. Hier wurde auch in der vorliegenden Arbeit angesetzt: Bei den Partikeln mit Ru(dpp)₃ als Farbstoff wurde die Endgruppe des Polyacrylnitril variiert. Während die Alkoholgruppe nach außen hin neutral ist, weisen die Aminogruppe in Lösung eine eher positive und die Carboxylgruppe eine eher negative Ladung auf. Auch in der Niere, dem Zielorgan, finden sich verschiedene geladene Baueinheiten wie die negativ geladene Glykokalix der Schlitzmembran zwischen den Podozytenfortsätzen oder die unterschiedlichen elektrostatischen Kräfte des Tubulussystems, die durch die selektiven Ionentransporter zustande kommen. Die erhofften Wechselwirkungen mit einer dieser Strukturen blieben aber aus, so dass in den Nieren keine Nanopartikel nachgewiesen werden konnten. Es ist anzunehmen, dass die Ladung der applizierten Teilchen intravasal durch Bindung an verschiedene Bestandteile des Blutes maskiert wird.

Ein weiterer Ansatz hat zum Ziel, die Erkennung der Nanopartikel durch das Immunsystem und somit deren phagozytotische Aufnahme zu verhindern [Arturson 1983; Moghimi 2001; Moghimi 2003]. Dies kann durch Modifikation der Oberfläche mit einem hydrophilen nichtionischen Polymer wie einem Poloxamerderivat [Illum 1984; Moghimi 1995; Moghimi 2000] oder Polyethylenglykol (PEG) [Neradovic 2004] erreicht werden. Durch die Oberflächenveränderung mit PEG, der sogenannten Pegylierung, konnte die Anreicherung der Partikel in der Leber um ca. 20% reduziert werden [Huang 2005]. Statt dessen verlängerte sich die Zirkulationsdauer im Gefäßsystem wesentlich und es kam zu vermehrter Aufnahme in die Milz [Li 2001; Xiankai 2005]. Auch in den Versuchen dieser Arbeit waren es die pegylierten Partikel PD-Pt-PEG, bei denen erhebliche Fluoreszenzstrahlung nicht nur in der Leber, sondern auch in der Lunge nachweisbar war. Für diese veränderte Verteilung im Körper werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert: Vermutete Ursachen sind, dass die verminderte Hydrophobizität phagozytotische Aufnahme verhindert, dass eine sterische Hinderung den Kontakt zwischen Partikeln und Blutzellen nicht zulässt oder dass eine Änderung der Oberflächeneigenschaften der Partikel die Adsorption von Komponenten des

Blutes verändert [Moghimi 1995; Wilkins 1966]. Außerdem wurde gezeigt, dass pegyierte Nanopartikel zur intravenösen Applikation geeignet sind [Peracchia 1999].

Wenn auch die durch markierte Nanopartikel entstandenen Möglichkeiten große Erwartungen hinsichtlich der Diagnose und Behandlung von Krankheiten wecken, so bleibt doch die Toxizität, sei sie potentiell oder erwiesen, als größte Hürde für die Anwendung in der klinischen Praxis [Hardman 2006]. Während organische Nanopartikel sich als unproblematischer erweisen, gilt dies insbesondere für die Schwermetalle enthaltenden Quantenpunkte. Deshalb sollten die entsprechenden Substanzen, die beispielsweise zu diagnostischen Zwecken in den menschlichen Körper injiziert werden, komplett und innerhalb einer vernünftigen Zeitspanne wieder ausgeschieden werden. Dem steht entgegen, dass in einer aktuellen Studie davon ausgegangen wird, dass Quantenpunkte mit entsprechender organischer Umhüllung für mindestens zwei Jahre im Körper verbleiben, ohne dabei ihre Fähigkeit zur Fluoreszenz einzubüßen [Ballou 2007]. Der derzeitige Lösungsansatz besteht darin, die Partikel in Größe und Umhüllung derart zu modifizieren, dass sie durch renale Clearance eliminiert werden können. Choi et al. untersuchten an fluoreszierenden Quantenpunkten, welche Kombinationen von Größe und Ladung eine schnellstmögliche Ausscheidung ermöglichen. Dabei erwiesen sich zwitterionische oder neutrale organische Hüllen als vorteilhaft, da es dabei zu keiner Adsorption von Serumproteinen kam, was den hydrodynamischen Durchmesser auf über 15 nm erhöhen und somit die renale Exkretion verhindern würde. Eine schnelle und effiziente Ausscheidung in den Urin gelang mit hydrodynamischen Durchmessern bis zu 5,5 nm [Choi 2007]. Diese Erkenntnisse sind nicht nur zur Reduktion der Toxizität nützlich, sondern können im vorliegenden Fall sogar dazu eingesetzt werden, dem eigentlichen Ziel der renalen Bildgebung näher zu kommen. Zwar wurde bisher keine Bindung an konkrete Nierenstrukturen erreicht, aber durch die schnelle renale Clearance muss die Markersubstanz die entsprechenden Einheiten des Ausscheidungssystems passieren. In dieser Phase können nicht nur Momentaufnahmen, sondern auch zeitaufgelöste Darstellungen angefertigt werden und Informationen über die Nierenfunktion liefern [Choi 2007].

4.2.3 Methoden zur Nutzung der Technologie

Die Grundprinzipien der optischen bzw. molekularen Bildgebung können in unterschiedlicher Weise eingesetzt werden. Ziel vieler Forschungsarbeiten ist es, nicht-invasive Methoden zu etablieren, die alternativ oder auch ergänzend zu bisherigen Verfahren neue Darstellungsformen in der Bildgebung ermöglichen. Dabei können nicht nur Krankheitsprozesse und molekulare Biomarker bestimmter Erkrankungen, sondern auch Wirkungsweisen und Pharmakokinetik von Medikamenten untersucht werden. Ein wesentlicher Schritt besteht darin, spezifische Marker oder Kontrastmittel zu finden, die man detektieren kann [Kovar 2007]. In Tierversuchen haben sich in diesem Zusammenhang verschiedene Angriffspunkte als geeignet erwiesen, die im Folgenden aufgeführt werden sollen.

