

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der
Zahnheilkunde der Universität Würzburg
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Entwicklung einer biofunktionalen Beschichtung für mit Silber
dotierte Titandioxid-Nanopartikel**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Amelie Maria Seidenspinner aus Würzburg

Würzburg, November 2018



Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Korreferent: Prof. Dr. med. Andreas Beilhack

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Metalloxid Nanopartikel	1
1.2	Eigenschaften von Titan	1
1.3	TiO ₂ basierte Nanopartikel in der Medizin	2
1.4	Silberdotierte TiO ₂ Nanopartikel	3
1.5	Beschichtung von TiO ₂ Nanopartikeln	6
1.6	Ziel der Arbeit	11
2	Materialien und Methoden	13
2.1	Materialien	13
2.2	Charakterisierungsmethoden	14
2.3	Entwicklung einer erfolgreichen Beschichtung	20
2.3.1	Kontrollieren der Partikelaggregate	20
2.3.1.1	Einfluss von Ultraschall	20
2.3.1.2	Einfluss von TiO ₂ Nanopartikelkonzentration	21
2.3.2	Einfluss von Salzen auf die Stabilisierung der Partikel	21
2.3.3	Einfluss von Citrat auf die Stabilisierung	23
2.3.4	Aminfunktionalisierung von Partikeln mit APTES	24
2.3.4.1	Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach der Zugabe von Toluol	25
2.3.4.2	Einfluss von Magnetrührtechniken	26
2.3.4.3	Einfluss von APTES-Konzentrationen und Waschprozessen	27
2.3.4.4	Einfluss von Tensid auf Beschichtung	29
2.3.4.5	Einfluss von Temperatur	29
2.3.5	Beschichtung mit Dopamin	30
2.3.5.1	Einfluss von pH-Wert und Salzen	30
2.3.5.2	Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach der Zugabe von Tris Base	32
2.3.5.3	Einfluss von Ultraschall	32
2.3.5.4	Abbaustudien von PDA-Beschichtung bei pH 5	34
2.3.6	Funktionalisierung mit Polymeren	35
2.3.6.1	Polymerbeschichtung mit PEG-SH und der Einfluss von Polymerkonzentration	35
2.3.6.2	Polymerbeschichtung mit PMO _x -SH	36
2.3.6.3	Polymerbeschichtung mit PG-SH	36

2.3.7	Einfluss von PBS mit pH 7 auf (un-)beschichtete Partikel	36
2.4	Zellversuche	37
2.4.1	Zellkultur	37
2.4.1.1	Splenozytenisolation.....	37
2.4.1.2	Passagieren von Zellen	38
2.4.1.3	Zellzählung mit Trypanblau	38
2.4.2	Färbung der Zellen für Durchflusszytometrie	39
2.4.3	Inkubation der Zellen mit beschichteten und unbeschichteten TiO ₂ Nanopartikeln	39
2.4.3.1	Inkubation der Splenozyten mit beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln.....	40
2.4.3.2	Inkubation der LPS stimulierte Splenozyten mit beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln.....	40
2.4.3.3	Inkubation der Panc02 Tumorzellen mit beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln.....	41
2.4.3.4	Inkubation der MOPC Tumorzellen mit beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln.....	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Entwicklung einer erfolgreichen Beschichtung	43
3.1.1	Kontrollieren der Partikelaggregate	43
3.1.1.1	Einfluss von Ultraschall	44
3.1.1.2	Einfluss von TiO ₂ Nanopartikelkonzentration	45
3.1.2	Einfluss von Salzen auf die Stabilisierung der Partikel	46
3.1.3	Einfluss von Citrat auf die Stabilisierung.....	48
3.1.4	Aminfunktionalisierung von Partikeln mit APTES.....	49
3.1.4.1	Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach der Zugabe von Toluol.....	49
3.1.4.2	Einfluss von Magnetrührtechniken	51
3.1.4.3	Einfluss von APTES-Konzentration und Waschprozessen.....	52
3.1.4.4	Einfluss von Tensid auf Beschichtung.....	54
3.1.4.5	Einfluss von Temperatur.....	55
3.1.5	Beschichtung mit Dopamin	58
3.1.5.1	Einfluss von pH-Wert und Salzen.....	58
3.1.5.2	Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach Zugabe von Tris Base.....	58
3.1.5.3	Einfluss von Ultraschall	59
3.1.5.4	Abbaustudie von PDA-Beschichtung bei pH 5	63

3.1.6	Funktionalisierung mit Polymeren.....	65
3.1.6.1	Polymerbeschichtung mit PEG-SH und Einfluss von Polymerkonzentration	65
3.1.6.2	Polymerbeschichtung mit PMO _x -SH	67
3.1.6.3	Polymerbeschichtung mit PG-SH.....	67
3.1.7	Einfluss von PBS mit pH 7 auf (un-)beschichtete Partikel	68
3.1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Kontrolle der Nanopartikelaggregate	68
3.1.9	Ergebnisse Zellversuche.....	72
3.1.9.1	Auswirkung von unbeschichteten TiO ₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.....	73
3.1.9.2	Auswirkung von PEG-SH beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.....	75
3.1.9.3	Auswirkung von PDA beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.....	77
3.1.9.4	Auswirkung von APTES beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.....	79
4	Diskussion.....	81
4.1	Entwicklung einer erfolgreichen Beschichtung	81
4.1.1	Kontrollieren der Partikelaggregate	81
4.1.2	Einfluss von Salzen auf die Stabilität	84
4.1.3	Einfluss von Citrat auf Stabilisierung	86
4.1.4	Aminfunktionalisierung von Partikeln mit APTES.....	86
4.1.5	Beschichtung mit Dopamin	89
4.1.6	Funktionalisierung mit Polymeren.....	91
4.1.7	Einfluss von PBS mit pH 7 auf (un-)beschichtete Nanopartikel	92
4.2	Zellversuche	92
4.2.1	Einfluss des Silberanteils	92
4.2.2	Einfluss der Konzentration an (un-)beschichteten Nanopartikeln	93
4.2.3	Einfluss auf adhärente Zellen	94
4.2.4	Einfluss auf Tumorzellen.....	94
4.2.5	Einfluss der Beschichtung.....	95
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	97
6	Literaturverzeichnis.....	100
7	Abbildungsverzeichnis.....	106
8	Tabellenverzeichnis.....	108

Abkürzungsverzeichnis

XRD	(X-Ray Diffraction) Röntgendiffraktometrie
FT IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
REM	Rasterelektronenmikroskop
DLS	Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering)
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglycol
PMO _x	Poly(2-methyl-2-oxazolin)-stat-(ethyleneimin)
PG	Poly(glycidol)
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
PDA	Polydopamin
MPS	Mononukleäres Phagozyten-System
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
NP	Nanopartikel
EtOH	Ethanol
Na ₂ B ₄ O ₇	Tetraborat Natrium
Tween 80	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat
Tris Base	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
MES-Puffer	2-(N)-Morpholino)ethansulfonsäure
Ag	Silber
KCl	Kaliumchlorid
KSCN	Kaliumthiocyanat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat:
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
K ₃ Fe(CN)	Kaliumhexacyanidoferrat(III)
K ₄ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanidoferrat(II)
DLVO	Derjaguin, Landau Verwey und Overbeek-Theorie
rpm	Revolutions pro Minute
RT	Raumtemperatur
TiO ₂	Titanium Dioxid
UT	Ultraschalltip
UB	Ultraschallbad

1 Einleitung

1.1 Metalloxid Nanopartikel

Die Nanotechnologie ist ein stetig wachsendes Gebiet der Wissenschaft, deren Einfluss in den letzten Jahrzehnten enorm zunahm und mittlerweile aus kaum einem Bereich mehr wegzudenken ist. Der größte Anteil der Herstellung und Verwendung von Nanomaterialien ist hierbei den Metalloxid Nanomaterialien zuzuschreiben (Aitken, Chaudhry, Boxall, & Hull, 2006). Titanium Dioxid (TiO_2) Nanopartikel repräsentieren hier diejenige Gruppe, der mit am häufigsten verwendeten Nanomaterialien (Tomankova et al., 2015). Sie werden aufgrund ihrer photokatalytischen Effizienz (Fujishima, Rao, & Tryk, 2000), ihrer Funktion als farbstabiles Pigment (Tomankova et al., 2015) und ihrem relativ kostengünstigen Erwerb (Fujishima et al., 2000) in einem weitreichenden Spektrum verwendet. Als Absorber bzw. Deflektoren von UV-Licht (J. J. Yin et al., 2012) oder in Form von Farbpigmenten (Tomankova et al., 2015) werden sie in einer Vielzahl an Konsumgütern wie Zahnpasten, Sonnencremes und Kosmetikprodukten (Gelis et al., 2003) oder aber auch in Farben sowie Oberflächenbeschichtungen eingesetzt (Gurr, Wang, Chen, & Jan, 2005; Li et al., 2010). Aufgrund ihrer photokatalytischen Eigenschaft finden sie zudem im Bereich der Medizin ein großes Einsatzgebiet (Li et al., 2010).

1.2 Eigenschaften von Titan

Titanerz liegt in der Natur grundlegend als Ilmenit, einem häufig vorkommenden Mineral, vor, welches als FeTiO_3 bezeichnet wird. Häufig wird es aber auch in abgewandelter Form als Rutil, Anatas und Brookit entdeckt, wobei Rutil und Anatas eine tetragonale und Brookit eine orthorhombische Kristallstruktur besitzen (Abbildung 1) (Carp, 2004; Gázquez, Bolívar, Garcia-Tenorio, & Vaca, 2014).

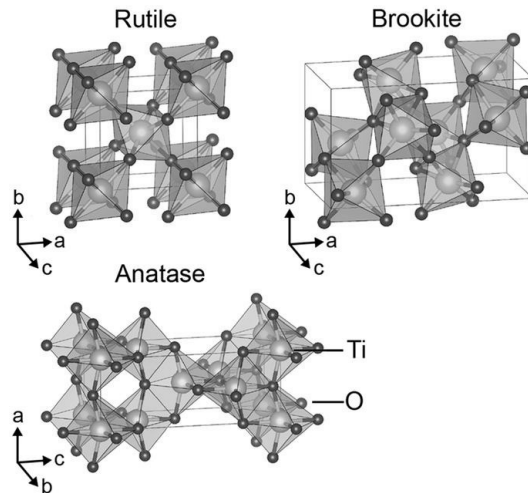


Abbildung 1: Kristallstrukturen von Anatas, Rutil und Brookit.
 (Darstellung nach (Haggerty et al., 2017) unter der Genehmigung von Springer Nature verwendet).

In der Industrie wird heutzutage fast ausschließlich das Mineral Anatas verwendet, da es aufgrund seiner herausragenden photokatalytischen Eigenschaft gegenüber den anderen Mineralen eindeutige Vorteile aufweist (Tanaka, Capule, & Hisanaga, 1991). So werden in nachfolgenden Versuche TiO₂ Nanopartikel in Form von Anatas verwendet.

1.3 TiO₂ basierte Nanopartikel in der Medizin

Daneben findet Titan auch in der Medizin ein weitreichendes Einsatzgebiet. So werden beispielsweise in zahnärztlichen Implantaten (Arys et al., 1998), kardiovaskulären Stents (Li et al., 2010) oder künstlichen Gelenkprothesen (Brien et al., 1992) Anteile davon verwendet. Auch zur effektiveren Medikamentengabe werden TiO₂ Partikel in Form von Nanokompositen eingesetzt. So helfen die Nanokomposite durch spezifische Dosierung und Modifikationen an der Partikeloberfläche sog. gezielte Medikamentenabgaben (engl. *Targeted Drug-Delivery*) zu entwickeln, wodurch die Nebenwirkungen eines Medikaments gesenkt und gleichzeitig seine therapeutische Wirkung erhalten oder gesteigert werden kann (Z. F. Yin, Wu, Yang, & Su, 2013).

Ein weiterer bedeutender Einsatzbereich für TiO₂ Nanopartikel stellt die Tumorthherapie dar. Aufgrund der photokatalytischen Aktivität der Partikel kann eine effektive Abtötung der Tumorzellen erreicht werden (Z. F. Yin et al., 2013). Auf

diesem Potential basiert die photodynamische Therapie (PDT). Bei dieser werden durch UV-Lichtzufuhr mit einer Wellenlänge von weniger als 385 nm (Linsebigler, Lu, & Yates Jr, 1995) Valenzelektronen (e^-) auf dem Valenzband des TiO_2 in einen angeregten Zustand versetzt und gelangen als Leitungselektronen zum Leitungsband, wo sie frei beweglich sind. Dabei hinterlassen die Valenzelektronen positive Ladungsträger, sog. Elektronenlöcher (h^+), im Valenzband (Müller, 1995). Diese freien Elektronen und Elektronenlöcher sind nun in der Lage zelluläre *reaktive Sauerstoffspezies (ROS)*, wie z.B. Peroxide, Superoxide, Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff (Hayyan, Hashim, & AlNashef, 2016), zu erzeugen (Lagopati et al., 2014). Diese ROS besitzen die Fähigkeit, Tumorzellen direkt in Form von programmiertem Zelltod oder indirekt durch Schädigung der Tumervaskularisation und Aktivierung der nicht-spezifischen und spezifischen Immunantwort zu zerstören (Saini, Lee, Liu, & Poh, 2016).

1.4 Silberdotierte TiO_2 Nanopartikel

Bis heute wurden viele Untersuchungen durchgeführt, um die photokatalytische Aktivität von TiO_2 noch weiter zu verbessern. Durch das Einbringen von Edelmetallen (z.B. Silber) in TiO_2 Nanopartikel (sog. *Dotieren*), kann eine Minderung der e^-/h^+ Rekombination, d.h. das Einfangen eines Leitungselektron von einem Elektronenloch (Müller, 1995) und somit eine gesteigerte photokatalytische Effizienz gewährleistet werden (Z. Jiang et al., 2015).

Außerdem fand man heraus, dass durch die Modifikation der Partikel mit Edelmetallen die Möglichkeit besteht, ihre Aktivität in den Bereich des sichtbaren Lichtes zu verschieben (Chen, Shi, Shi, Xu, & Wu, 2012; Feng et al., 2013). Sichtbares Licht kann dennoch nur die oberen Hautschichten durchdringen, so dass ein Tumor, der in tieferen Schichten liegt, nicht erreicht werden kann. Ebenso können keine Metastasen ausreichend belichtet werden, da das Licht den großen Primärtumor nicht penetrieren kann (Ahamed, Khan, Akhtar, Alhadlaq, & Alshamsan, 2017). Aufgrund dieser Problematik konnten Nanopartikel entwickelt werden, welche auch ohne externe Illumination wirksam sind und somit deutliche Vorteile mit sich bringen (Dalai, Pakrashi, Kumar, Chandrasekaran, & Mukherjee, 2012).

Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein weiterer Vorteil von metalldotierten Nanopartikeln darin bestehen kann, bei einer bestimmten Konzentration, selektiv Tumorzellen direkt zu töten, während gesunde Zellen nicht beschädigt werden (Akhtar, Alhadlaq, Kumar, Alrokayan, & Ahamed, 2015). Hierbei wird der programmierte Zelltod eingeleitet, der schlussendlich in der Apoptose, Autophagie oder Nekroptose endet (Y. H. Lee et al., 2014). Grundlage für diese hochspezifische Wirksamkeit besteht darin, dass Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen generell durch eine größere Menge an oxidativem Stress gekennzeichnet sind (Cairns, Harris, & Mak, 2011; Toyokuni, Okamoto, Yodoi, & Hiai, 1995; Trachootham, Alexandre, & Huang, 2009). Jener oxidative Stress entsteht durch eine übermäßige Akkumulation an ROS, welche aufgrund eines Ungleichgewichtes zwischen ROS-Generierung und -Eliminierung zustande kommt. Folglich sind die Krebszellen zum einen bei einem weiteren oxidativen Anstieg stark gefährdet und zeigen zum anderen eine hohe Abhängigkeit von Antioxidantien, welche für das Zellüberleben notwendig sind (Akhtar et al., 2015). In Abbildung 2 ist die Beziehung zwischen dem ROS-Level und dem Tumor nach einem Modell von Cairns dargestellt. Hierbei ist die unterschiedliche Wirkung des ROS auf die Zelle abgebildet. Während bei einem geringen ROS-Level ein positiver Effekt auf die Zelle erzeugt wird, welcher zur Zellproliferation und zum Zellüberleben führt, wird bei einem exzessiven ROS-Anstieg oxidativer Stress gebildet, der schließlich zum Zelltod führt. Durch verschiedene Mutationen und Adaptionen sowie durch die Regelung durch Antioxidantien, versucht die Zelle das ROS-Level wieder in den moderaten Bereich zu bringen und so vor dem Zelltod zu schützen. Diese ROS-Kontrolle verhindert zwar zum einen die schädlichen Auswirkungen des zu hohen ROS-Levels, kann aber zudem die Chance erhöhen, dass die Zellen durch zusätzliche ROS-vermittelte mutagene Ereignisse und den dadurch anfallenden oxidativen Stress die Tumorentstehung fördert (Cairns et al., 2011).

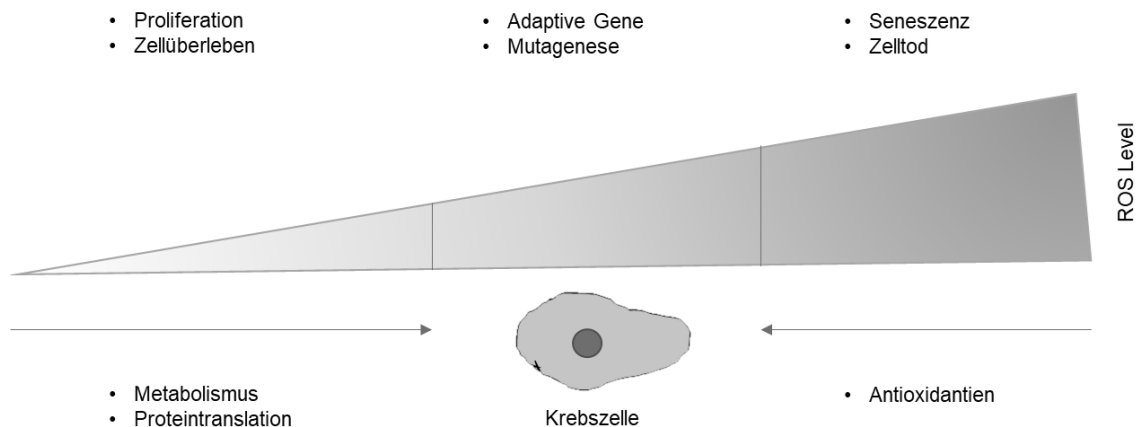


Abbildung 2: Beziehung zwischen ROS-Level und Tumor nach Cairns et al.

