

1 Einleitung

Die Entwicklung und Einführung der Chemotherapie zur Behandlung von Krebserkrankungen ab der Mitte des 20. Jahrhunderts markiert einen bedeutenden Meilenstein der modernen Medizin.^[1,2] Chemotherapien haben das Potenzial, Krebserkrankungen zu heilen und Lebenszeiten zu verlängern, allerdings wird deren Anwendbarkeit häufig durch schwere Nebenwirkungen oder Resistenzen begrenzt.^[3–5] Um die Behandlungseffektivität zu erhöhen, wird zunehmend auf die Kombination verschiedener Behandlungsansätze mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen gesetzt, wie z. B. die Kombination verschiedener Chemotherapeutika in einer Polychemotherapie.^[6,7] Hierbei auftretende synergetische, also sich verstärkende, Effekte, tragen zu einer signifikanten Verbesserung der Wirksamkeit bei, stellen aufgrund der aggressiven Natur einer solchen Therapie jedoch auch eine große Belastung für den Körper dar.^[8,9] Im Zuge der Mono- sowie Polychemotherapie werden Wirkstoffe in der Regel in Form von Lösungen der entsprechenden Wirkstoffe verabreicht.^[10] Aufgrund der mangelnden Fähigkeit dieser Wirkstoffe, zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe zu unterscheiden, erfolgt eine unkontrollierte und unspezifische Verteilung im gesamten Körper, welche eine Schädigung gesunder Zellen und somit starke Nebenwirkungen zur Folge hat. Dies führt dazu, dass Polychemotherapien trotz gesteigerter Wirksamkeit oftmals nicht eingesetzt werden können.^[3–5]

Als vielversprechende Strategie, um die Selektivität der Chemotherapie zu verbessern, rücken nanopartikuläre Transportsysteme in den Fokus der Forschung.^[11–13] Derartige Systeme erlauben einerseits den Schutz der Wirkstoffe vor zu frühem, metabolischem Abbau und ermöglichen andererseits ein gezielteres Ansteuern von Tumorzellen.^[14–16] Etwa 90 % der derzeit entwickelten Wirkstoffe sind lipophil und können aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit und der damit verbundenen schlechten Bioverfügbarkeit besonders von einer Verkapselung in Nanopartikeln profitieren.^[17,18] Die Unabhängigkeit einer Zellaufnahme von Zelltransportproteinen und Wirkstoffaktivierungsenzymen ermöglicht Nanopartikeln weiterhin die Umgehung typischer Resistenzmechanismen.^[19] Bislang bekannte Nanopartikel-systeme konzentrieren sich überwiegend auf den Transport einzelner Wirkstoffe,

weisen lediglich geringe Wirkstoffbeladungen auf und sind für den Transport chemisch stark differenter Wirkstoffe nicht geeignet.^[20,21] Die Integration mehrerer Wirkstoffe in einem Nanopartikel hat hingegen das Potenzial, die Effektivität und Einsetzbarkeit der Polychemotherapie durch den gezielteren Transport und die daraus resultierenden geringeren Nebenwirkungen erheblich zu verbessern. Der Einsatz nanopartikulärer Transportsysteme ermöglicht weiterhin die gleichzeitige Freisetzung und Aktivität der Wirkstoffe im Zielgewebe, was in einer herkömmlichen Polychemotherapie mit gelösten Wirkstoffen aufgrund verschiedener chemischer Eigenschaften und daraus resultierender, unterschiedlicher Biodistribution nicht garantiert werden kann.^[22] Die Integration zweier Wirkstoffen in einem Nanopartikel stellt allerdings eine synthetische Herausforderung dar, insbesondere für die Kombination lipophiler und hydrophiler Wirkstoffe.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, vielversprechende Kombinationen lipophiler und hydrophiler Wirkstoffe erstmals in Nanopartikeln bei bisher unerreichtem Wirkstoffgehalt zu verkapseln. Diese Systeme sollen durch eine wässrige Synthese zugänglich, kolloidal stabil und durch entsprechende Partikelgrößen (20 bis 80 nm) für eine Aufnahme in Tumorgewebe geeignet sein. Durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen der verkapselten Stoffe sollen die Nanopartikelsysteme in einer Kombinationstherapie durch Verbindung verschiedener Therapieansätze die Effektivität verbessern sowie Nebenwirkungen reduzieren und damit das Potenzial haben, in medizinisch relevanten Indikationen mit hohem medizinischem Bedarf, wie Darmkrebs oder Brustkrebs, eingesetzt zu werden. Die Auswahl geeigneter Wirkstoffkombinationen soll dabei in enger Kooperation mit Experten aus der Onkologie und verwandten Bereichen erfolgen, um frühzeitig den Grundstein für eine spätere potenzielle Anwendung zu legen.