Biolumineszenz befähigt verschiedene Lebewesen dazu, auf der Basis von chemischen Prozessen Energie in Form von Photonen abzustrahlen. Diese Eigenschaft kann man sich zunutze machen, um Genexpression, Aktivität von Promotoren oder Transkriptionsaktivitäten *in vivo* darzustellen [Glunde 2007]. Die für die Biolumineszenz verantwortlichen Luciferasen fassen eine Gruppe von Enzymen zusammen, die in Gegenwart von Sauerstoff und einem Substrat, dem sogenannten Luciferin, Licht im sichtbaren Bereich emittieren [Bovic 1973; DeLuca 1978]. Viele solcher Luciferase-Gene konnten isoliert und zur Bildung von DNA-Vektoren eingesetzt werden [Greer 2002]. Hamstra et al. beispielsweise verwendeten das Firefly-Luciferase-Gen des Leuchtkäfers in transgenen Mäusen als Marker für die Transkriptionsaktivität des p53-Gens [Hamstra 2006]. Ebenso können Photoproteine zu Bildgebungszielen eingesetzt werden. Neben dem seit 1961 bekannten grün fluoreszierende Protein (green fluorescent protein, GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* [Shimomura 1962; Shimomura 2006] gibt es eine Reihe weiterer Proteine mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren [Shaner 2004]. Durch Markierung verschiedener Strukturen mit GFP war es u.a. möglich, Tumorwachstum und Metastasierung [Yang 2000a], Tumorangiogenese [Yang 2001], Genexpression [Yang 2000b] und den räumlichen und zeitlichen Prozess bakterieller Infektion sowie der Reaktion auf Antibiotika [Zhao 2001] darzustellen.

Neben der Darstellung von fluoreszierenden Bestandteilen des Gewebes gibt es aber auch die Möglichkeit, extrinsisch Substanzen als Marker zuzuführen. Dies wird vor allem dann relevant, wenn ein Verfahren potentiell für die klinische Anwendung am Menschen geeignet sein soll [Kovar 2007]. Zunächst kann man hier die Gruppe der unspezifischen Fluorochrome zusammenfassen [Weissleder 2001a], zu der auch die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel und Quantenpunkte zählen. Die Möglichkeiten, unspezifische Fluorochrome einsetzen zu können, sind durch die Abhängigkeit von der physiologischen Verteilung des Stoffes im Körper limitiert. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, ist es mit großem Aufwand verbunden, das retikuloendothiale System zu umgehen und die Substanzen anderen Zielorganen zuzuführen. Trotz allem resultieren auch hieraus vielversprechende Forschungsansätze. So kann beispielsweise der fluoreszierende und sehr gut verträgliche Farbstoff Indocyaningrün (ICG) als Indikator für die Verteilung im Gefäßsystem und die anschließende hepatobiliäre Exkretion dienen, da er nach intravenöser Injektion an Plasmaproteine bindet und somit auf das intravaskuläre Volumen begrenzt bleibt [Cherrick 1960; Baker 1966; Hope-Ross 1994; Weissleder 2001a]. Aktuell konnte ICG sogar die Identifikation von Wächter-Lymphknoten bei Magenkarzinom-Operationen verbessern [Miyashiro 2008].

Um das Einsatzspektrum zu erweitern, wird versucht, die fluoreszierenden Partikel in Abhängigkeit von der Fragestellung an andere zielgerichtete Moleküle zu binden. Durch dieses Targeting sollen gezielt bestimmte Strukturen des Körpers angesteuert werden können. Dabei kann es sich um Oberflächenrezeptoren von Zellen, Hormonrezeptoren, Apoptosemarker oder metabolische Signalwege handeln [Kelloff 2005]. Die häufig angewendete Konjugation mit Antikörpern bringt allerdings einige Nachteile mit sich, die v.a. auf deren erheblicher Molekülgröße beruhen. So lösen größere Moleküle leichter unerwünschte Immunantworten aus, führen durch lange Halbwertszeiten im Blut zu hoher Hintergrundfluoreszenz und langen Clearance-Zeiten [Goldsmith 1997; Achilefu 2001] und diffundieren schlecht aus den Blutgefäßen ins Gewebe [Jain 1994]. Außerdem findet sich auch hier wieder eine bevorzugte Aufnahme durch die Leber, was den Nutzen der Antikörper-Konjugation in Frage stellt [Achilefu 2000]. Alternativ bietet sich die Konjugation mit Peptiden und kleinen Molekülen an, was zu wesentlich besseren pharmakokinetischen Eigenschaften führt. Neben einer zügigen Penetration zur Zielstruktur werden die Teilchen schnell über die Nieren ausgeschieden, ohne sich in der Leber anzureichern [Kovar 2007]. In

der praktischen Anwendung konnte im direkten Vergleich sogar in manchen Punkten eine Überlegenheit gegenüber der Szintigraphie gezeigt werden [Houston 2005]. Trotz allem bleibt die grundsätzliche Problematik des Targeting durch Konjugation mit Markermolekülen bestehen: Die Abgrenzung der markierenden von der Hintergrundstrahlung kann durch geringe Dichte der Zielstruktur im Gewebe, ungenügende Ausscheidung der ungebundenen Partikel oder unspezifische Bindung limitiert sein [Weissleder 2001a]. Eine elegante Methode, dieses Problem zu umgehen und eindeutig zwischen Ziel- und Hintergrundfluoreszenz differenzieren zu können, ist die Verwendung von aktivierbaren Proben. Dabei koppelt man den Fluorophor an einen Quencher und erhält so eine nicht fluoreszierende Vorstufe. Als Zielstrukturen dienen meist Proteasen wie Cathepsine, Matrix-Metalloproteasen, Thrombin oder Caspase-3. Diese spalten den Quencher an spezifischen Peptidsequenzen vom Fluorophor ab und ermöglichen auf diese Weise ein Fluoreszenzsignal bei minimaler Hintergrundstrahlung. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass ein einzelnes Zielenzym viele Markermoleküle spalten kann, was eine 10- bis 1.000-fache Signalverstärkung bewirkt [Weissleder 2001a; Kovar 2007]. Als Beispiel der praktischen Anwendung des Verfahrens kann die Arbeit von Bremer et al. aufgeführt werden, in der über die Bestimmung der Aktivität der Matrix-Metalloprotease-2 Tumorgewebe vom gesunden Gewebe abgegrenzt werden konnte [Bremer 2001].