Der Effekt von ROS auf die Zelle hängt von dem Level ab, auf dem sich ROS befindet. Niedriges Vorkommen an ROS erzeugt einen positiven Effekt auf die Zelle, welcher zur Zellproliferation und zum Zellüberleben führt. Wird die ROS-Akkumulation zu exzessiv, wie es bei Krebszellen der Fall ist, produzieren sie schädlichen oxidativen Stress, der zum Zelltod führt. In Krebszellen generieren sowohl ein aberranter Metabolismus als auch die Proteintranslation ein abnorm hohes ROS-Level. Um diesem oxidativen Stress entgegen zu wirken, benutzen die Zellen Antioxidationen, welche das ROS hindert, zu einem hohen Level zu akkumulieren. Durch zusätzliche Mutationen und Adaptionen versucht die Zelle das ROS-Level und die Antioxidationen so zu regeln, dass die Zelle überlebt und das ROS auf ein moderates Level reduziert wird. Diese außerordentliche ROS-Kontrolle verhindert zum einen eine schädliche Auswirkung des hohen ROS-Levels, kann aber zudem die Chance erhöhen, dass die Zellen zusätzliche ROS-vermittelte mutagene Ereignisse erfährt und der dadurch anfallende Stress die Tumorentstehung fördert. (Darstellung nach (Cairns et al., 2011) unter der Genehmigung von ACS Publications modifiziert).

Neben anderen ROS generierenden Medikamenten scheinen auch metalldotierte Nanopartikel eine exzellente Grundlage für den ROS induzierten Zelltod bei Tumorzellen zu sein (Akhtar et al., 2015). Sie nutzen das unterschiedliche Potential der Zellen, weitere ROS-Anreicherung auszugleichen. Während normale Zellen ein geringes physiologisches ROS-Niveau besitzen und einen gewissen Anstieg tolerieren können, zeigen Tumorzellen mit einem hohen physiologischen ROS-Level nur eine geringe Toleranz gegenüber einer weiteren Erhöhung an ROS und werden durch den programmierten Zelltod eliminiert (Abbildung 3) (Akhtar et al., 2015; Pelicano, Carney, & Huang, 2004; Trachootham et al., 2009).

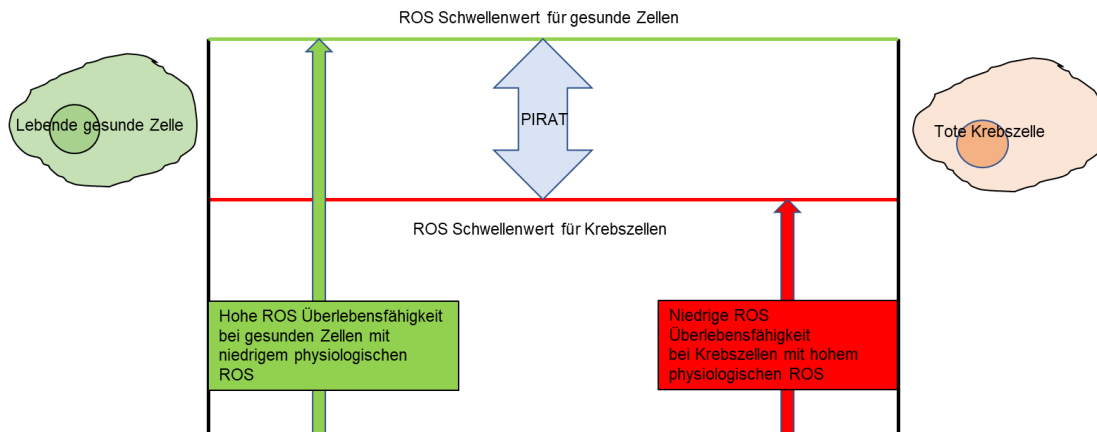


Abbildung 3: Unterschiedliche Toleranz der Zellen gegenüber weiterem ROS-Anstieg nach Akhtar et al.

Potentiell induzierbares ROS in Antikrebs-Therapie (PIRAT) ist der theoretische Unterschied zwischen dem physiologischen ROS-Level bei Krebszellen und gesunden Zellen. PIRAT definiert den Bereich und die Grenze von induziertem ROS in der Antikrebs-Therapie. Über der PIRAT-Grenze würden zusätzlich zu den Krebszellen auch gesunde Zellen sterben. (Darstellung nach (Akhtar et al., 2015) unter der Genehmigung von ACS Publications modifiziert).

1.5 Beschichtung von TiO₂ Nanopartikeln

Forschungen haben ergeben, dass speziell Nanopartikel im Vergleich zu größeren Partikeln des gleichen Materials einen ausgeprägteren Effekt auf Entzündung, Zellschaden und Zellstimulation zeigen (Donaldson, Stone, Gilmour, Brown, & MacNee, 2000). Vor allem die Inhalation, das Schlucken oder Auftragen der Partikel auf die Körperoberfläche bringt für den menschlichen Körper gefährliche Nebenwirkungen mit sich (Jaeger, Weiss, Jonas, & Kriehuber, 2012; Seaton, Tran, Aitken, & Donaldson, 2010). Es kommt folglich zu Zytotoxizität, Entzündungen, DNA-Schäden und Apoptose gesunder Zellen (Ahamed et al., 2017). Dennoch zeigen nicht alle Nanopartikel dieselben toxischen Potentiale. Verschiedene physiochemische Eigenschaften, wie z.B. Größe, Oberflächenstruktur sowie Löslichkeit, Ladung, Zusammensetzung, Aggregationen und Beschichtungen spielen eine große Rolle (Stone et al., 2017).

Um die Biokompatibilität und Stabilität von Nanopartikeln nun zu steigern, werden gezielte Modifikationen oder Funktionalisierung an der Partikeloberfläche vorgenommen (Ding, Floren, & Tan, 2016). Auf diese Weise kann der frühzeitige Ab-

bau durch das Immunsystem in Form von Kupferzellen, phagozytischen Makrophagen und des mononukleäres Phagozyten-Systems (MPS) verhindert werden (Salmaso & Caliceti, 2013). Dadurch werden eine verbesserte Bioverfügbarkeit, eine längere Aktionsdauer und somit seltenere Verabreichungen sowie eine geringere systemische Toxizität mit folglich verbesserter Auswirkung auf die Patientenakzeptanz erreicht (Salmaso & Caliceti, 2013).

Eine Möglichkeit durch Oberflächenmodifikationen die Stabilität der TiO₂ Nanopartikel zu steigern sowie dadurch ihre Zirkulationsdauer im Blut zu verlängern und ihre Toxizität zu senken, stellt die Beschichtung dar. In dieser Thesis werden drei verschiedene Varianten untersucht – die Beschichtung mit Silanen, Polydopamin und Polymeren.

Silane

Indem man Nanopartikel mit Silanen funktionalisiert, können organische Gruppen an ein anorganisches Rückgrat gebunden werden, wodurch die Inkompatibilität mit organischen Medien reduziert wird. Des Weiteren können Eigenschaften wie Hydrophobie/Hydrophilie, Biokompatibilität, Benetzbarkeit, Abbauresistenz, Friktion und Stabilität positiv beeinflusst werden (Edmondson, Osborne, & Huck, 2004).

Um eine Beschichtung der Nanopartikel mit Silanen zu erreichen, wird die haftvermittelnde Wirkung des (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES), dessen Strukturformel in Abbildung 4 dargestellt ist, ausgenutzt. APTES wird in einem weitreichenden Spektrum, wie z.B. bei biologischen Applikationen, eingesetzt und auch in nachfolgenden Versuchen dieser Thesis angewendet (Y. Liu, Li, Li, & He, 2013).

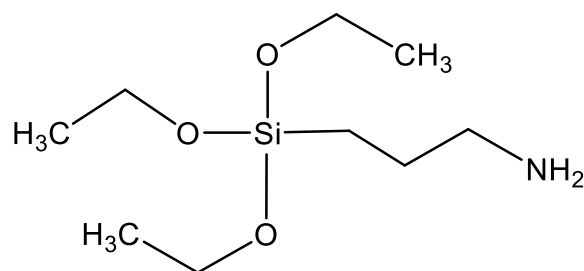


Abbildung 4: Strukturformel von APTES.

Der Mechanismus der Oberflächenfunktionalisierung besteht darin, kovalente Bindungen in Form von Ti – O – Si zwischen den Nanopartikeln und den Silanliganden des APTES auf der Partikeloberfläche zu bilden (Bruce & Sen, 2005; Y. Liu et al., 2013; Uyanik, 2008). In Abbildung 5 ist eine schematische Darstellung der Silanisierung von TiO₂ Nanopartikeln mit APTES aufgezeigt.

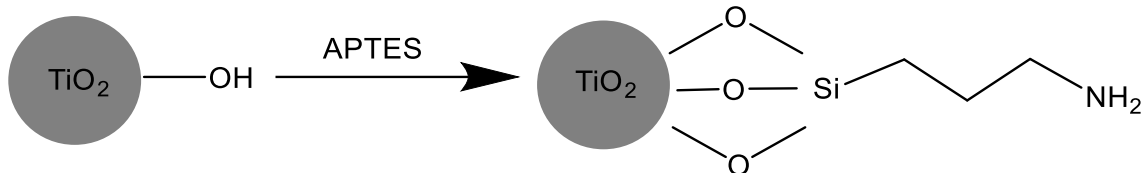


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Silanisierung von TiO₂ mit APTES. (Nach (Gong, Tang, & Guo, 2012)).

Polydopamin

Polydopamin (PDA) erregte aufgrund seiner Einfachheit und Materialunabhängigkeit bei Beschichtungen sowie seiner günstigen Zellinteraktionen und starken Reaktivität für sekundäre Funktionalisierungen großes Interesse. Die Inspiration für die PDA-Beschichtung stammt von Muscheln, welche die ausgezeichnete Fähigkeit besitzen, auch bei feuchter Umgebung an allen Arten von organischen und anorganischen Oberflächen haften zu können (Ding et al., 2016). Forscher haben herausgefunden, dass Muscheln während ihres Haftprozesses sogenannte „Foot Proteins“ sezernieren, die alle reich an 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) und der Aminosäure Lysin sind (Waite, 2001). Die Koexistenz beider Substanzen wird für die herausragende Haftung verantwortlich gemacht. Dopamin, welches als Imitation des *Mytilus edulis* foot protein 5 (Mefp-5) eingesetzt wird, zeigt in seiner Strukturformel das Vorhandensein eben dieser beiden Gruppen (Abbildung 6) (H. Lee, Dellatore, Miller, & Messersmith, 2007).

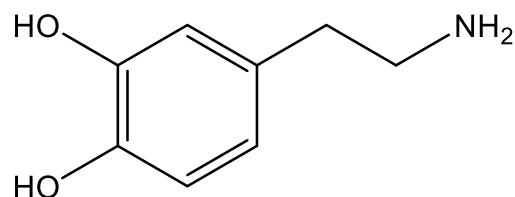


Abbildung 6: Strukturformel von Dopamin mit Katechol- und Aminogruppe.

Die Hydroxylgruppen am Katechol des Dopamins können mit der Hydroxylgruppe auf der TiO₂ Oberfläche Hydrogenbindungen und durch anschließende intermolekulare Dehydratation kovalente Bindungen bilden. Nach dieser Reaktion ist Dopamin in der Lage, eine dünne organische Beschichtung auf der TiO₂ zu bilden und eine Agglomeration von Nanopartikeln zu verringern (Deng et al., 2017). PDA, welches häufig für Beschichtungen von Nanopartikeln verwendet wird, kann auf einfache Art und Weise aus Dopamin hergestellt werden. Hierfür wird Dopamin unter Luftzufuhr in eine wässrige basische Pufferlösung gegeben (J. Jiang, Zhu, Zhu, Zhu, & Xu, 2011; H. Lee et al., 2007; Tao et al., 2016; Wang, Zhao, Wang, Qian, & He, 2016). Ein möglicher Mechanismus für die Modifikation mit Dopamin bzw. PDA ist exemplarisch an Cellulose in Abbildung 7 dargestellt.

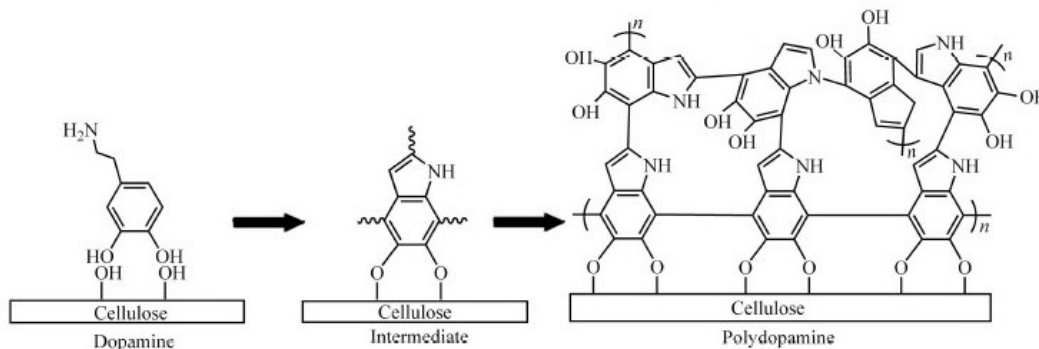


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer möglichen Funktionalisierung mit PDA bei pH 8,5. (Darstellung nach (Xu et al., 2014) unter der Genehmigung von ACS Publications modifiziert).

Die PDA-Beschichtung zeugt aufgrund seiner einfachen Bildung, stabilen chemischen Eigenschaften und speziellen Fähigkeit zur Molekülbildung, von großem Interesse für biomedizinische Applikationen, wie z.B. bei gezielten Medikamentenabgabesystemen oder Interaktionen mit Zellen (Hong et al., 2011; Liebscher et al., 2013; X. Liu et al., 2013; Lyngge, Schattling, & Stadler, 2015). PDA beschichtete Oberflächen können weiterhin aufgrund ihrer Katechol- und chinoiden Einheiten mit verschiedenen Molekülen funktionalisiert werden. Außerdem besitzt PDA durch seine sehr geringe Zytotoxizität und nur geringen akuten Toxizität

eine ausreichende Biokompatibilität. Angesichts ihrer starken Adhäsion, chemischen Reaktivität und Biokompatibilität finden PDA-Beschichtungen immer häufigere Einsatzgebiete (Orishchin et al., 2017).

Polymere

Eine weitere Möglichkeit die Oberflächenstrukturen von Nanopartikeln zu verändern und eine verbesserte Biokompatibilität und Stabilität von Partikeln zu erreichen, ist die Beschichtung mit Polymeren. Die Polymerbeschichtung erzeugt eine sterische Stabilisierung und führt zu einer relativen „Unsichtbarkeit“ der Partikel. Dadurch kommt es zu einer Reduzierung des Abbaus der im Blut zirkulierenden Partikel durch das MPS. Die Polymere müssen dabei bestimmte Eigenschaften erfüllen. Sie müssen beispielsweise hydrophil, nichtionisch, inert und gut löslich sein. Die Polymere können auf verschiedene Art und Weise an die Partikeloberfläche angeheftet werden. Entweder durch Adsorption, hydrophobe Insertion, elektrostatische Bindung oder durch die Bildung kovalenter Bindungen (Storm, Belliot, Daemen, & Lasic, 1995). Polyethylenglycol (PEG) ist heutzutage das am häufigsten verwendete Polymer, um eine Anbindung von Zellen des Immunsystems zu verhindern und dadurch die Stabilität und Biokompatibilität der Nanopartikel zu steigern (Gref et al., 2000).

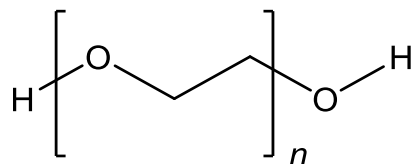


Abbildung 8: Strukturformel von Polyethylenglycol (PEG).

Die Partikel können entweder direkt mit PEG beschichtet werden oder mittels PDA als Katecholdonator (J. Liu et al., 2017; Tao et al., 2016), wie es in nachfolgenden Versuchen der Fall sein wird. Bei nachfolgenden Experimenten wurde PEG-SH, d.h. PEG mit einer freien Thiolgruppe, zur Beschichtung der TiO₂ Nanopartikel verwendet. In Abbildung 9 ist eine schematische Darstellung der Partikelbeschichtung zunächst mit PDA und anschließend eine sekundäre Beschichtung mit PEG-SH dargestellt.