2 Analytische Methoden

2.1 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie ist eine bildgebende Methode, welche Objekte mit Hilfe von Elektronen vergrößert abbildet. Wie ABBE beschrieb, hängt die Auflösungsgrenze, also der Abstand bis zu welchem zwei Punkte noch getrennt wahrnehmbar sind, von der Wellenlänge des Lichts ab.^[23]

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha} \quad (2-1)$$

d	Auflösungsgrenze
λ	Wellenlänge
n	Brechungsindex
α	halber Öffnungswinkel

Gegenüber herkömmlichen Lichtmikroskopen, mit maximaler Auflösung von bis zu $d = 0,2 \mu\text{m}$, wird das Auflösungsvermögen bei Elektronenmikroskopen durch den Einsatz von beschleunigten Elektronen erhöht. Entsprechend dem Welle-Teilchen-Dualismus können Elektronen als Wellen betrachtet werden, deren Wellenlänge nach DE BROGLIE reziprok zum Impuls ist. Somit kann eine hohe Beschleunigung von Elektronen deren Wellenlänge verringern und folglich die Auflösung erhöhen.^[24]

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m \cdot v} = \frac{h}{\sqrt{2 \cdot m \cdot e \cdot U}} \quad (2-2)$$

λ	Wellenlänge
h	PLANCK'sches Wirkungsquant
p	Impuls
m	Masse
v	Geschwindigkeit
e	Elementarladung
U	Beschleunigungsspannung

Unter Verwendung von Beschleunigungsspannungen mehrerer hundert Kilovolt und unter Berücksichtigung relativistischer Effekte sind heutzutage Wellenlängen von wenigen Ångström realisierbar.^[25] Die Auflösung ist dabei nicht mehr durch die Auflösungsgrenze, sondern von apparativen Gegebenheiten wie

Linienfehlern und energetischen Schwankungen begrenzt.^[26] Ein Elektronenmikroskop besteht aus einer Elektronenquelle, Linsensystemen und einem Probenträger. Als Elektronenquelle dient üblicherweise eine Feldemissionskathode, die aus Wolfram besteht und zur Reduktion der Austrittsarbeit mit ZrO_2 beschichtet ist. An der Kathode wird eine hinreichend große Extraktorspannung angelegt, wodurch Elektronen aus der Spitze austreten und anschließend in Richtung Anode beschleunigt werden. Mithilfe elektromagnetischer Linsen werden die Elektronen je nach Messmethode zu einem konvergenten oder parallelen Elektronenstrahl gebündelt und fokussiert (Abbildung 2-1). Dabei wird sich die LORENTZ-Kraft zu Nutze gemacht, die durch das Anlegen eines elektromagnetischen Feldes eine Richtungsänderung herbeiführt und in einer Ablenkung der Elektronen resultiert.^[27]