Aber nicht nur die Art des Fluoreszenzfarbstoffs beeinflusst die Möglichkeiten der optischen Bildgebung, sondern auch die Methode der Messung selbst. Im Vergleich zu den bisher vorgestellten Verfahren bietet das Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) neue Ansätze für die Darstellung pathologischen Gewebes *in vivo* [Tadrous 2000]. Man macht sich hier zunutze, dass zu den spezifischen Eigenschaften von Fluorophoren neben Strahlungsintensität und Wellenlänge auch die Abklingzeit der Strahlung ausgehend vom Anregungszeitpunkt zählt. Diese ist zunächst eine definierte molekulare Konstante, die für ein gegebenes Fluorophor charakteristisch ist. Zusätzlich spielen aber auch intermolekulare Wechselwirkungen mit den umgebenden Molekülen eine wesentliche Rolle, was nicht zuletzt in der beschriebenen Versuchsreihe der Quantenpunkte sehr deutlich zum Ausdruck kommt. Deshalb kann die Lebensdauer der Fluoreszenzstrahlung, die im Gegensatz zur Intensität nicht von der lokalen Konzentration des Fluorophors abhängig ist, als Indikator für die molekulare Umgebung herangezogen werden [Szmacinski 1994]. Die Darstellung erreicht entsprechend des zur Verfügung stehenden Gerätes mikroskopische Genauigkeit und ist nur

durch die begrenzte Lichtdurchlässigkeit des Gewebes limitiert. Zudem kann die Verteilung der chemischen oder metabolischen Komponenten über einen längeren Zeitverlauf verfolgt werden. Neben extrinsischen Fluorophoren kann auch hier auf autofluoreszierende Bestandteile innerhalb der Zellen zurückgegriffen werden. Beispielsweise unterscheidet sich die Lebenszeit des freien von der des proteingebundenen NADH [Lackowicz 1992]. Da das freie NADH unter oxidativem Stress ansteigt, kann es als Marker dafür herangezogen werden [König 1996]. Auch gibt es bereits Ansätze, auf diese Weise zwischen benignem und malignem Gewebe unterscheiden zu können [Das 1997]. Zusätzlich besteht auch bei der optischen Bildgebung die Möglichkeit, sie mit anderen Verfahren wie CT oder MRT zu verknüpfen, um den Informationsgehalt weiter auszubauen [Bambot 1995; Sevick-Muraca 1998]. Insgesamt scheint das Verfahren der FLIM in mancherlei Hinsicht genauere Darstellungen zu liefern als der Vergleich von Einzelwerten. Dies bestätigt sich auch in den Daten der eigenen Messreihen: Bei Betrachtung des kontinuierlichen Verlaufs der Fluoreszenzstrahlung in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 26) kann zwischen unmarkiertem und Quantenpunkten enthaltendem Gewebe unterschieden werden. Deshalb wäre ein Ansatz für weiterführende Versuche, mit Hilfe von FLIM im direkten Vergleich mit entsprechenden Negativkontrollen eine Differenzierung und damit einen Nachweis auch der Quantenpunkte zu erreichen.

5. Zusammenfassung

In der medizinischen Forschung gibt es derzeit vielerlei Ansätze, die molekulare Bildgebung sinnvoll in der klinischen Praxis zum Einsatz zu bringen. Variiert werden sowohl die Verfahren der Bilderzeugung als auch die zu detektierenden Zielstrukturen. Die Positronen-Emissions-Tomographie beispielsweise hat den Sprung in die klinische Anwendung geschafft, so wie auch die Kernspinresonanz zunehmend nicht nur für morphologische, sondern auch für funktionelle Fragestellungen herangezogen wird. Auch die Bildgebung auf der Grundlage von Fluoreszenz bietet vielversprechende Möglichkeiten, deren Potential für die Krankenhausroutine längst noch nicht ausgeschöpft ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung fluoreszierender Nanopartikel und Quantenpunkte im Körper am Tiermodell der Ratte nachzuvollziehen. Die Partikel sollten im besten Fall so modifiziert werden, dass sie an Strukturen der Niere binden und so als Marker zur Darstellung der Nierenfunktion herangezogen werden könnten. Hierzu musste zunächst eine Methode zu deren fluorimetrischem Nachweis etabliert werden.

Im ersten Schritt wurden 200 µl der Nanopartikel über einen intravenösen Zugang durch die V. femoralis in den systemischen Kreislauf einer Ratte eingebracht. Nach 30 min bzw. 24 h wurden Nieren, Leber, Lunge, Milz, eine Blut- und eine Urinprobe entnommen. Die Homogenisierung der Organgewebe erfolgte nach einem Schema, das in mehreren Einzelversuchen erarbeitet worden war: In einem Puffer aus PBS und Harnstoff wurde das Gewebe mit dem rotierenden Messer zerkleinert und anschließend mit Triton X-100 vermischt. Nach einer ersten Zentrifugation wurde der Überstand mit SDS inkubiert. In einer anschließenden Dialyse sollte der Harnstoff möglichst vollständig aus den Proben entfernt werden. Eine erneute Zentrifugation entfernte weitere Gewebebestandteile, bevor durch Ultrazentrifugation die Nanopartikel ins Pellet abzentrifugiert und vom Gewebe getrennt werden konnten. Im Fluorimeter gab die Intensität der in Überstand und Pellet gemessenen Fluoreszenzstrahlung schließlich Auskunft über die Verteilung der Partikel im Organismus der Ratte. Die Anreicherung erfolgte in allen Fällen sehr deutlich in der Leber und teilweise auch im Lungengewebe. Dies wurde auf die Phagozytose vor allem durch Kupffer-Sternzellen zurückgeführt. An dieser Tendenz änderten auch unterschiedliche funktionelle chemische Endgruppen nichts, die zu verschiedenen Ladungen der Markermoleküle führten. Bestätigt