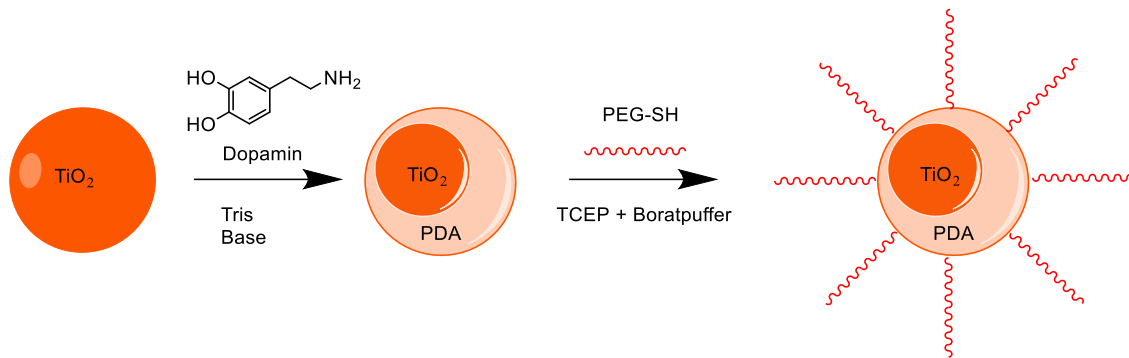


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionalisierung von PDA beschichteten TiO_2 Nanopartikeln mit PEG-SH.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, eine erfolgreiche Beschichtung der verschiedenen TiO_2 Nanopartikel mit aufsteigendem Silberanteil herzustellen und anschließend anhand von Zellversuchen ihre Wirkung gegenüber gesunden Zellen und Tumorzellen zu untersuchen. Zu Beginn wurde versucht, die Aggregatgröße durch verschiedene Methoden zu kontrollieren. Hierfür wurde der Einfluss von Ultraschall in Form von Ultraschallbad- und Ultraschalltipbehandlung abgewogen sowie die Auswirkungen von unterschiedlichen Partikelkonzentrationen, Salzen und Citrat miteinander verglichen. Für die Partikelbeschichtung wurde anschließend auf die eben eingegangenen Möglichkeiten der Funktionalisierung mit Silanen, PDA und Polymeren zurückgegriffen. Hierbei wurde u.a. der Einfluss von pH-Werten, Temperatur, TiO_2 Konzentration und Ultraschallbehandlung auf die Beschichtung überprüft. Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden wurden die Proben anschließend hinsichtlich Größe (DLS), Zetapotential (Zetasizer), Molekülzusammensetzung (FT IR) und Struktur (SEM und STEM) charakterisiert und daraufhin gewertet. Nachdem drei erfolgreiche Beschichtungen mit APTES, PDA und PEG-SH hergestellt werden konnten, wurde im zweiten Teil der Arbeit die Auswirkung der beschichteten Partikel auf gesunde und kanzerogene Zellen überprüft. Hierfür wurde zum einen der Einfluss auf gesunde und unbehandelte sowie auf mit LPS stimulierten Splenozyten der Maus untersucht und mit der Auswirkung der Partikel auf kanzerogene Zellen der MOPC und Panc02 Tumorzelllinien verglichen. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit beschichteten TiO_2 Nanopartikeln sowie,

als Referenzwerte, mit unbeschichteten Partikeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität und Zellzahl via Durchflusszytometrie.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Die verwendeten Substanzen für die Herstellung der Nanopartikelbeschichtung wurden alle kommerziell erworben. Sofern nicht anders angegeben, wurden sie in Milli-Q® Reinstwasser gelöst und anschließend luftdicht verschlossen. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von HCl bzw. NaOH eingestellt.

Während 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES, 99 %), wasserfreies Toluol (99,8 %), Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat (Tween 80), 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Tris Base, $\geq 99,9$ %), 2-(N)-Morpholino)ethansulfonsäure (MES-Puffer, $\geq 99,9$ %), Aceton ($> 99,5$ %) und Poly(ethylene glycol)methyl ether thiol (PEG, Molekulargewicht 2000 g/mol) von der Firma Sigma-Aldrich® aus Deutschland bezogen wurden, wurden Dopaminhydrochlorid (Dopamin, 99 %) bei der Firma Alfa Aesar (Thermo Fisher) aus Deutschland und Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid (TCEP, ≥ 98) bei der Carl Roth GmbH aus Deutschland erworben. Die Polymere Poly(2-methyl-2-oxazolin)-stat-(ethylenimin) (PMOx, Molekulargewicht 4700 g/mol, PDI = 1.4) und Poly(glycidol) (PG, Molekulargewicht 4500 g/mol, PDI = 1.2) wurden mithilfe des Protokolls der Steglich Veresterung/Amidierung durch Frau Sonja Horvat an der FMZ in Würzburg (Deutschland) hergestellt.

Die TiO₂ Nanopartikel wurden von der King Saud University (KSU) in Saudi-Arabien angefertigt und großzügig zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um vier verschiedene Partikelzusammensetzungen:

Tabelle 1: Die vier verwendeten TiO₂ Nanopartikel.

Probe 01	TiO ₂ als Anatas (pur)
Probe 02	TiO ₂ + 1 % Ag
Probe 03	TiO ₂ + 5 % Ag
Probe 04	TiO ₂ + 10 % Ag

Zellmedien RPMI und DMEM sowie EDTA (0,05 % Trypsin EDTA) wurden von der Firma Gibco® by life technologies aus England bezogen. DMEM und 10 % RPMI wurden zusätzlich mit 10 % FBS (Fetales Bovines Serum) und 20 % RPMI mit 20 % FBS versehen sowie mit weiteren 5 mol/l L-Glutamin und 10,000 U/ml Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep). Diese Substanzen wurden ebenfalls von Gibco® by life technologies aus England erworben. Das DPBS wurde von der Firma PAN Biotech aus Deutschland, Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit) von der Firma BioLegend aus der USA und Trypanblau (0,4 %) von Sigma-Aldrich® aus Deutschland bezogen. Für die Lysepufferlösung wurden 168 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, welche von der Carl Roth GmbH aus Deutschland erworben wurden, und 0.1 mM EDTA zugesetzt.

2.2 Charakterisierungsmethoden

Ultraschallbad

Um eine (Re-)Dispergierung der Partikel und das Aufspalten von Partikelaggregaten zu erreichen, wurden die TiO₂ Nanopartikel mit Ultraschall behandelt. Für das Ultraschallbad (Bandelin Sonorex, Typ RK 102 H aus Deutschland) wurden die Proben in Eppis pipettiert und anschließend für einen bestimmten Zeitraum entweder in das Bad gehalten oder mithilfe von Schaumstoffhaltern getragen.

Ultraschalltip

Bei der Ultraschalltipbehandlung wurden die Proben entweder ebenfalls in Eppis oder Glaskolben pipettiert und anschließend in das Ultraschalltip (Branson Digital Sonifier von Heinemann aus Deutschland, Typ: W-250 D) gestellt. Die Sonotrode wurde hierbei so eingestellt, dass sie in die Proben eintaucht und ca. 3 mm vom Boden des Gefäßes entfernt ist. Bei einer Amplitude von 10 % und einem Pulsintervall von 0,5 s wurden die Proben für einen Zeitraum zwischen 2 und 10 min beschallt.

Diverse Geräte

Analysenwaage	Scaltec Instruments, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph MR Hei-Mix D, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen	1. Sigma, von Hartenstein, Deutschland, .SN: 148452 2. HERAEUS MULTIFUGE 3SR ⁺ Centrifuge, Unity™ Lab Services (Part of Thermo Fisher Scientific), MA USA
Wasseraufbereitung	Milli-Q® Wasser: arium® pro, VF TOC, Fa. Sartorius
Vortex	Vortexer Standard, von Hartenstein, Deutschland
Inkubator	HERACELL 150 II CO ₂ Incubator, Unity™ Lab Services (Part of Thermo Fisher Scientific), MA USA
Mikroskop	Model: Eclipse TS 100, Nikon, Japan

Dynamische Lichtstreuung (engl. Dynamic Light Scattering (DLS))

Die dynamische Lichtstreuung macht sich zunutze, dass sich Partikel und Moleküle in konstanter Bewegung (sog. *Brownsche Molekularbewegung*) befinden, wobei die Geschwindigkeit der Bewegung abhängig von der Partikelgröße ist - Kleine Partikel bewegen sich schneller als große (Malvern Instruments GmbH, 2017b). Durch die Brownsche Molekularbewegung, die von den gelösten Partikeln oder Molekülen ausgeht, wird eine Streuung des Laserlichts mit verschiedener Intensität verursacht. Die Analyse dieser Intensitätsschwankungen ermittelt die Geschwindigkeit der Brownschen Molekularbewegung. Anschließend wird mithilfe der Stokes-Einstein-Beziehung die Größe der Partikel bzw. Moleküle errechnet (Malvern Instruments GmbH, 2017a).

Die Partikelgrößenbestimmung wurde mithilfe des Dynamic Light Scatterings (Zetasizer Nano-ZSP von Malvern, Worcestershire, UK) durchgeführt. Hierfür wurden die Proben zunächst in dem Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt, kurz

im Ultraschallbad dispergiert und anschließend in eine recyclebare Kunststoffküvette gegeben. Bei einem Dispersant Refractive Index von 1,330 für Wasser, 1,496 für Toluol und 1,332 für PBS und einer Viskosität von 0,8872 für Wasser, 0,5564 für Toluol und 0,9032 für PBS wurden bei einem Winkel von 173° mindestens zwei Messungen pro Probe durchgeführt, um nach Berücksichtigung der Standardabweichung Messdifferenzen feststellen zu können. Die Auswertung erfolgte anschließend mithilfe der Zetasizer Software. Die Interpretation der Ergebnisse wurde anhand der vom Computer errechneten *Number* Werte durchgeführt.

Zetapotentialmessung

Das Zetapotential ist ein wichtiges Maß für die elektrostatische Abstoßung bzw. Anziehung zwischen Partikeln und Molekülen und gibt wichtige Informationen hinsichtlich Interaktionen, Stabilität und schließlich auch Haltbarkeit von Dispersionen, Emulsionen und Suspensionen (Malvern Instruments GmbH, 2018). Die Ladung oder das Zetapotential von Partikeln und Molekülen ist gekennzeichnet durch die Schnelligkeit, mit der sich Partikel durch eine Elektropherese bewegen. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Partikel bewegen ist proportional zu der Feldstärke und ihrem Zetapotential. Wenn die Feldstärke nun bekannt ist, kann demnach einfach die Bewegungsgeschwindigkeit gemessen und anhand etablierter Thesen Rückschlüsse auf das Zetapotential gezogen werden (Malvern Instruments GmbH, 2017b).

Die Zetapotentialmessungen wurden am Zetasizer Nano-ZSP von Malvern, Worcestershire, UK durchgeführt. Dafür wurden die Proben 1:10 verdünnt, in eine Kapillarzelle gebracht und dreimal gemessen, um nach Berücksichtigung der Standardabweichung Messdifferenzen feststellen zu können.

Infrarotspektroskopie mit Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie (FT IR)

Bei der Infrarotspektroskopie (Nicolet iS10 mit Smart iTR diamond ATR, Thermo Scientific, USA) wurden gemeinsam mit der OMNIC Software Inferogramme gemessen. Der Infrarotstrahl wurde je nach Stärke der Molekülbindung unterschied-

lich absorbiert und in der Software in Form eines Linienspektrums wiedergegeben. Anhand der dadurch entstandenen Peaks konnten Zusammenhänge zwischen der Lage der Absorptionsbanden und gewissen Strukturgruppen festgestellt werden. Die Strukturgruppen ließen, unter Zuhilfenahme empirisch gewonnener Korrelationstabellen aus der Literatur, nähere Zuordnung der erkannten Strukturgruppen zu (Günzler & Böck, 1983). Vor jeder Messung musste zunächst eine Backgroundmessung durchgeführt werden. Anschließend wurden die Proben entweder in Pulverform oder als Flüssigkeit auf den ATR-Kristall (Attenuated total reflectance, Diamant) gegeben und die Messungen mit 32 Scans zwischen dem Wellenzahlbereich von 520 cm^{-1} und 4000 cm^{-1} durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Gerät Zeiss Crossbeam 340 (Oxford Instruments X-Max 50) durchgeführt. Beim REM wird die Oberfläche der Proben mit einem Primärelektronenstrahl, der meist einer Glühkathode entstammt, abgetastet. An den Stellen der Probe, die der Primärelektronenstrahl trifft, werden durch den Elektronenbeschuss Sekundärelektronen herausgeschleudert, welche von einem seitlich angebrachten Detektor aufgenommen anschließend in plastisch wirkende Oberflächenabbildungen transformiert werden (Eckert, 1998).

Für die Analyse wurden ca. 10 μl der zu untersuchenden Probe auf einen Waver gegeben, der mithilfe von Silberlack auf einem Objektträger befestigt war. Nachdem die Probe über Nacht getrocknet wurde, konnten die REM-Aufnahmen durchgeführt werden. Die Hochspannung (*extra high tension*, EHT) betrug hierbei 3,00 kV und die Arbeitsdistanz zwischen 3 und 4 mm.

Rastertransmissionselektronenmikroskop (STEM von engl. „scanning transmission electron microscope“)

STEM ist eine Technik, bei der Elektronenstrahlen durch eine ausreichend dünne Probe passieren und von einem Detektor, der unterhalb der Probenhalterung angebracht ist, erfasst werden. Auf diese Weise wird ein optisches Bild der durchleuchten Probe erzeugt und lässt so eine Analyse der Oberflächenstruktur, im

Gegensatz zum REM, zu (Thomas & Gemming, 2013). Für die STEM Analyse wurden 10 µl der Probe auf einen Parafilm gegeben und anschließend ein Carbon beschichtetes Kupfergitter auf das Tröpfchen platziert. Nach 3 min wurde das überschüssige Lösungsmittel mit einem Filterpapier aufgenommen und die Probe mit 5 µl einer 2 % wässrigen Lösung mit Uranyl Acetat behandelt. Nach 30 s wurde der Überstand der Färbung mit einem Filterpapier aufgenommen und die Proben bis zur Messung mit dem Zeiss Crossbeam 340 (Oxford Instruments X-Max 50) in einer Gitterbox aufbewahrt.

Phasenanalyse durch Röntgendiffraktometrie (XRD)

Bei der Röntgendiffraktometrie wurden mithilfe des Röntgendiffraktometers (Typ D5005, Siemens, München, Germany) und der Software Diffrac plus XRD Commander Röntgendiffraktogramme aufgenommen. Da die Proben aufgrund des ansteigenden Silberanteils verschiedene Kristallgitter aufweisen, werden die auf die Probe treffenden Röntgenstrahlen auf unterschiedliche Art und Weise gebeugt. Diese Beugung wird anhand der $\theta/2\theta$ -Messgeometrie, welche auf der Bragg-Gleichung basiert, bestimmt.

Die reinen TiO₂ Nanopartikel wurden hierfür in Pulverform auf den Messteller gedrückt und glattgestrichen. Bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Emissionsstrom von 40 mA, wurde die Probe mit einer Schrittgeschwindigkeit von 1,5 s/step und einer Schrittweite von 0,02 ° vermessen.

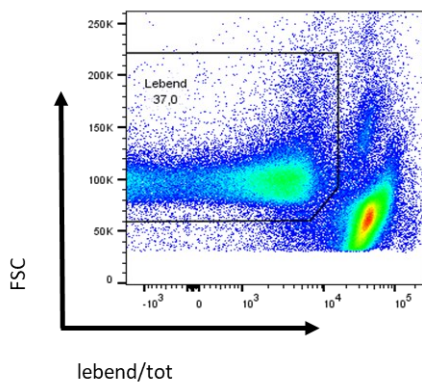
Durchflussszytometrie

Die Durchflussszytometrie ist ein Messverfahren, um Zellen hinsichtlich ihres Volumens und ihrer Granularität zu charakterisieren. Ein Laserlicht passiert die Probe und entsprechend der Zusammensetzung der Zellen können anhand der Beugung des Vorwärtsstreulichts (Forward Scatter (FSC)) und Brechungen des Seitwärtsstreulichts (Side Scatter (SSC)) Rückschlüsse auf das Volumen und die Granularität gezogen werden. Durch die Färbung der Zellen mit Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit) können durch die Gegenüberstellung von FSC und der lebend/tot gefärbten Zellen die lebenden von den toten Zellen durch das Setzen sog. *Gates* abgegrenzt werden. Dadurch ist eine Aussage über ihre Vitalität und

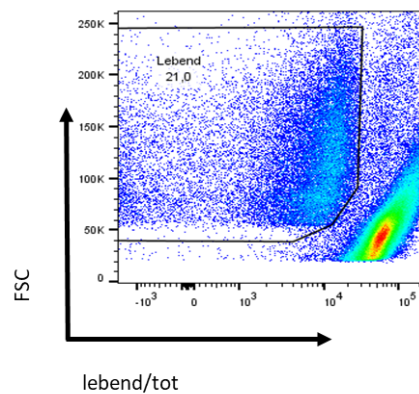
Zellzahl möglich. Anhand von Abbildung 10 ist für jeden Zelltyp ein Gate als Beispiel abgebildet.

Die Durchflusszytometrie wurde mit dem Gerät BD FACSCanto™ II Flow Cytometer der Firma BD Bioscience, USA durchgeführt. Für die Messungen wurden die Zellen zunächst mit Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit) gefärbt und anschließend mithilfe des Zytometers charakterisiert. Die Analyse erfolgte mit der Software FlowJo® Version 10 (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA). Zur Auswertung wurden die Vitalität und die Anzahl lebender Zellen (Zellzahl) verwendet. Die Werte wurden normalisiert und als Vitalität [% Kontrolle] und Zellzahl [% Kontrolle] angegeben.

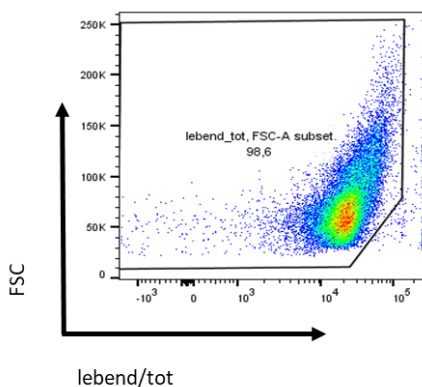
a Splenozyten



b LPS stimulierte Splenozyten



c Panc02



d MOPC

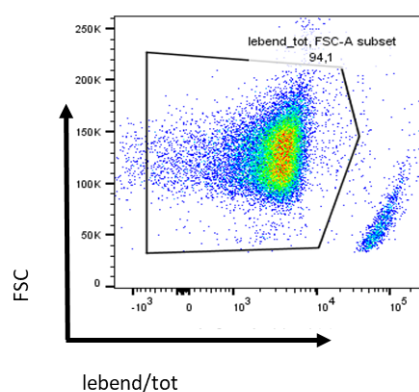


Abbildung 10: Abgrenzung der lebenden von den toten Zellen durch das Setzen sog. Gates bei a Splenozyten, b LPS stimulierte Splenozyten, c Panc02, d MOPC Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit den Nanopartikeln inkubiert und anschließend lebend/tot gefärbt. Die Messung erfolgte mit Durchflusszytometrie.