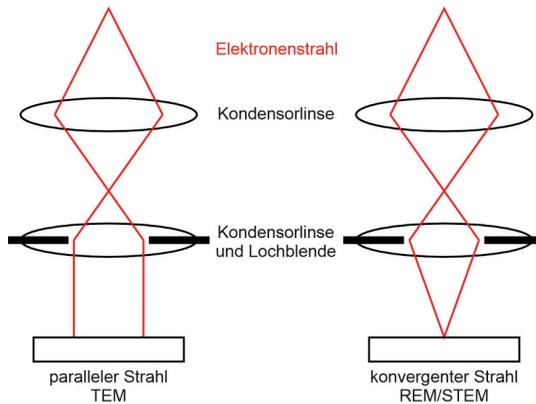


Abbildung 2-1: Fokussierung des Elektronenstrahls zu einem parallelen Strahl im TEM und einem konvergenten Strahl im REM/STEM. Modifiziert nach ^[28].

Ein Hochvakuum verhindert die Kollision von Elektronen mit Gasmolekülen sowie deren Adsorption an der Kathode. Beim Auftreffen des Primärstrahls auf die Probe finden verschiedene Wechselwirkungen innerhalb der sogenannten Anregungsbirne statt (Abbildung 2-2). Rückstreu- und Sekundärelektronen entstehen durch Streuung und werden zur Bildgebung genutzt. Die Entstehung von charakteristischer Röntgenstrahlung wird zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Probenzusammensetzung genutzt. Transmittierte Elektronen entstehen durch Beugung und liefern Informationen über die Dicke einer Probe.^[29]

Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird der Elektronenstrahl mittels magnetischer Spulen zeilenweise in x - und y -Richtung über die Probenoberfläche bewegt. Die Bildgebung erfolgt durch die Detektion von Sekundär- und Rückstreuerelektronen, wobei die einzelnen Rasterpunkte zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden. Sekundärelektronen entstehen durch inelastische Streuung zwischen Primärstrahl und Probe und haben geringere Energien als rückgestreute und einfallende Elektronen, weshalb sie gut von diesen zu unterscheiden sind. Zudem können lediglich oberflächennahe Sekundärelektronen die Austrittsarbeit überwinden um die Probe zu verlassen, weshalb erzeugte Bilder einen hohen topographischen Kontrast aufweisen.

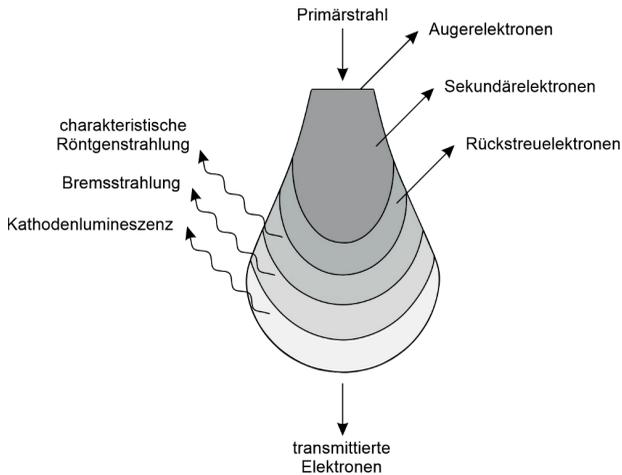


Abbildung 2-2: Mögliche Wechselwirkungen des Primärelektronenstrahls mit der Probe innerhalb der Anregungsbirne. Modifiziert nach ^[29].