wurden die fluorimetrischen Ergebnisse durch fluoreszenzmikroskopische Bilder, in denen die Nanopartikel in den Sinusoiden der Leber zur Darstellung kommen.

Auf die verwendeten Quantenpunkte ließ sich das Nachweisverfahren in gleicher Form nicht anwenden, da diese sich als wesentlich störanfälliger erwiesen. Das erste Problem stellte die im Vergleich zu den Nanopartikeln wesentlich kürzere Lebensdauer der Fluoreszenzstrahlung dar, die eine Abgrenzung zur ebenfalls sehr kurzlebigen Hintergrundfluoreszenz erschwerte. Des Weiteren konnte eine erhebliche Unterdrückung des Fluoreszenzsignals durch SDS gezeigt werden, was bei bisheriger Vorgehensweise in der praktischen Durchführung einen Nachweis von Quantenpunkten in Gewebshomogenisat verhindern würde. Als Ausblick für weiterführende Versuche kann auf die Methode des Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) hingewiesen werden, die durch die zeitaufgelöste Messung im Vergleich zur Messung von Einzelwerten einen wesentlich höheren Informationsgehalt bietet. Es könnte somit bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzstrahlung auch eine Differenzierung zwischen markiertem und unmarkiertem Gewebe erreicht werden.

6. Literaturverzeichnis

Achilefu S., Bugaj J.E., Dorshow R.B., Jimenez H.N., Rajagopalan R. (2001). New approach to optical imaging of tumors. *Proc SPIE* 4259: 110-114

Achilefu S., Dorshow R.B., Bugaj J.E., Rajagopalan R. (2000). Novel receptor-targeted fluorescent contrast agents for in vivo tumor imaging. *Invest Radiol* 35: 479-485

Allport J.R., Weissleder R. (2001). In vivo imaging of gene and cell therapies. *Experimental Hematology* 29: 1237-1246

Alving C.R., Schneider I., Swartz G.M. jr., Steck E.A. (1979). Sporozoite-induced malaria: therapeutic effects of glycolipids in liposomes. *Science* 205: 1142-1144

Arturson P., Laakso T., Edman P. (1983). Acrylic microspheres in vivo IX: Blood elimination kinetics and organ distribution of microparticles with different surface characteristics. *J Pharm Sci* 72: 1415-1420

Atkins P.W., DePaula J. (2006). Physikalische Chemie. Wiley-VCH Weinheim, 4.Auflage

Baghaei H., Wong W.H., Uribe J. (2004). Principles of Positron Emission Tomography Imaging. In: Kim E.E., Lee M.C., Inoue T., Wong W.H. Clinical PET: Principles and Applications. Springer-Verlag New York, 1.Auflage

Baker K.J. (1966). Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green by plasma α -1 lipoproteins. *Proc Soc Exp Biol Med* 122: 957-963

Ballou B., Ernst L.A., Andreko S., Harper T., Fitzpatrick J.A., Waggoner A.S., Bruchez M.P. (2007). Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models. *Bioconjug Chem* 18: 398-396

Bambot S.B., Rao G., Romauld M., Carter G.M., Sipior J., Terpetchnig E., Lakowicz J.R. (1995). Sensing oxygen through skin using a diode laser and fluorescence lifetimes. *Biosens Bioelectron* 10: 643-652

Barbet J., Peltier P., Bardet S., Vuillez J.P., Bachelot I., Denet S., Olivier P., Leccia F., Corcuff B., Huglo D., Proye C., Rouvier E., Meyer P., Chatal J.F. (1998). Radioimmunodetection of medullary thyroid carcinoma using indium-111 bivalent hapten and anti-CEA x anti-DTPA-indium bispecific antibody. *J Nucl Med* 39: 1172-1178

Bauer K.H., Frömming K.H., Führer C., Lippolt B.C. (2006). Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. Mit einer Einführung in die Biopharmazie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* Stuttgart, 8.Auflage

Becker A., Hessenius C., Licha K., Ebert B., Sukowski U., Semmler W., Wiedenmann B., Grötzinger C. (2001). Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands. *Nat Biotechnol* 19: 327-331

Berry J.P., Arnoux B., Stanislas G., Galle P., Chretien J. (1977). A microanalytic study of particles transport across the alveoli: role of blood platelets. *Biomedicine* 27: 354-357

Bogdanov A.A. Jr., Martin C., Bogdanova A.V., Brady T.J., Weissleder R. (1996). An adduct of cis-diamminedichloroplatinum(II) and poly(ethylene glycol)poly(L-lysine)-succinate: synthesis and cytotoxic properties. *Bioconjug Chem* 7: 144-149

Bogdanov A.A. Jr., Weissleder R., Frank H.W., Bogdanova A.V., Nossif N., Schaffer B.K., Tsai E., Papisov M.I., Brady T.J. (1993). A new macromolecule as a contrast agent for MR angiography: preparation, properties, and animal studies. *Radiology* 197: 701-706

Bowic L.J., Irwin R., Loken M., DeLuca M., Brand L. (1973). Excited-state proton transfer and the mechanism of action of firefly luciferase. *Biochem* 12: 1852-1857

Bradfield J.W. (1980). A new look at reticuloendothelial blockade. *Br J Exp Pathol* 61: 617-623