2.3 Entwicklung einer erfolgreichen Beschichtung

2.3.1 Kontrollieren der Partikelaggregate

Da TiO₂ Nanopartikel große Aggregate bilden, war es das erste Ziel, ihre Größe zu kontrollieren. Dazu wurden verschiedene Methoden miteinander verglichen. Zum einen wurde der Einfluss von Ultraschall in Form von Ultraschallbad- und Ultraschalltipbehandlung abgewogen, zum anderen der Einfluss von unterschiedlichen Partikelkonzentrationen.

2.3.1.1 Einfluss von Ultraschall

Zu Beginn wurden die Nanopartikel sowohl mit Hilfe eines Ultraschallbads als auch mit Ultraschalltip redispergiert und miteinander verglichen.

Für die Ultraschallbadbehandlung wurden von jeder Probe 0,13 mg Nanopartikel in 1 ml Wasser, welches durch die Zugabe von HCl auf einen pH-Wert von 2 eingestellt wurde, gelöst und anschließend in vier Gruppen eingeteilt:

Tabelle 2: Parameter für V. 2.3.1.1 (Ultraschallbad).

Gruppe	Ultraschallbadbehandlung [h]
1	0
2	0,5
3	1
4	2

Für jede Gruppe wurde ein Eppi mit 1 ml der Proben befüllt und für den jeweiligen Zeitraum in das Ultraschallbad gelegt.

Bei der Behandlung mit Ultraschalltip wurden ebenfalls von allen vier Proben jeweils 0,13 mg Nanopartikel in 1 ml Wasser mit pH 2 gelöst und anschließend in drei Gruppen eingeteilt:

Tabelle 3: Parameter für V.2.3.1.1 (Ultraschalltip).

Gruppe	Ultraschalltipbehandlung [min]
1	2
2	5
3	10

Es wurde je ein Eppi mit 1 ml der Lösungen befüllt und in das Ultraschalltip gestellt. Nach der jeweiligen Behandlung wurde die Größe der Nanopartikel via DLS bestimmt und miteinander verglichen.

2.3.1.2 Einfluss von TiO₂ Nanopartikelkonzentration

Um den Einfluss der Nanopartikelkonzentration zu überprüfen wurde jede Probe in jeweils vier Gruppen unterschieden:

Tabelle 4: Parameter für V. 2.3.1.2.

Gruppe	TiO ₂ Nanopartikel [mg/ml]
1	0,13
2	0,065
3	0,0325
4	0,01625

Die Nanopartikel wurden jeweils in einem Eppi mit 1 ml Wasser mit pH 2 gelöst und daraufhin wiederum differenziert. Jede Gruppe wurde einmal mit 2 min Ultraschalltip behandelt und einmal als Referenzmessung ohne weitere Ultraschallbehandlung mittels DLS charakterisiert.

2.3.2 Einfluss von Salzen auf die Stabilisierung der Partikel

Unter der Zugabe von Salzen möchte man angelehnt an die DLVO-Theorie eine Erhöhung der Stabilisierung der TiO₂ Partikel erreichen. Hierfür wurden folgende Salze eingesetzt:

- Kaliumchlorid: KCl
- Kaliumthiocyanat: KSCN
- Kaliumdihydrogenphosphat: KH_2PO_4
- Dikaliumhydrogenphosphat: K_2HPO_4
- Kaliumhexacyanidoferrat(III): $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
- Kaliumhexacyanidoferrat(II): $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$

In dem nachfolgenden Versuch wurde sowohl zwischen fünf verschiedenen Salzkonzentrationen (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM und 100 mM) als auch zwischen drei unterschiedlichen pH-Werten (pH 2; pH 7,4 und pH 10,3) differenziert. Hierfür wurden die Salze in 1 ml Wasser gelöst. Für Probe 01 (TiO_2 ohne Ag) wurden anschließend in Form einer Verdünnungsreihe folgende 15 Proben für jeweils ein Salz hergestellt und 1 ml in ein Eppi pipettiert:

Table 5: Parameter für die Herstellung der Suspensionen für die Überprüfung des Einflusses von Salzen.

Salzkonzentration	pH	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [μl] * ¹	V_{TiO_2} [μl] * ²	V_{Rest}
Suspension 1 (S1): 100 mM	2 7,4 oder 10,3	1300	500	200 μl Salz
Suspension 2 (S2): 10 mM		1350	450	200 μl S1
Suspension 3 (S3): 1 mM		1350	450	200 μl S2
Suspension 4 (S4): 0,1 mM		1350	450	200 μl S3
Suspension 5 (S5): 0,01 mM		1350	450	200 μl S4

*¹: Wasser mit NaOH oder HCl auf jeweiligen pH-Wert eingestellt.

*²: CTiO_2 Nanopartikel: 0,13 mg/ml in Wasser gelöst und mit NaOH oder HCl auf jeweiligen pH-Wert eingestellt.

Für die Herstellung der Suspension 1 mit 100 mM KCl und pH 2 wurden beispielsweise 1300 μl H_2O mit HCl auf einen pH-Wert von 2 gebracht. Anschließend wurden 500 μl der in Wasser gelösten Nanopartikel (Konzentration: 0,13 mg/ml) ebenfalls durch die Zugabe von HCl auf einen pH-Wert von 2 gebracht und zu H_2O hinzugegeben. Zuletzt wurden 200 μl des gelösten KCl zugefügt. Für die Herstellung der Suspension 2 mit 10 mM KCl wurden für einen pH-

Wert von 2 1350 μl H_2O mit pH 2, 450 μl der in H_2O mit pH 2 gelösten Nanopartikel sowie 200 μl der Suspension 1 vermischt. Auf diese Weise wurden die verbleibenden Suspensionen hergestellt.

Nach einer zweiminütigen Ultraschalltipbehandlung wurden die Proben anschließend mittels DLS und Zetapotentialmessung charakterisiert.

Nach der Auswertung des Versuchs wurden am Ende alle vier Nanopartikelproben mit 0,1 mM KCl unter den drei verschiedenen pH-Werten (pH 2; pH 7,4 und pH 10,3) miteinander verglichen. Hierfür wurde wieder der gleiche Versuchsaufbau verwendet:

Tabelle 6: Parameter für die Herstellung der Suspensionen für die Überprüfung des Einflusses von KCl.

Salzkonzentration	pH	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [μl] * ¹	V_{TiO_2} [μl] * ²	V_{Rest}
Suspension 1 (S1): 100 mM	2 7,4 oder 10,3	1300	500	200 μl KCl
Suspension 2 (S2): 10 mM		1350	450	200 μl S1
Suspension 3 (S3): 1 mM		1350	450	200 μl S2
Suspension 4 (S4): 0,1 mM		1350	450	200 μl S3

*¹: Wasser mit NaOH oder HCl auf jeweiligen pH-Wert eingestellt.

*²: $C_{\text{TiO}_2 \text{ Nanopartikel}}$: 0,13 mg/ml in Wasser gelöst und mit NaOH oder HCl auf jeweiligen pH-Wert eingestellt.

Nachdem jeweils 1 ml in ein Eppi überführt und mit Ultraschalltip behandelt wurde, wurden eine Charakterisierung mit dem DLS und eine Zetapotentialmessung durchgeführt.

2.3.3 Einfluss von Citrat auf die Stabilisierung

Nun wurde der Einfluss von Citrat in Form von Natrium Citrate Tribasic Dihydrate ($\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9$) auf die Stabilisierung der TiO_2 Nanopartikel untersucht. Hierfür wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in Experiment 2.3.2 vorgenommen. Zum einen wurde der Einfluss von fünf verschiedenen Werten der Konzentrationen (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM und 100 mM) und zum anderen drei unterschiedlichen pH-Werte (pH 2; pH 7,4 und pH 10,3) überprüft. Dazu wurde das Citrat in 1 ml Wasser gelöst und anschließend für Probe 01 (TiO_2 ohne Ag)

15 Proben hergestellt und 1 ml in ein Eppi pipettiert. Die Mengenangaben können der Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Parameter für die Herstellung der Suspensionen für die Überprüfung des Einflusses von Citrat.

Konzentration	pH	V _{H₂O} [μl] * ¹	V _{TiO₂} [μl] * ²	V _{Rest} [μl]
Suspension 1 (S1): 100 mM	2 7,4 oder 10,3	1300	500	200 C ₆ H ₉ Na ₃ O ₉
Suspension 2 (S2): 10 mM		1350	450	200 S1
Suspension 3 (S3): 1 mM		1350	450	200 S2
Suspension 4 (S4): 0,1 mM		1350	450	200 S3
Suspension 5 (S5): 0,01 mM		1350	450	200 S4

*¹: Wasser mit NaOH oder HCl auf jeweiligen pH-Wert eingestellt.

*²: C_{TiO₂} Nanopartikel: 0,13 mg/ml in Wasser gelöst und mit NaOH oder HCl auf jeweiligen pH-Wert eingestellt.

Nach zweiminütiger Ultraschalltipbehandlung wurden die Proben anschließend mittels DLS und Zetapotentialmessung charakterisiert.

2.3.4 Aminfunktionalisierung von Partikeln mit APTES

Das erste Beschichtungsverfahren beinhaltete die Beschichtung der TiO₂ Nanopartikel mit (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES). Da dieses Verfahren mit Toluol und nicht mit Wasser durchgeführt wird, wurde anfangs diejenige Behandlung der Nanopartikel bestimmt, die eine möglichst effektive Aufspaltung der Aggregate und dadurch geringste Größe der TiO₂ Partikel mit sich brachte.

Danach wurden verschiedene Beschichtungsprozesse durchgeführt, in denen man den Einfluss von Temperatur, APTES-Konzentration sowie Art und Weise des Waschprozesses auf die Beschichtung untersuchte und miteinander verglich.

2.3.4.1 Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach der Zugabe von Toluol

Ähnlich wie bei der Behandlung mit Wasser wurde auch hier der unterschiedliche Einfluss von Ultraschalltipzeiten und Konzentrationen von Nanopartikel untersucht. Anfangs wurden von jeder Probe 0,13 mg/ml Nanopartikel in 1 ml Toluol gelöst und anschließend in drei Gruppen aufgeteilt:

Tabelle 8: Parameter für V. 2.3.4.1 (Einfluss von Ultraschalltipbehandlung).

Gruppe	Ultraschalltipbehandlung in Eis [min]
1	2
2	5
3	10

Die Einstellungen waren identisch wie bei Versuch 2.3.1.1. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Eppis während der Ultraschallbehandlung in Eis gelegt wurden, um eine Überhitzung und anschließende Evaporation des Toluols zu verhindern. Der Versuch sollte, wie bei den vorherigen auch, ebenfalls mit DLS charakterisiert werden. Leider war es nicht möglich, die Glasküvette nach der Messung wieder vollständig vom Toluol zu reinigen, so dass die weitere Charakterisierung anschließend mit einem anderen, aber vergleichbaren Gerät, das PSS Nicomp, durchgeführt wurden. Der Vorteil von PSS Nicomp bestand darin, dass hier Einmal-Glasküvetten verwendet werden konnten. Für unsere Messungen wurde folgendes Modell verwendet: PSS Nicomp aus St. Barbara (San Diego). Nachdem eine Referenzmessung durchgeführt wurde, wurden die Proben bei einem Winkel von 90° viermal à 3 min gemessen. Die Viskosität von Toluol betrug hierbei 0,5564 und der Brechungsindex 1,496.

Nachdem die Ergebnisse miteinander verglichen wurden, wurde der Einfluss unterschiedlicher TiO₂ Nanopartikelkonzentrationen charakterisiert. Hierfür wurden für jede Probe wiederum drei Gruppen gebildet:

Tabelle 9: Parameter für V. 2.3.4.1 (Einfluss von TiO₂ Nanopartikelkonzentration).

Gruppe	TiO ₂ Nanopartikel [mg/ml]
1	0,065
2	0,0325
3	0,01625

Die Partikel wurden in einem Eppi in 1 ml Toluol gelöst und nach zweiminütiger Ultraschalltipbehandlung in Eis am PSS Nicomp mit der identischen Einstellung charakterisiert.

2.3.4.2 Einfluss von Magnetrührtechniken

Zu Beginn wurde anhand der Probe 01 (TiO₂ ohne Ag) die Beschichtung unter Einfluss von drei verschiedenen Magnetrührtechniken untersucht. Hierfür wurden jeweils dreimal die gleichen Suspensionen hergestellt. Für eine Endkonzentration von 0,0325 mg/ml wurden 0,65 mg TiO₂ Nanopartikel in einem Glaskolben in 10 ml Toluol gelöst, anschließend 2 min mit Ultraschalltip behandelt und luftdicht verschlossen. 0,4 ml APTES (= 2% APTES) wurden in 9,6 ml mit Argon entgastes Toluol gelöst und zu den gelösten Nanopartikeln gegeben. Anschließend mussten die Proben 3 d auf Magnetrührern gerührt werden. Hierfür wurden drei verschiedene Prozeduren miteinander verglichen:

Tabelle 10: Parameter für V. 2.3.4.2.

Gruppe	Magnetrührtechnik
1	RT + 0,01 % Essigsäure
2	40 °C
3	RT

Nach 3 d wurden die Glaskolben den Magnetrührern entnommen. Der Suspension wird nach kurzer Ultraschallbadbehandlung 1 ml Wasser hinzugegeben und noch einmal für 1 h gerührt.

Anschließend wurden die beschichteten Nanopartikel gewaschen. Hierzu wurden die Suspensionen in Kunststoffröhrchen gegeben und in der Zentrifuge 1 min bei

4700 rpm in seine Phasen aufgespalten. Anschließend wurde die Toluolphase abpipettiert und 1 ml Wasser hinzugegeben. Nach Überführung der Suspension in 2 ml Eppis, wurden sie bei 14800 rpm 5 min lang zentrifugiert. Der Prozess wurde zweimal wiederholt und schlussendlich noch einmal 1 ml Wasser hinzugegeben. Für die Messungen am DLS wurden 100 µl der Originalsuspension in 900 µl H₂O mit pH 2 vermischt.

2.3.4.3 Einfluss von APTES-Konzentrationen und Waschprozessen

Für den Einfluss verschiedener APTES-Konzentrationen wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in 2.3.4.2 verwendet, die Suspensionen wurden aber in zwei Gruppen aufgeteilt:

Table 11: Parameter für V.2.3.4.3 (Einfluss von APTES-Konzentration).

Gruppe	APTES [%]
1	2
2	10

Hierfür wurden für eine Endkonzentration von 0,0325 mg/ml jeweils 0,065 mg TiO₂ Nanopartikel in einem Glaskolben in 1 ml Toluol gelöst, anschließend 2 min mit Ultraschalltip behandelt und luftdicht verschlossen. Für Gruppe 1 (2 % APTES) wurden 0,04 ml APTES in 0,96 ml entgastes Toluol und für Gruppe 2 (10 % APTES) 0,2 ml APTES in 0,8 ml Toluol gelöst und zu den gelösten Nanopartikeln gegeben. Anschließend wurden die Proben 3 d bei Raumtemperatur auf Magnetrührern gerührt, nach kurzer Ultraschallbadbehandlung wieder 1 ml Wasser hinzugegeben und noch einmal für 1 h gerührt.

Daraufhin wurden diese beiden Proben wiederum in zwei Gruppen aufgeteilt und der Unterschied zwischen Zentrifuge und Dialyse im Waschprozess miteinander verglichen:

Tabelle 12: Parameter für V. 2.3.4.3 (Einfluss des Waschprozesses).

Gruppe	Waschprozess
1	Zentrifuge
2	Dialyse

Für die erste Gruppe wurden die Proben in Eppis gegeben und anschließend dreimal unter Zugabe von jeweils 1 ml Wasser zentrifugiert und gewaschen.

Für die Dialyse wurden die beiden Proben in Membranen mit 12 – 15 kDa großen Poren pipettiert und daraufhin in Gläsern, die mit 1,6 l Wasser gefüllt waren, auf den Magnetrührer gestellt. Innerhalb von 12 h wurde nun sechsmal ein Wasserwechsel durchgeführt.

Die Partikelgröße wurde wieder mithilfe des DLS bestimmt.

Nach Auswertung der vorangegangenen Experimente wurde der erste Versuch unternommen, alle Proben unter den scheinbar besten Methoden mit APTES zu beschichten.

Für die Probe 01 (TiO₂ ohne Ag) wurde 0,065 mg TiO₂ Nanopartikel in 1 ml Toluol gelöst und nach zweiminütiger Ultraschalltipbehandlung luftdicht verschlossen. Anschließend wurden für 2 % APTES 0,04 ml APTES und 0,96 ml Toluol miteinander vermischt und zu den Nanopartikeln gegeben.

Für die Proben 02 – 04 wurden für eine Endkonzentration von 0,065 mg/ml 0,13 mg TiO₂ Nanopartikel in 1 ml Toluol gelöst und ebenfalls nach zweiminütiger Ultraschalltipbehandlung luftdicht verschlossen. Auch hier wurden 0,04 ml APTES (entspricht 2 % APTES) und 0,96 ml Toluol hinzugegeben und zu den Nanopartikeln pipettiert.

Nach 15-minütiger Argonbehandlung wurden alle Suspensionen 3 d lang bei 40 °C auf Magnetrührern gerührt und nach der Zugabe von 1 ml Wasser und kurzer Ultraschallbadbehandlung für eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wurden die Proben fünfmal für 10 min bei 14800 rpm und Zugabe von jeweils 1 ml Wasser zentrifugiert und gewaschen. Nachdem die Zetasizermessung daraufhin nicht durchführbar war, wurden die Partikel über 2 d mithilfe von Stickstoff

getrocknet. Nun wurden die Proben für die DLS-Messung in zwei Gruppen aufgeteilt:

Tabelle 13: Parameter für ersten Versuch der APTES-Beschichtung.

Gruppe	Messmethode
1	Bei pH 7,4
2	Unter Zugabe von 10 µl HCl

Für Gruppe 1 wurden 500 µl Wasser und 500 µl der Probe in ein Eppi gegeben und bei der zweiten 500 µl Wasser, 500 µl der Probe sowie 10 µl HCl. Neben der Größenmessung mittels DLS wurde auch jeweils das Zetapotential bestimmt.