Des Weiteren werden an Ecken und Kanten mehr Sekundärelektronen emittiert als an planaren Oberflächen, was als „Kanteneffekt“ bezeichnet wird. Dieser führt zu einer Verstärkung der Oberflächenkontraste in der Bildgebung. Sekundärelektronen erster Ordnung (SE1) entstehen durch Wechselwirkung des Primärstrahls mit der Probe, während Sekundärelektronen zweiter Ordnung (SE2) durch Wechselwirkung zwischen Probe und Rückstreuerelektronen erzeugt werden.^[30] Ein In-Lens-Detektor, positioniert im Strahlengang des Geräts, detektiert aufgrund seiner

Position und hohen Ansaugspannung selektiv SE1-Elektronen. SE2-Elektronen werden an einem EVERHART-THORNLEY-Detektor detektiert, der sich in einem großen Winkel zur Streurichtung befindet. Dieser dient ebenfalls zur Detektion von Rückstreuелеktronen, die aus tieferen Bereichen der Probe stammen. Mit zunehmender Ordnungszahl nimmt die Rückstreuung der Probe zu, woraus ein hoher Materialkontrast in der Bildgebung resultiert.^[26,29]

In dieser Arbeit durchgeführte REM-Messungen erfolgten an einem Supra 40 VP der Firma ZEISS (Oberkochen, Deutschland) mit einer Feldemissionskathode aus Wolfram und ZrO₂ mit Beschleunigungsspannungen von 2 bis 5 kV in einem Arbeitsabstand von 3 mm. Untersuchte Proben wurden als verdünnte Suspensionen auf einen Siliziumwafer aufgetragen, welcher mit Leitsilber auf einem Aluminiumträger befestigt wurde. Partikelanzählungen erfolgte mit dem Programm IMAGEJ (Version 1.48, WAYNE RASBAND) an ≥ 100 Partikeln.

Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wird ähnlich wie im Lichtmikroskop transmittierte Strahlung zur Bilderzeugung genutzt. Der parallele Primärstrahl kann die Probe entweder ungehindert durchdringen oder mit ihr wechselwirken. Elastische Stöße mit Atomkernen sowie inelastische Stöße mit gebundenen Elektronen führen zur Streuung des Elektronenstrahls. Die Stärke der Streuung ist dabei abhängig von den Ordnungszahlen der Probenelemente. Um vollständige Streuung oder Absorption zu verhindern, muss die Probendicke hinreichend gering sein (< 100 nm).^[31] Die Detektion der Elektronen erfolgt unterhalb des Probenträgers. In der Probenabbildung wird zwischen Hellfeld und Dunkelfeld unterschieden.^[32] In der Hellfeld-Abbildung werden elastisch gestreute Elektronen herausgefiltert und transmittierte Elektronen detektiert, wodurch Bereiche mit geringer Probendicke und Atome mit niedriger Ordnungszahl heller erscheinen. Der Kontrast ist in der Dunkelfeld-Abbildung umgekehrt, da hier gestreute Elektronen detektiert werden.^[33] HAADF-Detektoren (*engl. High Angle Annular Dark Field*) erlauben die Detektion von unter großem Winkel an Atomkernen gestreute Elektronen und liefern einen guten Materialkontrast. In der Transmissionselektronenmikroskopie werden im Vergleich zur Rasterelektronenmikroskopie höhere

Beschleunigungsspannungen eingesetzt, die eine bessere Auflösungsgrenze bis hin zu atomaren Auflösungen ermöglichen. Die Rastertransmissionselektronenmikroskopie (STEM, *engl. Scanning Transmission Electron Microscopy*) kombiniert TEM (< 400 kV) und REM (< 30 kV) indem der Elektronenstrahl rasterförmig die Probe abläuft und transmittierte Elektronen detektiert werden.^[34]

In dieser Arbeit gezeigte TEM- und STEM-Aufnahmen wurden an einem FEI Osiris der Firma FEI (Hillsboro, USA) bei 200 kV von JENS TREPTOW (AG Feldmann) durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgte durch das Auftragen eines Tropfens Suspension auf einen mit Kohlenstoff beschichteten Kupfernetzträger (PLANO, Wetzlar, Deutschland) und anschließendem Trocknen unter vermindertem Druck ($< 10^{-3}$ bar). STEM-Messungen wurden an einem Supra 40 VP (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) mit Beschleunigungsspannungen von 30 kV in einem Arbeitsabstand von 4 mm durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgte analog zu TEM-Messungen.