Bremer C., Bredow S., Mahmood U., Weissleder R., Tung C.H. (2001). Optical Imaging of Matrix Metalloproteinase-2 Activity in Tumors: Feasibility Study in a Mouse Model. *Radiology* 221: 523-529

Brown D.M., Wilson M.R., MacNee W., Stone V., Donaldson K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 175: 191-199

Bücheler E., Lackner K.J., Thelen M. (2006). Einführung in die Radiologie: Diagnostik und Intervention. *Georg Thieme Verlag* Stuttgart-New York, 11.Auflage

Buchenska J. (1997). Modified polyacrylonitrile (PAN) fibers. *J Appl Polym Sci* 65: 1955-1966

Cherrick G.R., Stein S.W., Leevy C.M., Davidson C.S. (1960). Indocyanine green: observations of its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest* 39: 592-600

Choi H.S., Liu W., Misra P., Tanaka E., Zimmer J.P., Ipe B.I., Bawendi M.G., Frangioni J.V. (2007). Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* 25: 1165-1170

Correia J.A., Burnham C.A., Kaufman D., Fischman A.J. (1999). Development of a small animal PET imaging device with resolution approaching 1 mm. *IEEE Trans Nucl Sci* 46: 631-635

Correia J.A., Burnham C.A., Kaufman D., Fischman A.J. (2000). Performance of a small animal PET instrument with 1 mm resolution (abstr). In: Proceedings of the 1999 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference. Piscataway, NJ. *IEEE* 125-129

- Couvreur P., Kante B., Lenaerts V., Scailteur V., Roland M., Speiser P. (1980).** Tissue distribution of antitumor drugs associated with polyaldehylcyanocrylate nanoparticles. *J Pharm Sci* 69: 199-202
- Cui D., Tian F., Ozkan C.S., Wang M., Gao H. (2005).** Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett* 155: 73-85
- Das B.B., Liu F., Alfano R. (1997).** Time-resolved fluorescence and photon migration studies in biomedical and model random media. *Rep Prog Phys* 60: 227-292
- Diamanidis E.P., Christopoulos T.K. (1990).** Europium chelate labels in time-resolved fluorescence immunoassays and DNA hybridization assays. *Anal Chem* 62: 1149A-1157A
- Early P.J., Sodee D.B. (1995).** Principles and Practice of Nuclear Medicine. *Mosby* St. Louis, 2.Auflage
- Eerikainen H., Watanabe W., Kauppinen E.I., Ahonen P.P. (2003).** Aerosol flow reactor method for synthesis of drug nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 55: 357-360
- Ehlers E. (2002).** Analytik II, Kurzlehrbuch: Quantitative und instrumentelle pharmazeutische Analytik. *Deutscher Apotheker Verlag* Stuttgart, 10.Auflage
- Fahrner W. (2003).** Nanotechnologie und Nanoprozesse: Einführung, Bewertung. *Springer* Berlin, 1.Auflage
- Fowler J.S., Wolf A.P. (1986).** Positron emitter-labeled compounds: priorities and problems. In: Phelps M., Mazziotta J., Schelbert H., eds. *Positron Emission Tomography and Autoradiography: Principles and Applications for the Brain and Heart*. *Raven Press* New York 391-450
- Frangioni J.V. (2003).** In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opinion Chem* 7: 626-634

Fujiita et al. (1981). SEM Atlas of Cells and Tissues. *Igaku-Shoin* Tokyo-New York, 1.Auflage

Funk E. (2004). NMR als bildgebendes Verfahren (Tomographie). *Vortrag: Physikalische Chemie der Universität Bayreuth*

Glunde K., Pathak A.P., Bhujwalla Z.M. (2007). Molecular-functional imaging of cancer: to image and imagine. *Trends Mol Med* 13: 287-297

Goldsmith S.J. (1997). Receptor imaging: competitive or complementary to antibody imaging? *Semin Nucl Med* 27: 85-93

Goodwin D.A., Meares C.F., McCall M.J., McTigue M., Chaovapong W. (1988). Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. *J Nucl Med* 29: 226-234

Guo X.Q., Castellano F.N., Li L., Lakowicz J.R. (1998). Use of a long-lifetime Re(I) complex in fluorescence polarization immunoassays of high-molecular-weight analytes. *Anal Chem* 70: 632-637

Guo X.Q., Castellano F.N., Li L., Szmacinski H., Lakowicz J.R., Sipior J. (1997). A long-lived, highly luminescent Re(I) metal-ligand complex as a biomolecular probe. *Anal Biochem* 254: 179-186

Greer L.F. 3rd, Szalay A.A. (2002). Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 17: 43-74

Gregoriadis G., Allison A.C. (1980). Liposomes in Biological Systems. *Wiley* New York, 1.Auflage

Gurfinkel M., Ke S., Wen X., Li C., Sevick-Muraca E.M. (2004). Near-infrared fluorescence optical imaging and tomography. *Disease Markers* 19: 107-121