2.3.4.4 Einfluss von Tensid auf Beschichtung

Nach der Erkenntnis, dass die Beschichtung leider bislang nicht funktioniert hatte, wurde eine weitere Möglichkeit der Partikelfunktionalisierung untersucht. Durch die Zugabe von Tween 80 wurde der Einfluss eines Tensids beim Beschichtungsprozess erforscht. Hierfür wurde Probe 01 (TiO₂ ohne Ag) mit dem gleichen Versuchsaufbau wie bisher verwendet. 0,065 mg TiO₂ Nanopartikel wurden in 1 ml Toluol gelöst und nach zweiminütiger Ultraschalltipbehandlung luftdicht verschlossen. Anschließend wurden für 2 % APTES 0,04 ml APTES und 0,96 ml Toluol miteinander vermischt und zu den Nanopartikeln gegeben. Am Ende wurden 2 µl Tween 80 hinzugegeben und wiederum 3 d bei 40 °C auf dem Magnetprüher gerührt. Nach der Zugabe von 1 ml Wasser und kurzer Ultraschallbadbehandlung wurde die Probe erneut für 1 h gerührt. Für den Waschprozess wurde dreimal bei 14800 rpm zentrifugiert und mit jeweils 1 ml Wasser gewaschen. Die Charakterisierung der Größe erfolgte mittels DLS. Zudem wurde wieder eine Zetapotentialmessung durchgeführt.

2.3.4.5 Einfluss von Temperatur

Beim letzten Experiment zur APTES-Beschichtung wurde eine Änderung an der Temperatur von 40 °C auf 120 °C vorgenommen. Für den Versuch wurden 2 mg

TiO₂ von jeder Probe mit jeweils 2 ml Toluol in einem Glaskolben vermischt, wiederum 2 min lang mit Ultraschalltip behandelt, anschließend 200 µl APTES hinzugegeben und luftdicht verschlossen. Die Proben wurden 5 h lang bei 120 °C unter Argon auf dem Magnetrührer gerührt. Daraufhin wurden die Kolben 20 s ins Ultraschallbad gehalten und 2 ml Wasser hinzugegeben. Nach einer weiteren Stunde auf dem Magnetrührer bei 100 °C ohne Argon wurden die Suspensionen von den Glaskolben in vier 2 ml Eppis gegeben und unter Zugabe von 1 ml Aceton zentrifugiert. Nach der Überstandentfernung wurde die Zentrifugation dreimal unter Zugabe von jeweils 2 ml Aceton fortgesetzt. Nachdem die Partikel mit 1 ml Wasser redispergiert wurden, wurden mithilfe des DLS die Größe (mit einer Äquilibrierungszeit von 600 s), mittels Zetapotentialmessung das Zetapotential und mit dem FT IR die Molekülzusammensetzung charakterisiert.

Nach Auswertung der Ergebnisse wurde eine Stocksolution von allen Proben für die Zellversuche hergestellt. Hierfür wurde der identische Versuchsaufbau verwendet und anschließend die Endkonzentration der Proben ermittelt. Dazu wurden zunächst für jede Probe drei leere Eppis gewogen und das Leergewicht notiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl von der Stocksolution in die Eppis pipettiert und getrocknet. Danach wurden die Eppis erneut gewogen, die Differenz der Messwerte ermittelt und anschließend der Mittelwert notiert.

2.3.5 Beschichtung mit Dopamin

Beim Beschichten mit Dopamin wurden in den nachfolgenden Versuchen ebenfalls verschiedene Einflüsse, wie die Zugabe von Salzen, pH-Werte, Dopaminkonzentrationen und die Zugabe von Tris Base untersucht und miteinander verglichen.

2.3.5.1 Einfluss von pH-Wert und Salzen

Für diesen Versuch wurde Probe 01 unter dem Einfluss von drei verschiedenen pH-Werten (pH 2, pH 7,4 und pH 10,3) untersucht. Da in Versuch 2.3.1.2 für

Probe 01 bei einer Konzentration von 0,00325 mg/ml die niedrigsten Partikelgrößen erreicht wurden, wurde diese Nanopartikelkonzentration für das nachfolgende Experiment ausgewählt. Außerdem wurden für jeden pH-Wert vorab das Salz und die Salzkonzentration gewählt, die im Versuch zur Stabilisierung der Proben durch Salze (Versuch 2.3.2) die geringste Aggregatgröße zur Folge hatte. Dementsprechend wurden bei einer TiO₂ Nanopartikelkonzentration von 0,0325 mg/ml für pH 2 die Zugabe von 1 mM KCl, bei pH 7,4 0,1 mM KCl und bei pH 10,3 0,1mM K₄Fe(CN)₅ und die zweiminütige Ultraschalltipbehandlung ausgewählt. Anhand der Tabelle 14 wurde eine exemplarische Rechnung für pH 2 dargestellt:

Tabelle 14: Parameter für die Herstellung der Suspensionen zur Überprüfung des Einflusses des pH-Wertes auf die Beschichtung mit Dopamin (exemplarische Rechnung für pH 2).

	pH 2
Dopamin [mg/ml] * ¹	40
HCl [μl]	5
V _{Dopamin + HCl} :	V _{Dopamin} : 1000 μl V _{HCl} : 5 μl V _{Dopamin + HCl} : 1005 μl
TiO ₂ Nanopartikel * ²	V _{ges} : 2000 μl TiO ₂ Nanopartikel: V _{ges} - V _{Dopamin + HCl} = 995 μl

*¹: in 1 ml Wasser gelöst.

*²: TiO₂ Nanopartikelkonzentration entsprechend pH-Wert.

Nachdem die Nanopartikel 2 min mit Ultraschalltip behandelt wurden, wurden sie sofort zu dem kurz vorher gelösten Dopamin hinzugegeben. Da Dopamin sehr lichtempfindlich ist, ist eine schnelle Durchführung unabdingbar. Anschließend wurden die Proben für 24 h mit Alufolie zugedeckt auf dem Magnetrührer gerührt. Weil sich bei den Suspensionen von pH 7,4 und pH 10,3 sehr große und undefinierbare Konglomerate gebildet haben und sich bei pH 2 auch nach 1,5 h zentrifugieren keine Phasenaufspaltung gezeigt hat, war keine Charakterisierung mit DLS möglich.

2.3.5.2 Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach der Zugabe von Tris Base

In den nachfolgenden Versuchen wurde die Beschichtung mit Dopamin unter der Zugabe von 10 mM Tris Base mit pH 8,5 durchgeführt, um aufgrund des basischen Milieus eine PDA-Beschichtung zu erhalten. Hierfür wurden diejenige Behandlung und Konzentration der TiO₂ Nanopartikel in Tris Base ermittelt, die eine möglichst geringe Aggregatgröße erzielen. Es wurde zum einen zwischen den Konzentrationen 0,26 mg/ml, 0,13 mg/ml und 0,065 mg/ml TiO₂ Nanopartikel und zwischen den Ultraschalltipzeiten 0 min, 2 min, 5 min und 10 min differenziert. Hierfür wurde Probe 01 (TiO₂ ohne Ag) in 3 Gruppen aufgeteilt und folgende 12 Suspensionen hergestellt:

Tabelle 15: Parameter für V. 2.3.5.2.

Gruppe	TiO ₂ Nanopartikel [mg/ml] *1	Ultraschalltipbehandlung [min]
1	0,260	Jeweils 0, 2, 5, 10
2	0,130	
3	0,065	

*1: TiO₂ Nanopartikel jeweils in 1 ml Tris Base gelöst.

Nach der jeweiligen Ultraschalltipbehandlung wurde die Größe der Partikel via DLS ermittelt.

2.3.5.3 Einfluss von Ultraschall

In diesem Experiment wurde der Einfluss der Ultraschalltipbehandlung anhand der Probe 01 (TiO₂ ohne Ag) ermittelt. Dafür wurden jeweils 0,26 mg TiO₂ Nanopartikel in 1 ml Tris Base (10 mM) gelöst und 2 min in das Ultraschalltip gestellt. Es wurden zwei Gruppen differenziert. In der ersten Gruppe wurde nach der jeweiligen Dopaminzugabe (Angaben der Konzentration siehe Tabelle 16) keine weitere Ultraschalltipbehandlung mehr durchgeführt, in der zweiten Gruppe dagegen eine zweiminütige.

Tabelle 16: Einteilung der zwei Gruppen für den Einfluss von Ultraschall auf die Beschichtung mit Dopamin.

Dopaminzugabe [mg/ml]	Gruppe 1	Gruppe 2
1,0	Ohne weitere 2 min Ultraschalltip	Mit weiteren 2 min Ultraschalltip
0,8		
0,6		
0,4		
0,2		
0,0		

Nun wurden die Proben 24 h in Probengläschen auf dem Magnetrührer unter Lichtausschluss gerührt. Danach erfolgte der Waschprozess mithilfe der Zentrifugation (3 x 5 min bei 14800 rpm) und der Zugabe von 1 x 1 ml Aceton und 2 x 1 ml Wasser. Nach der Redispergierung wurden die Proben beider Gruppen mithilfe von DLS und Gruppe 2 weiterhin mit FT IR und REM charakterisiert.

Anschließend wurde eine Stocksolution der PDA beschichteten TiO₂ Nanopartikel hergestellt. Hierfür wurden von allen vier Proben 26 mg Nanopartikel in 100 ml Tris Base gegeben und 2 min mit Ultraschalltip behandelt. Nach der Zugabe von 6,6 ml in Tris Base gelöster 0,6 mg/ml Dopaminlösung und weiteren 2 min Ultraschalltip, wurden die Proben 24 h auf dem Magnetrührer gerührt, anschließend mit 5 ml Aceton und 2 x 5 ml Wasser gewaschen und dreimal in der Zentrifuge bei je 4200 rpm 5 min lang in seine Phasen aufgespaltet. Mit 5 ml Wasser wurden die TiO₂ Nanopartikel redispergiert und daraufhin die Konzentration der Proben errechnet. Dazu wurden zunächst für jede Probe drei leere Eppis gewogen und das Leergewicht notiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl von der Stocksolution in die Eppis pipettiert und getrocknet. Nach erneutem Wiegen der Eppis wurde die Differenz der Messungen ermittelt und anschließend der Mittelwert notiert.

Außerdem wurde die Stocksolution via DLS charakterisiert und das Zetapotential gemessen.

2.3.5.4 Abbaustudien von PDA-Beschichtung bei pH 5

Um das spätere Verhalten der PDA-Beschichtung in den Lysozymen zu simulieren, wurden die beschichteten Nanopartikel in MES-Puffer mit pH 5, dem vorherrschenden pH-Wert in den Lysozymen, gelöst und innerhalb einer bestimmten Zeitspanne gemessen. Dafür wurden von jeder Probe 0,26 mg TiO₂ Nanopartikel in 1 ml Tris (10 mM) gelöst und 2 min lang mit Ultraschalltip behandelt. Anschließend wurde einmal 0,6 mg/ml Dopamin (Gruppe 1) und einmal kein Dopamin (Gruppe 2) hinzugegeben und für weitere 2 min in das Ultraschalltip gestellt. Die Partikel wurden mithilfe der Zentrifuge gewaschen. Einmal wurde 1 ml Aceton hinzugegeben und bei 14800 rpm 5 min lang zentrifugiert und nach Überstandentfernung weitere zweimal mit jeweils 2 ml Wasser und denselben Zentrifugeneinstellungen gewaschen. Redispergiert wurden die Partikel der Gruppe 1 und Gruppe 2 daraufhin mit 1 ml MES (10 mM). Als Referenzgruppe (Gruppe 3) wurden von jeder Probe 0,26 mg TiO₂ Nanopartikel mit 1 ml Tris (10 mM) gelöst und 2 min mit dem Ultraschalltip behandelt. Anschließend wurden ebenfalls 0,6 mg/ml Dopamin hinzugegeben und für weitere 2 min mit Ultraschalltip behandelt. Nachdem die Partikel mittels Zentrifuge und Wasser gewaschen wurden, wurden sie mit 1 ml Wasser redispergiert und mit dem DLS eine einmalige Größenbestimmung durchgeführt.

Die Gruppen 01 und 02 wurden in folgenden Zeitpunkten mit dem DLS gemessen: 0 min, 30 min, 90 min, 180 min, 23 h und 46 h.

Tabelle 17: Einteilung der drei Gruppen für Abbaustudie von PDA-Beschichtung bei pH 5.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3 Referenzgruppe
C _{Dopamin} [mg/ml]	0,6	0,0	0,6
Lösungsmittel	1 ml Tris Base (10 mM)	1 ml Tris Base (10 mM)	1 ml Wasser

2.3.6 Funktionalisierung mit Polymeren

2.3.6.1 Polymerbeschichtung mit PEG-SH und der Einfluss von Polymerkonzentration

In diesem Versuch wurden die Nanopartikel mit dem Polymer PEG-SH beschichtet. Zunächst wurde eine 50 mM Borat-Pufferlösung mit pH 8 hergestellt. Hierfür wurden 1,921 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Tetraborat Natrium) in 50 ml Wasser sowie 0,62 g Borsäure in 400 ml Wasser gelöst, zusammen in eine Glasflasche gegeben und durch HCl-Zugabe auf pH 8 eingestellt. Daraufhin wurde 1 mg/ml Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in 1 ml des Boratpuffers gegeben und anschließend das gelöste TCEP zu dem Polymer PEG-SH gegeben. Es wurden drei Gruppen mit unterschiedlichem PEG-SH-Gehalt eingeteilt:

Table 18: Parameter für V.2.3.6.1.

Gruppe	PEG-SH [mg]	Endkonzentration[mg/ml]
1	5	4,5
2	10	8,9
3	25	22,3

Am Ende wurden die PDA beschichteten Nanopartikel hinzugegeben. Hierfür wurden 120 μl der Stocksolution (s. Versuch 2.3.5.3) hinzugefügt, was einer Konzentration von 1 mg/ml Nanopartikel entspricht.

Die Proben wurden, mit Alufolie abgedeckt, für 22 h auf dem Magnetrührer gerührt und anschließend mithilfe der Zentrifuge gewaschen. Zunächst wurden die Proben bei 14800 rpm 10 min lang zentrifugiert und der Überstand entnommen. Anschließend wurde zweimal unter der Zugabe von jeweils 2 ml Wasser zentrifugiert und die Nanopartikel gewaschen. Nach der Redispergierung mit 1 ml Wasser wurden die Proben mithilfe von DLS, Zetapotentialmessung und FT IR charakterisiert.

2.3.6.2 Polymerbeschichtung mit PMO_x-SH

Ein weiterer Versuch der Polymerbeschichtung wurde durch die Zugabe von PMO_x-SH überprüft. Der Versuchsaufbau war hierfür identisch wie bei Versuch 2.3.6.1. 1 mg/ml TCEP wurde in 1 ml des Borat-Puffers gelöst. Als Polymerkonzentration wurde die geringste Menge, nämlich 5 mg/ml Polymer mit einer Endkonzentration von 4,5 mg/ml gewählt, und zu der Lösung gegeben. Anschließend wurden 120 µl der PDA-Stocksolution (entspricht 1 mg/ml Nanopartikelkonzentration) hinzu pipettiert. Nach 22 h auf dem Magnetrührer war mit bloßem Auge schon deutlich zu erkennen, dass das Coating nicht funktioniert hatte und dementsprechend wurden die Proben nicht weiter analysiert.

2.3.6.3 Polymerbeschichtung mit PG-SH

Nun wurde die Zugabe von PG-SH zu den PDA beschichteten TiO₂ Nanopartikeln überprüft. Der Versuchsaufbau ist hierfür identisch zu den vorherigen Versuchen. 1 mg/ml TCEP wurde in 1 ml des Borat-Puffers gelöst und zu 5 mg des Polymers gegeben. Anschließend wurden 120 µl der PDA-Stocksolution (entspricht 1 mg/ml Nanopartikelkonzentration) hinzu pipettiert. Nach 22 h auf dem Magnetrührer war ebenfalls deutlich erkennbar, dass das Coating nicht funktioniert hatte und dementsprechend wurden die Proben nicht weiter charakterisiert.

2.3.7 Einfluss von PBS mit pH 7 auf (un-)beschichtete Partikel

Da die Partikel für nachfolgende Zellversuche in PBS gelöst wurden, wurde die Auswirkung von PBS bei einem pH-Wert von 7 auf die unbeschichteten und mit APTES, PDA und PEG beschichteten Partikel überprüft. Hierfür wurden reine TiO₂ Nanopartikel (Probe 01) sowohl mit APTES (s. 2.3.4.5), Dopamin (s. 2.3.5.3) und PEG-SH (s. 2.3.6.1) entsprechend der erarbeiteten optimalen Beschichtungsmethode hergestellt, in 1 ml PBS mit pH 7 gelöst und kurz gevortext. Als Referenzwert wurden 0,13 mg TiO₂ Nanopartikel in 1 ml PBS mit pH 7 gelöst und 2 min mit dem Ultraschalltip behandelt. Anschließend wurden DLS-Messungen zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 24 h und 48 h durchgeführt.

2.4 Zellversuche

2.4.1 Zellkultur

Das Kultivieren aller Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen, d.h. bei 37 °C, 5 % CO₂ und in Wasser gesättigter Atmosphäre. Die verwendeten Medien wurden vor Nutzung im Wasserbad auf 37 °C gebracht. Bevor Arbeiten an der Sterilbank durchgeführt werden konnten, wurde diese bereits 15 min früher in Betrieb genommen und gründlich mit 70 % EtOH desinfiziert. Alle Medien und Gegenstände, die unter die Sterilbank gebracht wurden, wurden zuvor mit 70 % EtOH eingesprüht.

Die Splenozyten sowie die mit LPS stimulierten Splenozyten wurden in 10 % RPMIc Medium kultiviert. Während die Panc02 Tumorzellen adhärent wuchsen (Corbett et al., 1984) und mit DMEMc Medium kultiviert wurden, wurden die in Suspension lebenden MOPC Tumorzellen (Multiples Myelom, Zelllinie: Mineral oil induced plasma cells, (MOPC)) mit 20 % RPMIc kultiviert.