Energiedispersive Röntgenspektroskopie

In der Elektronenmikroskopie wird die Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDXS, *engl. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) eingesetzt, um die elementare Probenzusammensetzung qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Trifft ein Elektron des Primärstrahls auf ein Probenatom, kann es ein kernnahes Elektron des Probenatoms ausschlagen. Die dabei entstehende Vakanz wird durch Relaxation eines Elektrons aus einer höherliegenden Schale aufgefüllt (Abbildung 2-3). Die Energiedifferenz wird in Form von Röntgenstrahlung freigesetzt und ist element- und übergangsspezifisch. Die entstandene Röntgenstrahlung wird durch die Erzeugung von Elektron-Loch-Paaren in Halbleiterdioden detektiert. Dabei entsteht ein Stromfluss, der proportional zur Anzahl der generierten Ladungsträger und folglich proportional zur Energie der anregenden Röntgen-Photonen ist. Ein Prozess der in Konkurrenz zur Energieabgabe in Form von Röntgenstrahlung steht ist der Auger-Effekt, bei dem die freiwerdende Energie auf ein weiteres Elektron übertragen wird. Dieses sogenannte Auger-Elektron verlässt infolgedessen das Atom.^[35] Die Wahrscheinlichkeit des Auger-Effekts sinkt mit steigender

Ordnungszahl, weshalb die Energiedispersive Röntgenspektroskopie besonders für schwerere Elemente ($Z > 10$) geeignet ist. Mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie können orts aufgelöst Elementverteilungskarten sowie Elementhäufigkeiten entlang eines Linienprofils aufgenommen werden.^[36]

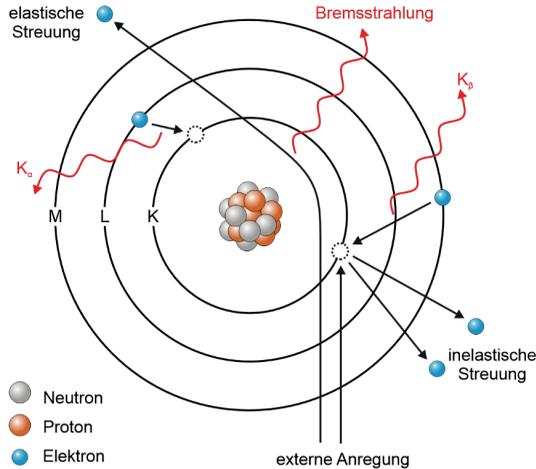


Abbildung 2-3: Entstehung von charakteristischer und kontinuierlicher Röntgenstrahlung durch Beschuss von Materie mit hochenergetischen Elektronen. Modifiziert nach ^[36].

EDXS-Messungen in dieser Arbeit wurden an einem FEI Osiris (Hillsboro, USA) mit einem Bruker Quantax System (XFlash Detektor) der Firma BRUKER (Ettlingen, Deutschland) mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV von JENS TREPTOW (AG Feldmann) durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgte analog zu TEM-Proben. Die Auswertung erfolgte mit der Software ESPRIT (Version 1.8) und TIA TEM imaging and analysis.