- Hamstra D.A., Bhojani M.S., Griffin L.B., Laxman B., Ross B.D., Rehemtulla A. (2006).** Real-time Evaluation of p53 Oscillatory Behaviour In vivo Using Bioluminescent Imaging. *Cancer Res* 66: 7482-7489
- Hardman R.A. (2006).** A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physico-chemical and environmental factors. *Environ Health Perspect* 114: 165-172
- Harisinghani M., Ross R.W., Guimaraes A.R., Weissleder R. (2007).** Utility of a new bolus-injectable nanoparticle for clinical cancer staging. *Neoplasia* 9: 1160-1165
- Hawrysz D.J., Sevick-Muraca E.M. (2000).** Developments toward diagnostic breast cancer imaging using near-infrared optical measurements and fluorescent contrast agents. *Neoplasia* 2: 388-417
- Herzog H. (2006).** Methods and applications of positron-based medical imaging. *Radiation Physics and Chemistry* 76: 337-342
- Hope-Ross M., Yannuzzi L.A., Gragoudas E.S., Guyer D.R., Slakter J.S., Sorenson J.A., Krupsky S., Orlock D.A., Puliafito C.A. (1994).** Adverse reactions due to indocyanine green. *Ophthalmology* 101: 529-533
- Houston J.P., Ke S., Wang W., Li C., Sevick-Muraca E.M. (2005).** Quality analysis of in vivo near-infrared fluorescence and conventional gamma images acquired using a dual-labeled tumor-targeting probe. *J Biomed Optics* 10: 045020-054010
- Hu S., Shively L., Raubitschek A., Sherman M., Williams L.E., Wong J.Y., Shively J.E., Wu A.M. (1996).** Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res* 56: 3055-3061
- Huang M., Wu W., Qian J., Wan D.J., Wei X.L., Zhu J.H. (2005).** Body distribution and in situ evading of phagocytic uptake by macrophages of long-circulating poly(ethylene

glycol) cyanoacrylate-co-n-hexadecyl cyanoacrylate nanoparticles. *Acta Pharmacologica Sinica* 26: 1512-1518

Illum L., Davis S.S. (1982). The targeting of drugs parenterally by use of microspheres. *J Parent Sci Tech* 36: 242-248

Illum L., Davis S.S. (1984). The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338). *FEBS Lett* 167: 79-82

Jain R.K. (1994). Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci Am* 271: 58-65

Juliano R.L. (1980). Drug Delivery Systems. Characteristics and Biomedical Applications. *Oxford University Press* New York, 1.Auflage

Junqueira L.C.U., Carneiro J., Gratzl M. (2005). Histologie. *Springer Medizin Verlag* Heidelberg, 6.Auflage

Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O. (1998). Basic Histology. *Appleton & Lange* Stamford, Connecticut, 9.Auflage

Juris A., Balzani V., Barigelli F., Campagna S., Belser P., Zelewsky A. v. (1988). Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence. *Coord Chem Rev* 84: 85-277

Kawahara K., Tanford C. (1966). Viscosity and density of aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride. *J Biol Chem* 241: 3228-3232

Kelloff G.J., Krohn K.A., Larson S.M., Weissleder R., Mankoff D.A., Hoffman J.M., Link J.M., Guyton K.Z., Eckelman W.C., Scher H.I., O'Shaughnessy J., Cheson B.D., Sigman C.C., Tatum J.L., Mills G.Q., Sullivan D.C., Woodcock J. (2005). The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development. *Clin Cancer Res* 11: 7967-7958

DeKeyser J.L., Poupaert J.H., Dumont P. (1990). Poly(diethyl methylenemalonate) Nanoparticles as a Potential Drug Carrier: Preparation, Distribution and Elimination after Intravenous and Peroral Administration to Mice. *J Pharm Sci* 80: 67-70

Kittel C. (1999). Einführung in die Festkörperphysik. *Oldenbourg* München, Wien, 12.Auflage

König K., So P.T.C., Mantulin W.W., Tromberg B.J., Gratton E. (1996). Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress. *J Microsc* 183: 197-204

Korte S. (1999). Physical constants of poly(acrylonitrile). In: Brandrup J., Immergut E.H., Grulke E.A., eds. *Polymer Handbook*. *John Wiley & Sons, Inc* New York V59-V66

Kovar J.L., Simpson M.A., Schutz-Geschwender A., Olive D.M. (2007). A systematic approach to the development of fluorescent contrast agents for optical imaging of mouse cancer models. *Anal Biochem* 367: 1-12

Kürner J.M., Klimant I., Krause C., Preu H., Kunz W., Wolfbeis O.S. (2001). Inert Phosphorescent Nanospheres as Markers for Optical Assays. *Bioconjugate Chem* 12: 883-889

Lackowicz J.R., Szmacinski H., Nowaczyk K., Berndt K.W., Johnson M. (1992). Fluorescence lifetime imaging. *Anal Biochem* 202: 316-330

Lewin M., Carlesso N., Tung C.H., Tang X.W., Cory D., Scadden D.T., Weissleder R. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* 18: 410-414

Li Y.P., Pei Y.Y., Zhang X.Y., Gu Z.H., Zhou Z.H., Yuan W.F., Zhou J., Zhu J., Gao X. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release* 71: 203-211

Licha K. (2002). Contrast agents for optical imaging. *Topics Curr Chem* 222: 1-29

DeLuca M., McElroy W.D. (1978). Purification and properties of firefly luciferase. In: DeLuca M., ed. *Methods in Enzymology*, Vol LVII. *Academic Press* New York

Lüllmann-Rauch R. (2003). Histologie: Verstehen, Lernen, Nachschlagen. *Georg Thieme Verlag* Stuttgart-New York, 1.Auflage

Makino K., Yamamoto N., Higuchi K., Harada N., Ohshima H., Terada H. (2003). Phagocytic uptake of polystyrene microspheres by alveolar macrophages: effects of the size and surface properties of the microspheres. *Colloid Surf B* 27: 33-39

Martienssen W., Warlimont H. (2005). Springer Handbook of Condensed Matter and Materials Data. *Springer* Berlin, Heidelberg, 1.Auflage

Medina C., Santos-Martinez M.J., Radomski A., Corrigan O.I., Radomski M.W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol* 150: 552-558

Miyashiro I., Miyoshi N., Hiratsuka M., Kishi K., Yamada T., Ohue M., Ohigashi H., Yano M., Ishikawa O., Imaoka S. (2008). Detection of Sentinel Node in Gastric Cancer Surgery by Indocyanine Green Fluorescence Imaging: Comparison with Infrared Imaging. *Ann Surg Oncol* [Epub ahead of print]

Moghimi S.M. (1995). Mechanisms regulating body distribution of nanospheres conditioned with pluronic and tetronic block copolymers. *Adv Drug Del Rev* 16: 183-193