2.4.1.1 Splenozytenisolation

Mäuse der Linie C57BL/6 wurden durch zervikale Dislokation getötet. Durch einen Schnitt in der linken Bauchdecke wurde die Milz entnommen, in ein mit PBS gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und auf Eis gelegt. Anschließend wurde ein Zellsieb (EASY strainer, 70 µm, Greiner bio-one GmbH, Deutschland) auf ein Zentrifugenröhrchen gesetzt und mit 5 ml Lysis Puffer benetzt. Die Milz wurde in Stücke geschnitten, auf das Zellsieb gelegt und anschließend mithilfe eines Stempels durchgerieben. Nachdem mit ca. 8 ml Lysis Puffer nachgespült wurde, wurden die Zellen 3 min inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen bis auf 50 ml mit DPBS aufgefüllt, um die Reaktion zu stoppen. Daraufhin wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C und 311 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 15 ml DPBS resuspendiert und erneut durch einen Zellsieb gegeben.

2.4.1.2 Passagieren von Zellen

Um ein Absinken der Proliferationsrate und dadurch ein eventuelles Absterben der Zellen durch eine zu hohe Zelldichte zu verhindern, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert und mit neuem Medium versorgt.

Panc02 Zellen

Alle 2 – 3 Tage wurden die adhärent wachsenden Panc02 Zellen abgelöst und anschließend ein Teil davon unter neuer Medienzugabe kultiviert. Hierfür wurde das verbrauchte Zellmedium mit der Pipette abgenommen und 0,05 % Trypsin-EDTA hinzugegeben, um die Zellen abzulösen. Nach 3 min im Inkubator wurde anschließend unter dem Mikroskop überprüft, ob sich die Zellen bereits von der Flaschenwand gelöst hatten. Um restliche, noch adhärente Zellen ebenfalls abnehmen zu können, wurde mit dem Handballen gegen die Zellkulturflasche gestoßen, um die Zellen mechanisch zu lösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an DMEMc Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 311 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes, wurden die Zellen mit frischem Medium resuspendiert und ein Teil davon anschließend auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

MOPC Zellen

Die in Suspension wachsenden MOPC Zellen wurden alle 2 – 3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen samt Medium in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, bei 311 x g 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Das Pellet wurde daraufhin in 20 % RPMIc resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen überführt.

2.4.1.3 Zellzählung mit Trypanblau

Die Zellzahl wurde mittels Zellkammer nach Neubauer (A. Hartenstein, Deutschland) bestimmt. Trypanblau, ein anionischer Diazofarbstoff, dringt ausschließlich in tote Zellen ein und färbt diese blau. Die intakten Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und bleiben ungefärbt.

Um die Zellen zu zählen, wurden sie 1:10 in Trypanblau verdünnt und anschließend 10 µl davon in eine Zellkammer nach Neubauer gegeben und unter dem Mikroskop gezählt.

Die Formel zur Errechnung der Zellzahl/ml lautet:

$$X = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} \times V_{\text{Zellsuspension}}$$

Verdünnungsfaktor: 10, da eine 1:10 Verdünnung mit Trypanblau stattfand

Kammerfaktor: 10^4

$V_{\text{Zellsuspension}}$: Volumen der gesamten Zellsuspension in ml

2.4.2 Färbung der Zellen für Durchflusszytometrie

Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher an die Membran toter Zellen bindet. Um die Zellen auf ihre Vitalität zu untersuchen, wurde eine Färbung mit Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit) der Firma BioLegend durchgeführt. Für die Färbung der Zellen wurden die Platten bei 311 x g 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Der Farbstoff wurde wie vom Hersteller angegeben angesetzt und verwendet. Die Zellen wurden mit Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit) 1:200 in 200 µl DPBS gefärbt und anschließend für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 311 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend mit 200 µl DPBS resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie.

2.4.3 Inkubation der Zellen mit beschichteten und unbeschichteten TiO₂ Nanopartikeln

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die Auswirkungen von beschichteten TiO₂ mit steigendem Silberanteil auf verschiedenen Zelllinien zu überprüfen. Zum einen wurden die Reaktionen auf Splenozyten der Maus und Splenozyten, die für 48 h mit LPS stimuliert wurden, untersucht. Zum anderen wurden die Effekte auf den Tumorzelllinien Panc02 und MOPC Zellen beobachtet.

2.4.3.1 Inkubation der Splenozyten mit beschichteten TiO₂ Nanopartikeln

In diesem Versuch wurden Reaktionen der Splenozyten von C57BL/6 Mäusen auf TiO₂ Nanopartikel untersucht. Nachdem die Splenozyten isoliert wurden (s. 2.4.1.1), wurden sie in 10 % RPMIc aufgenommen. Daraufhin wurden 5×10^5 Zellen in 100 µl in jedes Well der 96 Wellplate (TC-Platte 96 Well, Suspension, Flat, SARSTEDT (Nürmbrecht), Deutschland) pipettiert. Die TiO₂ Nanopartikel wurden vor der Überführung in die Wells gevortext und mittels kurzer Ultraschallbadbehandlung resuspendiert. Anschließend wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe der beschichteten Nanopartikel von der Konzentration 250 µg/ml 10 % RPMIc bis 4 µg/ml 10 % RPMIc durchgeführt.

Nachdem 100 µl der verdünnten Partikel in die 96 Wellplate mit den bereits auspipettierten Zellen überführt wurden, wurden diese für 24 h im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 311 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es erfolgte für 30 min eine Lebend/Tot-Färbung mit Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit). Danach wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand entfernt und in 200 µl DPBS aufgenommen. Es erfolgte die Messung mithilfe der Durchflusszytometrie.

2.4.3.2 Inkubation der LPS stimulierte Splenozyten mit beschichteten TiO₂ Nanopartikeln

In diesem Experiment wurden die Splenozyten vor der Nanopartikelzugabe zunächst für 48 h mit LPS stimuliert, um eine Zellproliferation zu erreichen. Hierfür wurden nach der Splenozytenisolation 5×10^5 Zellen in 200 µl in jedes Well der 96 Wellplate pipettiert und anschließend LPS in einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugegeben. Die Zellen wurden für 48 h im Inkubator kultiviert. Nach Durchführung einer Verdünnungsreihe der TiO₂ Nanopartikel von den Konzentrationen 250 µg/ml 10% RPMIc bis 4 µg/ml 10 % RPMIc, wurden 50 µl der verdünnten Zellen in jedes Well der LPS stimulierten Splenozyten gegeben und für 24 h im Inkubator kultiviert. Anschließend erfolgte nach 5-minütiger Zentrifugation bei 311 x g eine Lebend/Tot-Färbung durch Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit).

Nach 30 min Inkubation und nachfolgender Zentrifugation, wurden die Zellen in den Wells mit 200 µl DPBS resuspendiert und mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

2.4.3.3 Inkubation der Panc02 Tumorzellen mit beschichteten TiO₂ Nanopartikeln

Um die Reaktionen der Panc02 Tumorzellen auf die unterschiedlich beschichteten TiO₂ Nanopartikel zu ermitteln, mussten die adhärent wachsenden Zellen zunächst von der Zellkulturflasche per Trypsin-EDTA abgelöst werden (s. 2.4.1.2). Die abgelösten Zellen wurden mit DMEMc resuspendiert und anschließend 2 x 10⁴ Zellen in 100µl Medium in jedes Well der 96 Wellplate pipettiert. Die durch Vortex und Ultraschallbadbehandlung resuspendierten Nanopartikel wurden via Verdünnungsreihe, wie im Versuch 2.4.3.1, zu den ausgesäten Zellen gegeben. Nachdem 100µl der verdünnten Zellen zu den Panc02 Zellen hinzugegeben wurden, wurden die Zellen für 24 h im Inkubator kultiviert. Nach der 5-minütigen Zentrifugation bei 311 x g und der anschließenden Färbung mit Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit), wurden die mit 200 µl DPBS resuspendierten Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen.

2.4.3.4 Inkubation der MOPC Tumorzellen mit beschichteten TiO₂ Nanopartikeln

Um die Auswirkungen der beschichteten TiO₂ Nanopartikel auf MOPC Tumorzellen zu überprüfen, wurden die in Suspension wachsenden Zellen aus der Zellkulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 311 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mittels 20 % RPMIc resuspendiert und anschließend 2 x 10⁴ Zellen in 100 µl Medium in die Wells überführt. Die Partikel wurden resuspendiert und gevortext und eine Verdünnungsreihe von 250 µg/ml 20 % RPMIc bis 4 µg/ml 20 % RPMIc hergestellt. 100 µl der verdünnten Zellen wurden zu den ausgesäten MOPC Tumorzellen gegeben, für 24 h mit den Partikeln inkubiert und solange im Inkubator kultiviert. Danach erfolgte nach der fünfminütigen Zentrifugation bei 311 x g sowie der

30-minütigen Färbung via Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit) eine erneute Zentrifugation. Die Pellets wurden in DPBS resuspendiert und via Durchflusszytometrie analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung einer erfolgreichen Beschichtung

3.1.1 Kontrollieren der Partikelaggregate

Zu Beginn wurden die Partikel in Pulverform mittels XRD auf ihre Kristallstruktur hin analysiert. Die Röntgendiffraktogramme zeigten aufgrund des unterschiedlichen Silberanteils verschiedene Peaks an. Die Peaks, welche bei 25° , 38° , 48° , 54° , 55° , 63° , 69° , 70° und 75° zu erkennen waren, wiesen auf die Kristallebenen des TiO_2 als Anatas, welche den Werten (101), (004), (200), (105), (211), (204), (116), (220) und (215) zugeordnet wurden (JCPDS No. 21–1272), hin. Die zusätzlichen Peaks (200), (220) und (311), die bei Probe 02 - 04 an den Stellen 44.59° , 64.70° und 77.57° positioniert waren, zeigten die kubisch-flächenzentrierte metallische Silberkristallstruktur (JCPDS 87-0597).

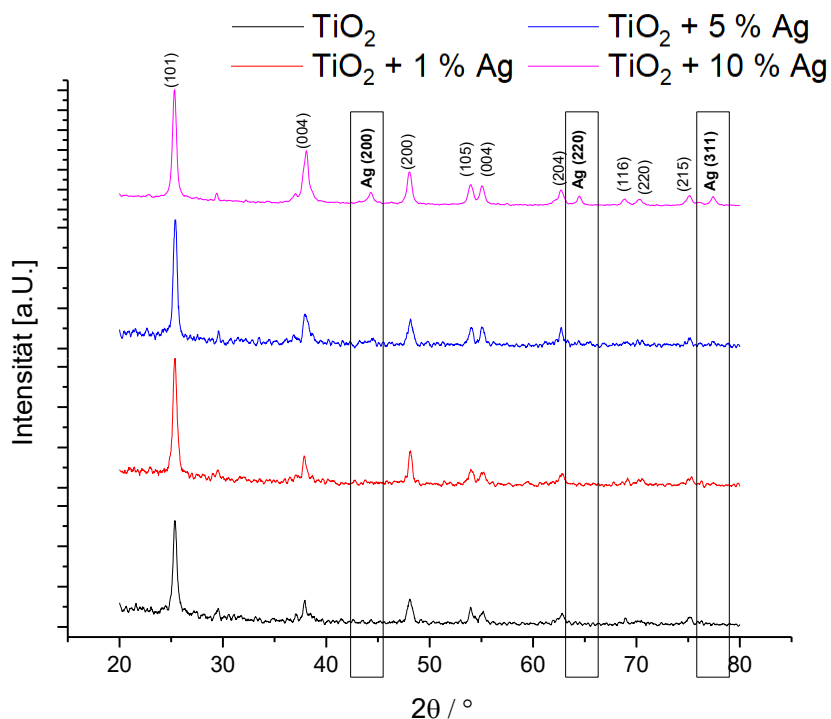


Abbildung 11: XRD Auswertung der vier TiO_2 Nanopartikelproben.

Zudem wurden SEM-Aufnahmen von den unbeschichteten TiO₂ Proben durchgeführt.

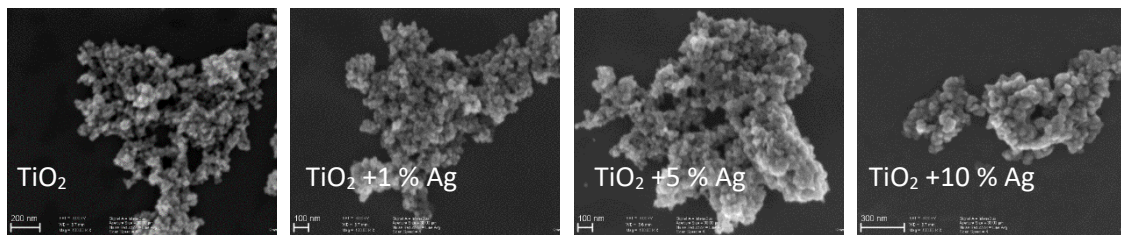


Abbildung 12: SEM-Aufnahmen von unbeschichteten TiO₂-Partikeln mit deutlicher Aggregatsbildung.

Die Partikelgrößen wurden mithilfe der ImageJ 1.50i Software (V. 1.6.0_20, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) analysiert. Der Durchschnittswert der einzelnen Partikel betrug hierbei 10 nm +/- 7 nm und galt als Richtwert für die nachfolgenden Messungen zur Spaltung der Aggregate.

3.1.1.1 Einfluss von Ultraschall

Ziel dieses Versuches war es, die TiO₂ Nanopartikelaggregatgrößen durch Redispersierung mit Hilfe von Ultraschallbad und Ultraschalltip zu kontrollieren. Dadurch sollte im späteren Beschichtungsverfahren eine Beschichtung einzelner Partikel gewährleistet werden.

Wie in Abbildung 13 a dargestellt ist, war nach der Ultraschallbadbehandlung kein Größenunterschied erkennbar. Die Probe 01, d.h. TiO₂ Nanopartikel ohne Silberanteil, wies hier eine deutliche Aggregatsbildung mit Werten von bis zu 1200 nm auf. Bei den anderen drei Proben mit Silberanteil dagegen blieben die Nanopartikelgrößen mit Ausnahme der 30-minütigen Ultraschallbadbehandlung der Probe 02, d.h. TiO₂ Nanopartikel mit 1 % Silberanteil, unter 200 nm. Bei der Redispersierung mit Ultraschalltip (Abbildung 13 b) wurde ein deutlicher Unterschied mit bzw. ohne Ultraschalltipbehandlung erkennbar. Während bei den reinen TiO₂ Nanopartikeln ohne Ultraschalltipbehandlung Werte von ca. 700 nm gemessen wurden, spalteten sich die Aggregate durch die Behandlung und es wurden Werte von unter 100 nm gemessen. Auch bei den Proben mit Silberanteil wurden durch das Ultraschalltip geringere Größen gemessen als durch das Ult-

raschallbad. Beim Betrachten des zeitlichen Aspektes, waren weder bei der Behandlung mit Ultraschallbad noch mit Ultraschalltip Unterschiede erkennbar. Für die weiteren Versuche wurden die Nanopartikel 2 min lang mit Ultraschalltip re-dispergiert.

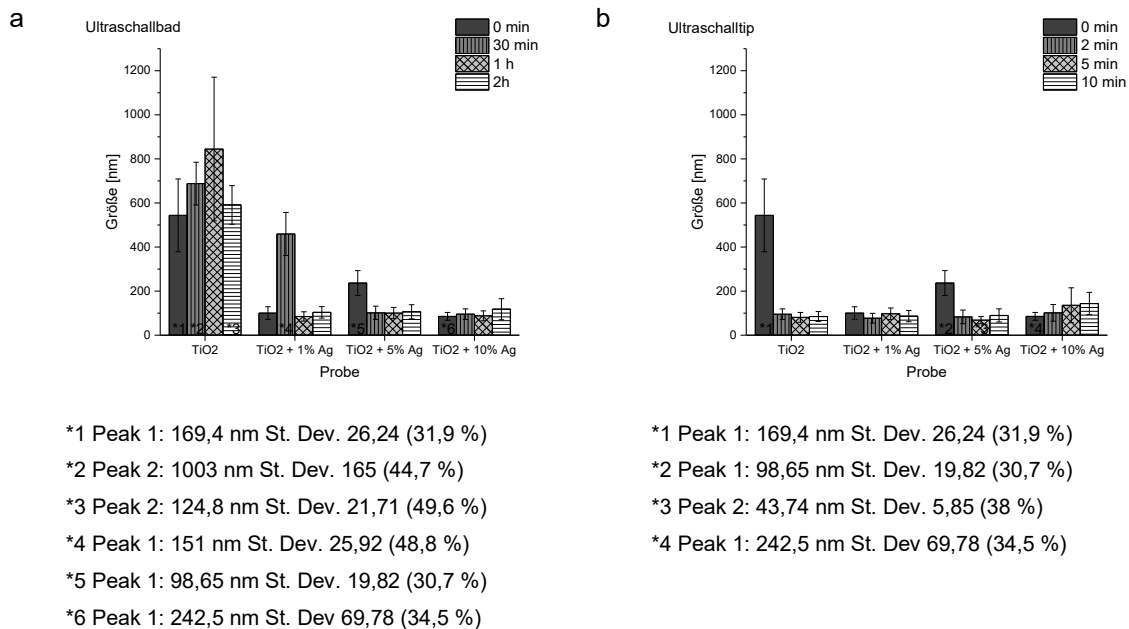


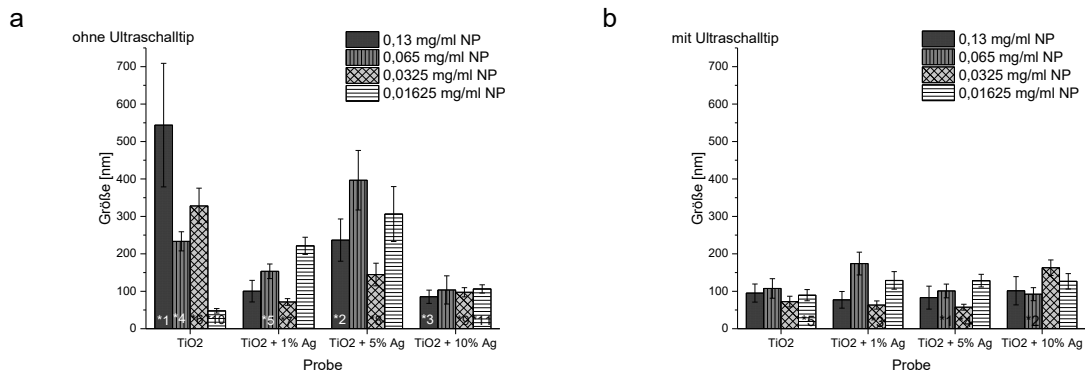
Abbildung 13: Gegenüberstellung des Einflusses von Ultraschallbad und Ultraschalltip auf die Größe der Partikelaggregate.