2.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Methode, die eine Größenbestimmung suspendierter Partikel ermöglicht. Hierzu wird die Probe mit monochromatischem, kohärentem Laserlicht bestrahlt, welches an den, im Verhältnis zur Wellenlänge des Lichts, kleinen Partikeln in Form von Rayleigh-Streuung gestreut wird.^[37] Die gestreute Strahlung verschiedener Streuzentren interferiert miteinander, sodass eine ortsabhängige Streuintensität detektiert werden kann. Dabei unterliegen die suspendierten Partikel der BROWN'schen Molekularbewegung, weshalb sich ihr Abstand zueinander stets ändert und Fluktuationen in der Streuintensität entstehen. Folglich ergibt sich ein fluktuierendes Interferenzmuster.^[38] Über die Analyse der zeitlichen Fluktuationen kann die Partikelgröße bestimmt werden, indem die Intensität in eine Intensität-Zeit-Autokorrelationsfunktion umgewandelt wird. Hier wird eine Korrelation der Intensität für den Zeitpunkt t und einem späteren Zeitpunkt $t+dt$ aufgestellt. Mit der Zeit nimmt der Wert dieser Funktion exponentiell ab. Kleinere Partikel bewegen sich schneller als größere, weshalb deren Autokorrelationsfunktion schneller abfällt. Über das Abklingverhalten der Autokorrelationsfunktion wird der Diffusionskoeffizient D erhalten, welcher über die STOKES-EINSTEIN-Beziehung reziprok im Verhältnis mit dem hydrodynamischen Radius r_H steht (Formel 2-3).^[39]

$$r_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (2-3)$$

r_H	hydrodynamischer Radius	
k_B	Boltzmann-Konstante	
T	Temperatur	
η	Viskosität	
D	Diffusionskoeffizient	

Die STOKES-EINSTEIN-Beziehung gilt nur streng für einheitliche, sphärische Partikel, weshalb die erhaltene Größenverteilung vom Realzustand abweichen kann. Weiterhin beinhaltet der hydrodynamische Radius, neben den Partikeln selbst, eine Corona aus Solvatmolekülen und darf nicht mit dem tatsächlichen Radius der Partikel verwechselt werden.^[40]

In dieser Arbeit wurden DLS-Messungen an einem ZETASIZER NANO ZS (MALVERN INSTRUMENTS, Malvern, United Kingdom) mit einem He-Ne-Laser ($\lambda = 633$

nm) als Lichtquelle durchgeführt. Die Streuintensität wurde unter einem Winkel von 173° detektiert. Für die Messung wurden 2 mL des Dispersionsmediums (Wasser oder Diethylenglykol) in eine Polystyrol-Küvette (SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) gegeben und mit drei Tropfen der konzentrierten Probensuspension versetzt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der Software ZETASIZER (Version 7.10).

2.3 Bestimmung des Zeta-Potenzials

Liegen Partikel in Suspension sind vor, sind diese stets von Lösungsmittelmolekülen sowie solvatisierten Ionen umgeben. Die Anlagerung dieser an einen Partikel erfolgt in mehreren Schichten, wobei die innerste, sogenannte Stern-Schicht, durch die feste Bindung von Ionen an der Grenzfläche zum Partikel ausgebildet wird. Im Gegensatz dazu besteht die äußere, diffuse Schicht aus locker angelagerten und beweglichen Ionen. Das Anlegen eines elektrischen Feldes bewirkt eine Bewegung der Partikel, wobei ein Teil der Ionen dieser folgt, während die weniger fest gebundenen Ionen abgeschert werden. Die Grenze, ab welcher die Abscherung der Ionen erfolgt wird Scherebene genannt.^[41] Das elektrostatische Potenzial der Scherebene relativ zum Potenzial des Mediums ist das Zeta-Potenzial und kann mittels Laser-Doppler-Elektrophorese bestimmt werden.^[42] Hierzu wird ein Laserstrahl an einem Strahlenteiler geteilt, wobei der eine Strahl nach Durchlaufen der Probe mit dem zweiten, als Referenz dienenden Strahl, interferiert.

$$\zeta = \frac{v \cdot \eta}{\epsilon_0 \cdot \epsilon \cdot E} \quad (2-4)$$

ζ	Zeta-Potenzial
v	Wanderungsgeschwindigkeit
η	Viskosität
ϵ_0	Dielektrizitätskonstante Vakuum
ϵ	Dielektrizitätskonstante Probe
E	Feldstärke

Über die Interferenz kann die Doppler-bedingte Frequenzverschiebung, die proportional zur Wanderungsgeschwindigkeit ist, bestimmt werden. Über die