Moghimi S.M., Hunter A.C. (2000). Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol* 18: 412-420

Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53: 283-318

Moghimi S.M., Szebeni J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 42: 463-478

Muldoon L.L., Nilaver G., Kroll R.A., Pagel M.A., Breakefield X.O., Chiocca E.A., Davidson B.L., Weissleder R., Neuwelt E.A. (1995). Comparison of intracerebral inoculation and osmotic blood-brain barrier disruption for delivery of adenovirus, herpesvirus, and iron oxide particles to normal rat brain. *Am J Pathol* 147: 1840-1851

Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622-627

Nemmar A., Hoet P.H.M., Vanquickenborne B., Dinsdale D., Thomeer M., Hoylaerts M.F., Vanbilloen H., Mortelmans L., Nemery B. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105: 411-414

Neradovic D., Soga O., Nostrum C.F.V., Hennink W.E. (2004). The effect of the processing and formulation parameters on the size of nanoparticles based on block copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide) with and without hydrolytically sensitive groups. *Biomaterials* 25: 2409-2418

Neuwelt E.A., Weissleder R., Nilaver G., Kroll R.A., Roman-Goldstein S., Szumowski J., Pagel M.A., Jones R.S., Remsen L.G., McCormick C.I. et al. (1994). Delivery of virus-sized iron oxide particles to rodent CNS neurons. *Neurosurgery* 34: 777-784

Paulus M.J., Gleason S.S., Kennel S.J., Hunsicker P.R., Johnson D.K. (2000). High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia* 2: 62-70

Peracchia M.T., Fattal E., Desmaele D., Besnard M., Noel J.P., Gomis M.J., Appel M., d'Angelo J., Couvreur P. (1999). Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release* 60: 121-128

Phelps M.E., Hoffman E.J., Mullani N.A., Ter-Pogossian M.M. (1975). Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. *J Nucl Med* 16: 210-224

Priestly B.G., Harford A.J., Sim M.R. (2007). Nanotechnology: a promising new technology – but how save? *MJA* 186: 187-188

Proffitt R.T., Williams L.E., Presant C.A., Tin G.W., Uliana J.A., Gamble R.C., Baldeschwieler J.D. (1983). Liposomal blockade of the reticuloendothelial system: improved tumor imaging with small unilamellar vesicles. *Science* 220: 502-505

Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escalon D., Drews M., Morandi M., Malinski T., Radomski M.W. (2005). Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol* 146: 882-893

Rakicioglu Y., Perrin J.H., Schulman S.G. (1999). Increased luminescence of the tetracycline-europium (III) system following oxidation by hydrogen peroxide. *J Pharm Biomed Anal* 20: 397-399

Rolland A., Collet B., LeVerge R., Toujas L. (1988). Blood Clearance and Organ Distribution of Intravenously Administered Polymethacrylic Nanoparticles in Mice. *J Pharm Sci* 78: 481-484

Schafbauer H., Knauth H., Kühnel S. (1999). Einführung in die Halbleiterphysik. In: Physik 10, Addita. *Oldenbourg Schulbuchverlag* München, 1.Auflage

Schiebler T.H. (2005). Anatomie. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. *Springer Medizin Verlag* Heidelberg, 9.Auflage

Schins R.P.F., McAlinden A., MacNee W., Jimenez L.A., Ross J.A., Guy K., Faux S.P., Donaldson K. (2000). Persistent depletion of I kappa B alpha and interleukin-8 expression in human pulmonary epithelial cells exposed to quartz particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 167: 107-117

Schwedt G. (1981). Fluorimetrische Analyse. *Verlag Chemie* Weinheim, 1.Auflage

Sevick-Muraca E.M., Reynolds J.S., Troy T.L., Lopez G., Paithankar D.Y. (1998).

Fluorescence lifetime spectroscopic imaging with measurements of photon migration. *Ann N Y Acad Sci* 838: 46-57

Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from

Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22: 1567-1572

Shimomura O. (2006). Discovery of green fluorescent protein. *Methods Biochem Anal* 47: 1-

13

Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239

Sinha S.P. (1982). Fluorescence spectra and lifetimes of the lanthanide aquo ions and their complexes. In: Sinha S.P., ed. *Systematics and the Properties of the Lanthanides*. *Kluwer Academic Publishers* Dordrecht, Niederlande 451-500

Szmacinski H., Lakowicz J.R., Johnson M.J. (1994). Fluorescence lifetime imaging microscopy: homodyne technique using high-speed gated image intensifier. *Methods Enzymol* 249: 723-748

Szmacinski H., Terpetschnig E., Lakowicz J.R. (1996). Synthesis and evaluation of Ru-complexes as anisotropy probes for protein hydrodynamics and immunoassays of high-molecular-weight antigens. *Biophys Chem* 62: 109-120

Tadrous P.J. (2000). Methods for imaging the structure and function of living tissues and cells: 2. Fluorescence lifetime imaging. *J Pathol* 191: 229-234

Ter-Pogossian M.M. (1995). Positron Emission Tomography (PET): General Principles. In: Wagner H.N., Szabo Z., Buchanan J.W. *Principles of Nuclear Medicine W. B. Saunders Company* Philadelphia-London-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo, 2.Auflage

Ter-Pogossian M.M., Phelps M.E., Hoffman E.J. (1975). A positron-emission transaxial tomograph for nuclear medicine imaging (PETT). *Radiology* 114: 89-98

Tromberg B.J., Shah N., Lanning R., Cerussi A., Espinoza J., Pham T., Svaasand L., Butler J. (2000). Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia* 2: 26-40

Tschirley R. (1996). Bildgebende Verfahren in der Medizin. Seminar: *Computer Assisted Radiology der TU Berlin*

Voigt R., Fahr A. (2005). Pharmazeutische Technologie. Für Studium und Beruf. *Deutscher Apotheker Verlag* Stuttgart, 10.Auflage