Die Partikel wurden in Wasser gelöst, mit Ultraschall behandelt und via DLS charakterisiert. **a** Behandlung mit Ultraschallbad; **b** Behandlung mit Ultraschalltip.

3.1.1.2 Einfluss von TiO₂ Nanopartikelkonzentration

Ein weiterer Faktor, der hinsichtlich seiner Auswirkung auf die Aggregatgröße untersucht wurde, war die Partikelkonzentration. Neben der Konzentration wurde außerdem noch einmal eine Gegenüberstellung mit und ohne 2 min Ultraschalltip durchgeführt. Anhand der Gegenüberstellung der Abbildung 14 a und b wurde der Vorteil einer Ultraschalltipbehandlung bestätigt. Auch wenn bei den TiO₂ Partikeln mit 0,01625 mg/ml Nanopartikeln ohne Ultraschallbehandlung eine geringere Aggregatgröße verzeichnet wurde, ist eindeutig erkennbar, dass bei den übrigen Proben entweder eine identische (bei TiO₂ + 10 % Ag) oder eine Verringerung der Aggregatgröße stattfand. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente eine zweiminütige Ultraschalltipbehandlung durchgeführt.

Hinsichtlich der verschiedenen Konzentrationen innerhalb der Gruppe mit 2 min Ultraschalltipbehandlung (Abbildung 14 b), konnte kein einheitliches Ergebnis festgestellt werden. Für die Probe 01 (TiO₂), 02 (TiO₂ + 1 % Ag) und 03 (TiO₂ + 5 % Ag) wurde eine Nanopartikelkonzentration von 0,0325 mg/ml favorisiert und für Probe 04 (TiO₂ + 10 % Ag) eine Konzentration von 0,065 mg/ml.



- *1 Peak 1: 169,4 nm St. Dev. 26,24 (31,9 %)
- *2 Peak 1: 98,65 nm St. Dev. 19,82 (30,7 %)
- *3 Peak 1: 242,5 nm St. Dev. 69,78 (34,5 %)
- *4 Peak 1: 475,9 nm St. Dev. 104,1 (49,3 %)
- *5 Peak 1: 359,9 nm St. Dev. 61,94 (50,0 %)
- *6 Peak 1: 26,85 nm St. Dev. 3,372 (50,0 %)
- *7 Peak 1: 426,5 nm St. Dev. 85,80 (50,0 %)
- *8 Peak 1: 327,2 nm St. Dev. 65,98 (50,9 %)
- *9 Peak 1: 255,9 nm St. Dev. 38,98 (50,0 %)
- *10 Peak 1: 193,8 nm St. Dev. 21,84 (50,0 %)
- *11 Peak 1: 278,1 nm St. Dev. 42,57 (50,0 %)

- *1 Peak 1: 388,3 nm St. Dev. 98,26 (50,5 %)
- *2 Peak 2: 304,2 nm St. Dev. 80,09 (50,2 %)
- *3 Peak 2: 164,7 nm St. Dev. 22,93 (50,3 %)
- *4 Peak 1: 97,51 nm St. Dev. 29,86 (57,6 %)
- *5 Peak 1: 172,3 nm St. Dev. 27,95 (52,7 %)

Abbildung 14: Gegenüberstellung der TiO₂ Nanopartikelkonzentrationen.

Die Partikel wurden in Wasser gelöst, gegebenenfalls mit Ultraschalltip behandelt und via DLS charakterisiert **a** ohne 2 min Ultraschalltipbehandlung; **b** mit 2 min Ultraschalltipbehandlung.

3.1.2 Einfluss von Salzen auf die Stabilisierung der Partikel

In diesem Versuch wurde überprüft, ob durch Zugabe von Salzen, entsprechend der DLVO-Theorie (s. 4.1.2), eine Steigerung der abstoßenden Kräfte und dadurch eine Erhöhung der Stabilität der Nanopartikel zu erreichen ist. Da die gesamte Ausführung dieser Versuchsreihe den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, wird in diesem Fall für jedes Salz nur die geringste Aggregatgröße miteinander verglichen.

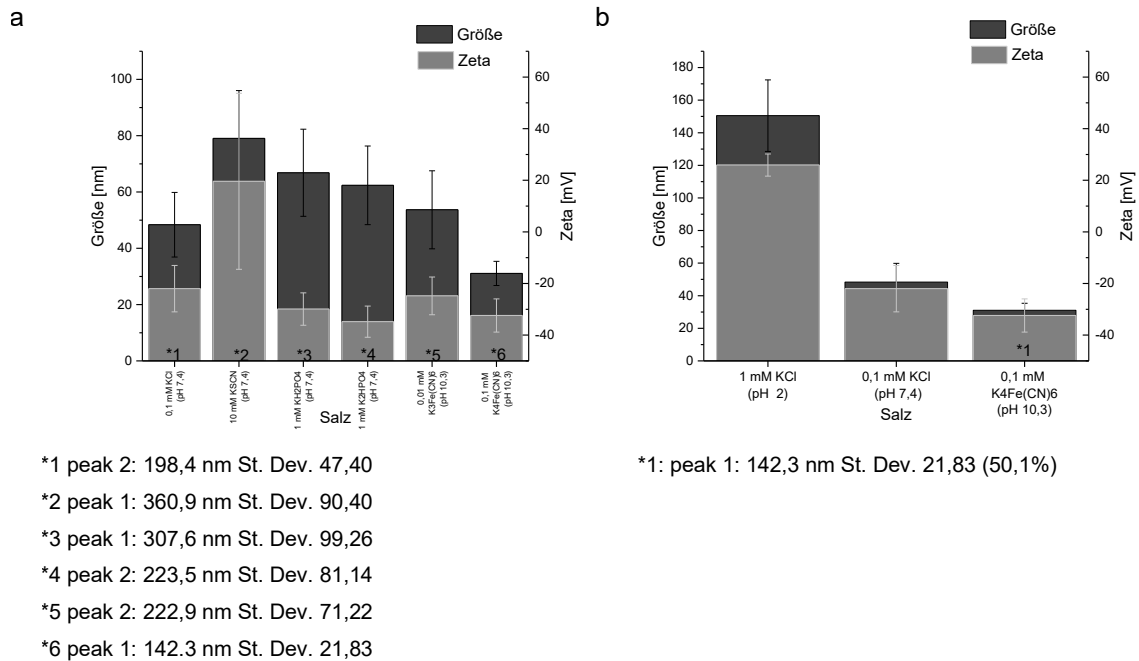


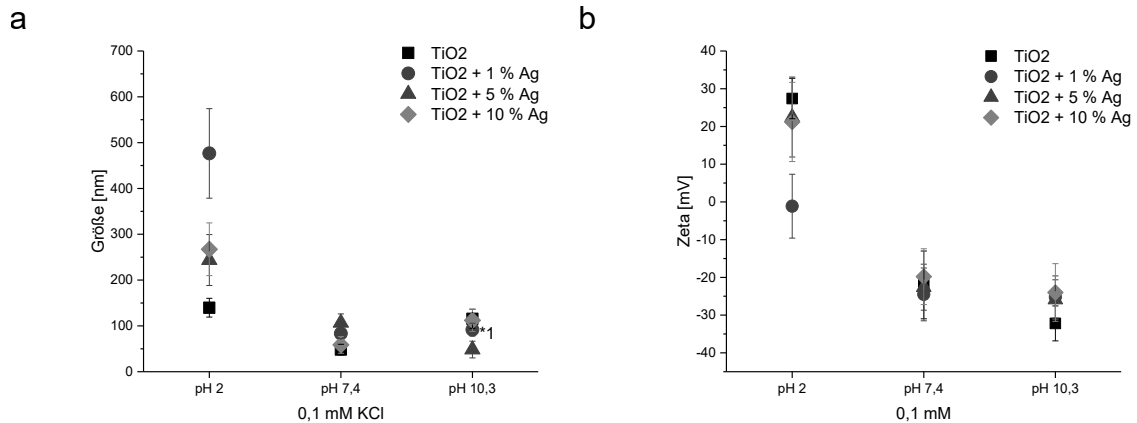
Abbildung 15: Einfluss von Salzen auf die Größe und das Zetapotential der TiO₂ Nanopartikel.

Die Partikel wurden unter Zugabe unterschiedlicher Salze mit H₂O unter entsprechendem pH-Wert gelöst, mit Ultraschalltip 2 min behandelt und via DLS und Zetapotentialmessung charakterisiert; **a** Gegenüberstellung der kleinsten Aggregatgrößen für jedes Salz; **b** Gegenüberstellung der kleinsten Aggregatgröße für jeden pH-Wert.

In Abbildung 15 a ist zu erkennen, dass es keine einheitliche Konzentration gab, die für alle Salze die besten Ergebnisse hinsichtlich der Aggregatgröße erzielte. Während bei KCl und K₄Fe(CN)₆ 0,1 mM und bei KH₂PO₄ und K₂HPO₄ 1 mM die geringsten Größen zur Folge hatte, waren es bei KSCN 10 mM und bei K₃Fe(CN)₆ 0,01 mM. Das Zetapotential belief sich bei allen Werten, bis auf KSCN, auf über - 20 mV. Bei KSCN dagegen wurde ein Wert von + 20 mV gemessen.

Bei der Darstellung der geringsten Aggregatgrößen in Bezug auf den jeweiligen pH-Wert in Abbildung 15 b ist kein eindeutiges Ergebnis erkennbar. Bei pH 2 und pH 7,4 wurde unter KCl-Zugabe die geringste Aggregatgröße gemessen und bei pH 10,3 unter Einfluss von K₄Fe(CN)₆. Das Zetapotential zeigte bei pH 7,4 und 10,3 einen deutlichen Negativwert mit -20 mV bis -30 mV. Bei pH 2 hingegen wurde ein positiver Wert mit + 30 mV gemessen.

Im weiteren Teil des Versuchs wurden anschließend alle vier TiO₂ Nanopartikelproben mit 0,1 mM KCl, angelehnt an das Ergebnis des ersten Teils, behandelt.



*1: peak 1: 36,59 nm St. Dev. 5,35 (49,2 %)

Abbildung 16: Einfluss von 0,1 mM KCl auf Größe und Zetapotential aller vier Proben.

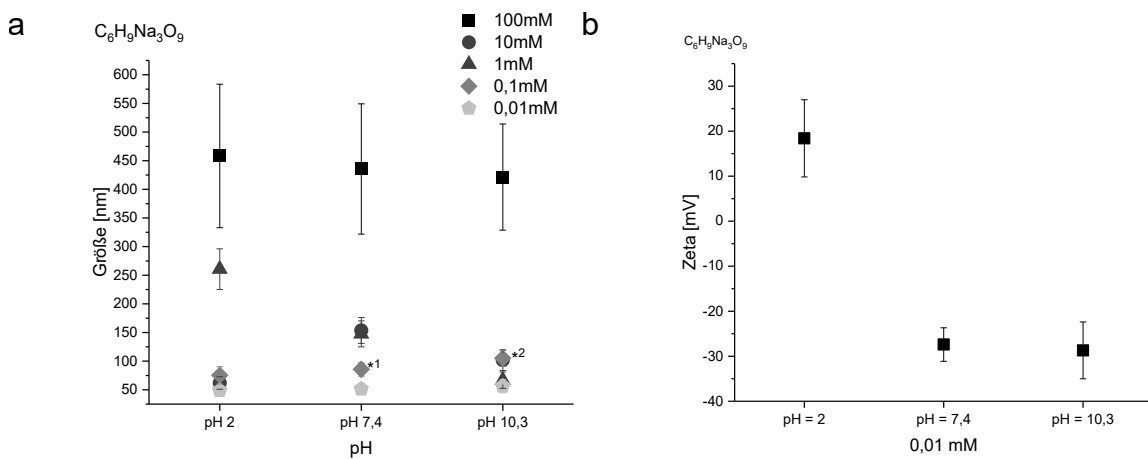
Die Partikel wurden unter Zugabe von 0,1 mM KCl mit H₂O unter entsprechendem pH-Wert gelöst, mit Ultraschalltip 2 min behandelt und via DLS und Zetapotentialmessung charakterisiert; **a** Größe aller vier Proben; **b** Zetapotential aller vier Proben.

Hier konnten die Ergebnisse aus dem ersten Teil des Experiments reproduziert werden. In Abbildung 16 a wird deutlich, dass für die Zugabe von KCl der pH-Wert von 7,4 die niedrigste Aggregatgröße erzielte, dicht gefolgt von pH 10,3. Im Vergleich des Zetapotentials in Abbildung 16 b wurden für pH 2 positive Werte gemessen und für die anderen beiden pH-Werte negative Messungen um die -20 und -30 kV.

3.1.3 Einfluss von Citrat auf die Stabilisierung

In diesem Versuch wurde der Einfluss von Citrat (C₆H₉Na₃O₉) unter verschiedenen pH-Werten und Konzentrationen auf die Stabilisierung der TiO₂ Nanopartikel untersucht. Wie anhand von Abbildung 17 a zu erkennen ist, führte die pH-Änderung nur bei 10 mM und 1 mM Citrat zu einem Unterschied der Aggregatgröße. Während bei pH 2 und 10 mM Citrat eine Aggregatgröße von ca. 275 nm gemessen wurde, sank diese mit zunehmendem pH-Wert ab. Bei 1 mM Citrat wurde dagegen bei pH 2 die geringste Aggregatgröße mit ca. 50 nm gemessen, welche dann bei pH 7,4 gering zunahm und bei pH 10,3 anschließend wieder sank. Innerhalb der fünf verschiedenen Salzkonzentrationen wurden Differenzen hin-

sichtlich der Aggregatgrößen sichtbar. Die größten Aggregate bildete eine Zugabe von 100 mM Citrat, die geringsten Größen wurden dagegen bei einer Konzentration von 0,01 mM verzeichnet. Aus diesem Grund wurden Zetapotentialmessungen mit dieser Gruppe durchgeführt. Beim Betrachten der Abbildung 17 b ist ein Unterschied zwischen den einzelnen pH-Werten erkennbar. Während bei pH 2 das Zetapotential + 20 mV betrug, lag der Wert bei pH 2 und pH 10,3 in einem negativen Bereich bei ca. -30 mV.



*1 0,1 mM: peak 2: 139,7 nm St. Dev. 23,10

*2 0,1 mM: peak 1: 148,3 nm St. Dev. 21,88

Abbildung 17: Einfluss von Citrat unter verschiedenen pH-Werten und Konzentrationen auf die Größe und das Zetapotential der TiO₂ Nanopartikel.

Die Partikel wurden unter Zugabe von Citrat mit unterschiedlicher Konzentration mit H₂O unter entsprechendem pH-Wert gelöst, mit Ultraschalltip 2 min behandelt und via DLS und Zetapotentialmessung charakterisiert; **a** Gegenüberstellung der Aggregatgröße bei verschiedenen Citratkonzentrationen; **b** Gegenüberstellung des Zetapotentials bei verschiedenen pH-Werten und einer Citratkonzentration von 0,01 mM.

3.1.4 Aminfunktionalisierung von Partikeln mit APTES

3.1.4.1 Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach der Zugabe von Toluol

Da die Aminfunktionalisierung von Partikeln mit APTES unter Toluol stattfand, wurde zunächst diejenige Behandlung untersucht, die die geringste Aggregatgröße zur Folge hatte. Hierfür wurden die gleichen Parameter überprüft wie bei

den in Wasser gelösten Partikeln. Zunächst wurde der Einfluss der Ultraschallzeit kontrolliert.

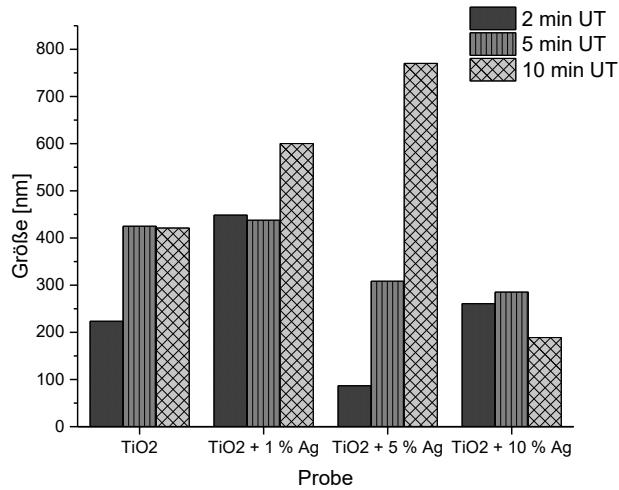


Abbildung 18: Einfluss von Ultraschallzeit auf das Kontrollieren der Nanopartikelaggregate.

Die Partikel wurden mit Toluol gelöst, anschließend mit Ultraschallzeit für einen bestimmten Zeitraum behandelt und via DLS charakterisiert.

Anhand der Abbildung 18 ist zu erkennen, dass abgesehen von der Probe TiO₂ + 10 % Ag die zweiminütige Behandlung für das Aufspalten der Aggregate die geringsten Größen mit sich brachte. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Nanopartikelkonzentration im nachfolgenden Teil des Versuches ebenfalls unter einer Ultraschallzeit von 2 min überprüft. Beim Betrachten der drei verschiedenen TiO₂ Nanopartikelkonzentrationen (0,065 mg/ml, 0,0325 mg/ml und 0,01625 mg/ml) wurden folgende Ergebnisse gemessen:

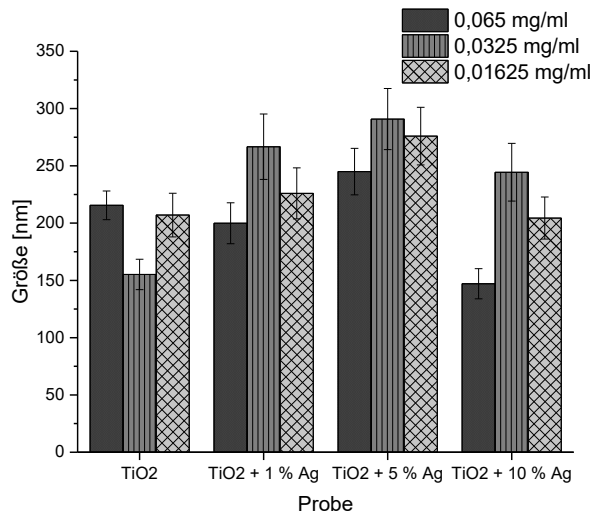


Abbildung 19: Einfluss der Nanopartikelkonzentration auf das Kontrollieren der Aggregate.