Weinstein J.N. (1981). Liposomes als „targeted“ drug carriers: a physical chemical perspective. *Pure Appl Chem* 53: 2241-2254

Weissleder R. (2001a). A clearer vision for in vivo imaging: Progress continues in the development of smaller, more penetrable probes for biological imaging. *Nat Biotechnol* 19: 316-317

Weissleder R., Mahmood U. (2001b). Molecular Imaging. *Radiology* 219: 316-333

Weissleder R., Moore A., Mahmood U., Bhorade R., Benveniste H., Chiocca E.A., Basilion J.P. (2000). In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med* 6: 351-355

Weissleder R., Tung C.H., Mahmood U., Bogdanov A. Jr. (1999). In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol* 17: 375-378

Welsch U. (2003). Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie. *Urban & Fischer Verlag* München-Jena, 1.Auflage

Weng J., Ren J. (2006). Luminescent quantum dots: a very attractive and promising tool in biomedicine. *Curr Med Chem* 13: 897-909

Wilkins D.J., Myers P.A. (1966). Studies on the relationship between the electrophoretic properties of colloids and their blood clearance and organ distribution in the rat. *Br J Exp Pathol* 47: 568-576

Xiankai S., Rossin R., Turner J.L., Becker M.L., Joralemon M.J., Welch M.J., Wooley K.L. (2005). An Assessment of the Effects of Shell Cross-Linked Nanoparticle Size, Core Composition, and Surface PEGylation on in Vivo Biodistribution. *Biomacromolecules* 6: 2541-2554

Yamawaki H., Iwai N. (2006). Mechanisms underlying nano-sized air-pollution-mediated progression of atherosclerosis: carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cells. *Circ J* 70: 129-140

Yang M., Baranov E., Jiang P., Sun F.X., Li X.M., Li L., Hasegawa S., Bouvet M., Al-Tuwaijri M., Chishima T., Shimada H., Moossa A.R., Penman S., Hoffman R.M. (2000a). Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1206-1211

Yang M., Baranov E., Moossa A.R., Penman S., Hoffman R.M. (2000b). Visualizing gene expression by whole-body fluorescence imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12278-12282

Yang M., Baranov E., Li X.M., Wang J.W., Jiang P., Li L., Moossa A.R., Penman S., Hoffman R.M. (2001). Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2616-2621

Yeh T., Zhang W., Ildstad S., Ho C. (1995). In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles. *Magn Reson Med* 33: 200-208

Zhao M., Yang M., Baranov E., Wang X., Penman S., Moossa A.R., Hoffman R.M. (2001). Spatial-temporal imaging of bacterial infection and antibiotic response in intact animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9814-9818

7. **Anhang**

7.1 **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

7.2 Lebenslauf

Name:	Mirjam Ingeborg Englert
Geburtsdatum:	08. September 1983
Geburtsort:	Eggenfelden
Familienstand:	ledig
Eltern:	Theodor Englert und Ingeborg Englert, geb. Kießling
1990 – 1994	Grundschule Eggenfelden
1994 – 2003	Karl-von-Closen-Gymnasium Eggenfelden, Abitur
ab Herbst 2003	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, Vorklinik
Herbst 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 – 2008	Klinischer Studienabschnitt
2008 / 2009	Praktisches Jahr, Wahlfach Anästhesiologie
Famulaturen:	<ul style="list-style-type: none">- Innere Medizin, Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg- Allgemeinmedizin, Clínica Sto. Domingo de Heredia, Costa Rica- Radiologie und Nuklearmedizin, Praxis Dres. Cidlinsky, Fiedler und Nömayr, Eggenfelden- Neurologie, Bezirksklinikum der Universität Regensburg- Dermatologie, Klinikum der Universität Regensburg
Praktisches Jahr:	<ul style="list-style-type: none">- Chirurgia generale e Trapianti d'Organo, Policlinico A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rom- Unfallchirurgie, Klinikum der Universität Regensburg- Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Klinikum St. Marien Amberg, Lehrkrankenhaus der Universität Regensburg- Innere Medizin, Klinikum St. Marien Amberg, Lehrkrankenhaus der Universität Regensburg
Herbst 2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin

7.3 Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall für die Bereitstellung des Themas sowie die hervorragende Betreuung und Beratung während der Durchführung der Experimente und der Anfertigung der Arbeit.

Herrn PD Dr. Jörg Marienhagen danke ich für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei Stefan Nagl für die Bereitstellung der fluoreszierenden Nanopartikel, die Hilfe bei den fluorimetrischen Messungen sowie für die Zeit, die er sich immer genommen hat, um meine Fragen zu klären.

Ebenso herzlicher Dank gilt Dr. Miriam Breunig und Wolfgang Hild, die mir die Quantenpunkte zur Verfügung gestellt und mich im Umgang mit dem Fluorimeter unterstützt haben. Ihre Erklärungen und Ratschläge waren mir eine wertvolle Hilfe.

Bei Viktoria Skude aus Heidelberg möchte ich mich nicht nur dafür bedanken, dass sie mir die Technik zur Katheterisierung von Ratten beigebracht hat, sondern auch dafür, dass sie mich den artgerechten Umgang mit den Tieren gelehrt hat.

Ganz besonders danke ich Larissa Osten, die mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Большое спасибо! Bei Uwe de Vries bedanke ich mich für die Einführung in den Umgang mit dem Fluoreszenzmikroskop und in die weiterführende digitale Datenbearbeitung. Auch alle anderen Kollegen im Labor waren mir durch die stete Hilfsbereitschaft und die vielen freundschaftlichen Gespräche eine große Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meinem Freund Hans dafür, dass sie nicht müde wurden, sich alle Einzelheiten zum Stand der Arbeit anzuhören. Ihre stete Motivation und die vielen guten Ratschläge nicht nur dann, wenn ich vor dem Computer zu kapitulieren drohte, haben mich immer wieder aufgebaut.