Die Partikel wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen mit Toluol gelöst, anschließend für 2 min mit Ultraschalltip behandelt und via DLS charakterisiert.

Hierbei ließ sich kein einheitliches Ergebnis feststellen. Während bei der Probe ohne Silberanteil (TiO₂) bei der Konzentration von 0,0325 mg/ml die geringsten Größen zu verzeichnen waren, wurde bei den anderen drei Proben die Konzentration von 0,065 mg/ml favorisiert. Dieses Ergebnis wurde auch für die nachfolgenden Versuche zur APTES-Beschichtung berücksichtigt.

3.1.4.2 Einfluss von Magnetrührtechniken

Ein weiterer Faktor, dessen Einfluss auf die Nanopartikelbeschichtung untersucht wurde, war der Vergleich unterschiedlicher Magnetrührtechniken. Während die erste Gruppe bei Raumtemperatur (RT) unter Zugabe von 0,01 % Salzsäure, die Gruppe 2 unter Erwärmung auf 40 °C rührte, wurde die letzte Gruppe bei Raumtemperatur (RT) auf den Magnetrührer gestellt. Die Zeit von 3 d blieb bei allen drei Gruppen bestehen.

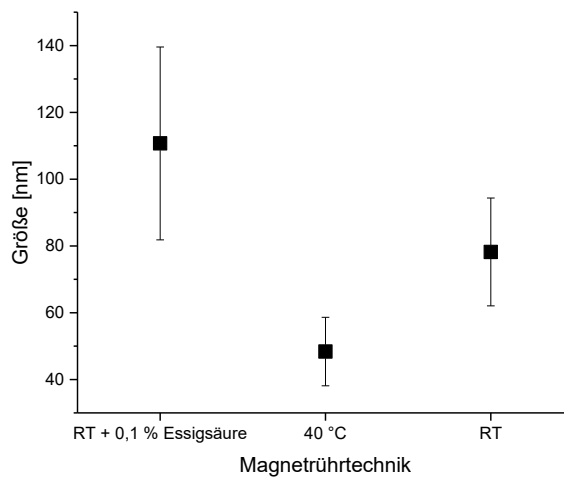


Abbildung 20: Einfluss von Magnetrührtechniken auf die APTES-Funktionalisierung.

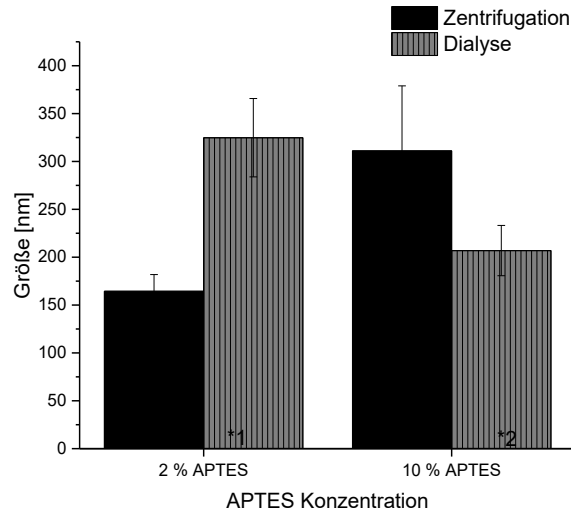
Probe 01 (TiO_2) wurde mittels Toluol gelöst, mit 2 min Ultraschalltip behandelt und bei Gruppe 01 bei Raumtemperatur (RT) unter Zugabe von 0,01 % Salzsäure, bei Gruppe 2 unter Erwärmung auf 40 °C und bei Gruppe 03 bei Raumtemperatur (RT) für 3 d auf Magnetrührer gerührt. Die Charakterisierung erfolgte mit DLS.

Anhand von Abbildung 20 ist zu erkennen, dass sich der Einfluss von Wärme, in diesem Fall 40 °C, positiv auf die Partikelgröße auswirkt. Mit einer Partikelgröße von ca. 50 nm ist der Wert niedriger als bei Raumtemperatur. Hier betrug die Partikelgröße ca. 78 nm und nach Zugabe von 0,01 % Essigsäure ca. 110 nm. Die Behandlung bei Raumtemperatur und zusätzlicher Essigsäuregabe wurde infolgedessen bei den anschließenden Versuchen nicht verfolgt.

3.1.4.3 Einfluss von APTES-Konzentration und Waschprozessen

Im nächsten Versuch wurde sowohl der Einfluss von zwei verschiedenen APTES-Konzentrationen (2 % APTES und 10 % APTES) als auch der Einfluss von zwei unterschiedlichen Waschprozessen (Zentrifuge und Dialyse) miteinander verglichen. Da bei den Proben der Dialyseaufbereitung aufgrund von sehr instabiler Dispersion nur ungenaue DLS-Messungen mit mehreren Peaks gemacht werden konnten, fiel die Entscheidung der zukünftigen Waschprozesse auf die Zentrifuge. Anhand des Graphen in Abbildung 21 ist zu erkennen, dass bei den Proben, welche mittels Zentrifuge gewaschen wurden, bei einer APTES-Konzentration von 2 % eine Partikelgröße von ca. 160 nm und bei einer Konzentration

von 10 % ca. 320 nm gemessen wurden. Aus diesem Grund wurden nachfolgende Experimente mit einer APTES-Konzentration von 2 % durchgeführt.



*1 peak 2: 123,1 St. Dev. 12,77 (50%)

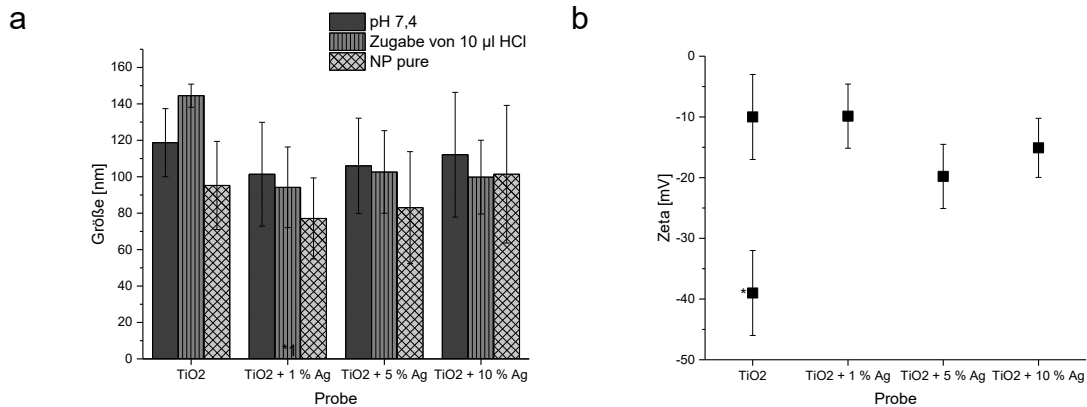
*2 peak 1: 94,20 nm St. Dev. 11,18 (50%)

Abbildung 21: Einfluss von unterschiedlichen APTES Konzentrationen (2% und 10 % APTES) und Waschprozessen (Zentrifuge und Dialyse).

Probe 01 wurde mit Toluol gelöst, 2 min lang mit Ultraschalltip behandelt und mit 2% und 10% APTES beschichtet. Anschließend fand ein Waschprozess mittels Zentrifuge und einer mittels Dialyse statt. Die Charakterisierung erfolgte mit DLS.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nach momentanem Wissensstand der bisherigen Ergebnisse zur APTES-Beschichtung folgende Parameter zu favorisieren waren: Bei einer APTES-Konzentration von 2 % sollten die Proben bei 40 °C 3 d lang auf einem Magnetrührer gerührt und anschließend mittels Zentrifuge gewaschen werden.

Es erfolgte nach den eben genannten Parametern der erste Versuch, alle vier verschiedenen Nanopartikelproben mit APTES zu beschichten.



*1: peak 1: 480,2 nm St. Dev. 107,7 nm (33,9%)

Abbildung 22: APTES Beschichtung unter 2 % APTES, 3 d Magnetrührer bei 40 °C und anschließender Zentrifugenbehandlung.

Die Proben wurden mit Toluol gelöst, 2 min lang mit Ultraschalltip behandelt und anschließend unter Zugabe von 2 % APTES für 3 d bei 40 °C auf dem Magnetrührer gerührt. Der Waschprozess erfolgte mittels Zentrifugation und die Charakterisierung via DLS und Zetapotentialmessung; **a** Einfluss der Faktoren auf Partikelgröße; **b** Einfluss der Faktoren auf das Zetapotential.

In Abbildung 22 a sind die Partikelgrößen nach erfolgter Beschichtung mit APTES aufgezeigt. Hierbei wurden die Proben zum einen bei einem pH-Wert von 7,4 und zum anderen nach Zugabe von 10 µl HCl via DLS gemessen. Als Referenzwerte wurden die Partikelgrößen unbeschichteter Nanopartikel (NP pure) verwendet. Es ist zu erkennen, dass die Größe der Partikel durch die durchgeführte Beschichtung keine deutliche Änderung der Partikelgröße mit sich brachte. Unter Berücksichtigung der großen Standardabweichungen wurden bei allen vier Proben Werte zwischen 60 nm und 140 nm gemessen. Auch die Zugabe von 10 µl HCl zeigte keine Änderungen bei der DLS Messung.

Bei der Zetapotentialmessung in Abbildung 22 b wurden bei allen vier Proben negative Werte gemessen. Bei Probe 02, 03 und 04 lag das Zetapotential in einem Bereich zwischen – 10 mV und – 18 mV. Bei Probe 01 dagegen wurden zwei Peaks gemessen, der erste bei einem Wert von – 10 mV und der zweite bei einem Potential von – 40 mV.

3.1.4.4 Einfluss von Tensid auf Beschichtung

Nach der Erkenntnis, dass die bisherigen Parameter zu keiner erfolgreichen Beschichtung der Nanopartikel führten, wurde eine weitere Möglichkeit untersucht.

Unter Zugabe des Tensids Tween 80 sollte durch eine vergrößerte Oberflächenspannung eine Erhöhung der Partikelstabilität erreicht werden. Es wurden beschichtete (TiO_2 + APTES + Tween 80) und unbeschichtete (TiO_2) Partikel hinsichtlich ihrer Partikelgröße und ihres Zetapotentials miteinander verglichen.

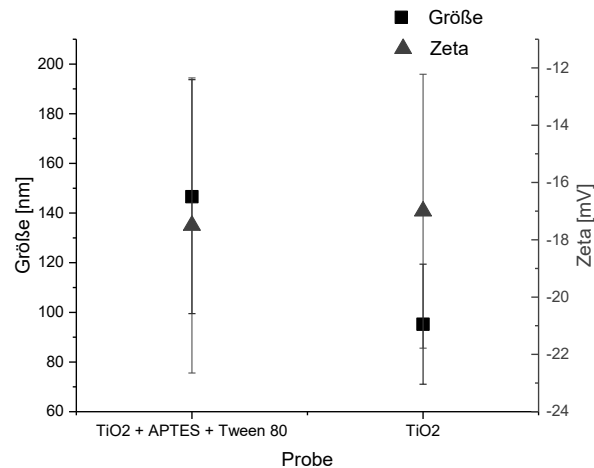


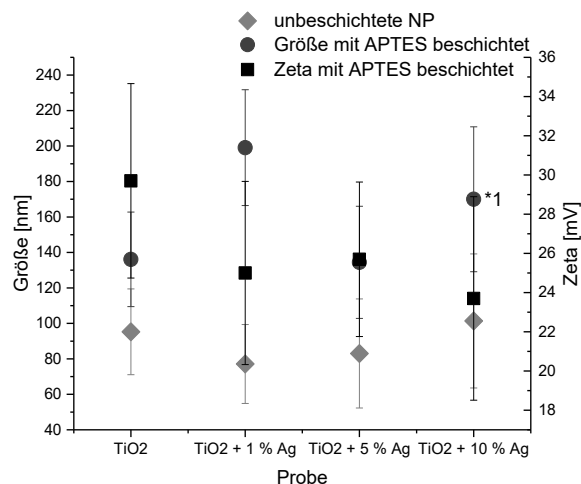
Abbildung 23: Größen- und Zetapotentialmessung nach Zugabe von Tween 80.

Die Proben wurden mit Toluol gelöst, 2 min lang mit Ultraschalltip behandelt und anschließend unter Zugabe von 2 % APTES und 2 μl Tween 80 für 3 d bei 40 °C auf dem Magnetrührer gerührt. Der Waschprozess erfolgte mittels Zentrifugation und die Charakterisierung via DLS und Zetapotentialmessung.

Anhand von Abbildung 23 ist zu erkennen, dass bei diesem Versuch eine Steigerung der Partikelgröße nach einer APTES Beschichtung und Zugabe von Tween 80 zu verzeichnen war. Von ca. 95 nm im unbeschichteten Zustand nahm die Größe der Nanopartikel auf ca. 150 nm zu, so dass eine erfolgreiche Beschichtung zu vermuten war. Das Zetapotential aber blieb nahezu konstant bei -17 mV und erreichte nicht den erhofften positiven Wert.

3.1.4.5 Einfluss von Temperatur

Beim letzten Versuch zur APTES Beschichtung wurde der Einfluss von Temperatur auf den Beschichtungsvorgang untersucht. Die Temperatur wurde nun von 40 °C auf 120 °C erhöht und die Zeit der Magnetrührbehandlung von 3 d auf 5 h reduziert.



*1 peak 1 92,65 nm St. Dev. 18,27 (48,8 %)

Abbildung 24: Größen- und Zetapotentialmessung der APTES Beschichtung bei 120 °C.

Die Proben wurden mit Toluol gelöst, 2 min lang mit Ultraschalltip behandelt und anschließend unter Zugabe von 2 % APTES für 5 h bei 120 °C auf dem Magnetrührer gerührt. Der Waschprozess erfolgte mittels Zentrifugation und die Charakterisierung via DLS und Zetapotentialmessung.

Wie deutlich zu erkennen ist, fand ein Anstieg der Nanopartikelgröße von den unbeschichteten Nanopartikeln und den mit APTES beschichteten Partikeln statt. Die Werte stiegen bei allen Proben um ca. 50 nm, bis auf Probe TiO₂. Hier war ein Anstieg um ca. 120 nm zu verzeichnen. Auch beim Zetapotential wurde eine deutliche Veränderung festgestellt. Die Messungen zeigten positive Werte zwischen 24 mV (TiO₂ + 10 % Ag) und 30 mV (TiO₂).

Diese Erkenntnis lässt den Schluss ziehen, dass eine erfolgreiche Beschichtung der TiO₂ Nanopartikel mit APTES stattgefunden hat. Aus diesem Grund wurde eine FT IR-Messung durchgeführt, um Rückschlüsse auf die jeweilige Stärke der Molekülbindung und Masse der vorhandenen Atome zu ziehen.

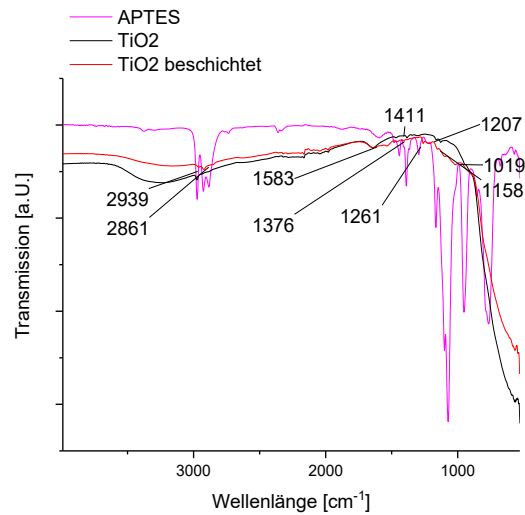


Abbildung 25: FT IR-Messung der mit APTES beschichteten Partikel.
Hier exemplarisch: Probe 01 als TiO₂.

Tabelle 19: Zuordnung der Peaks zu Wellenlängen und anschließende Interpretation (APTES).

Wellenlänge [cm ⁻¹]	Zuordnung
2939, 1583w	v(N-H)
2860, 1410w, 1375w	v(C-H)
1261sh	v(SiO)
1207sh	v(C-N)
1158br, 1019	Aliphatische Amine

Durch die Betrachtung der Abbildung 25 und die dazugehörige Interpretation in Tabelle 19 konnte eindeutig die erfolgreiche Beschichtung der Nanopartikel durch diverse Molekülbindungen bewiesen werden.

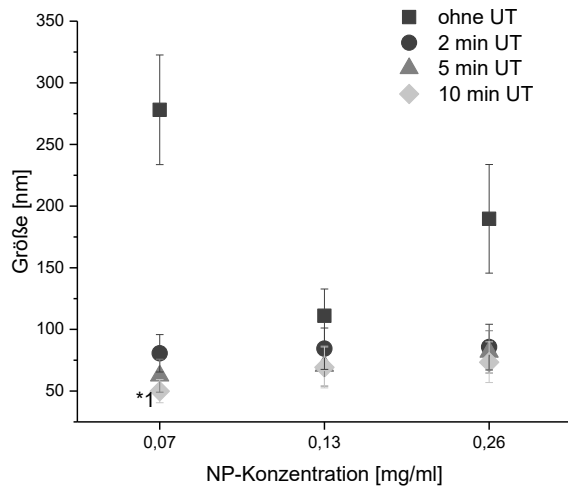
3.1.5 Beschichtung mit Dopamin

3.1.5.1 Einfluss von pH-Wert und Salzen

Für diesen Versuch wurde die Probe 01 unter dem Einfluss von drei verschiedenen pH-Werten (pH 2, pH 7,4 und pH 10,3) untersucht. Da sich bei den Suspensionen von pH 7,4 und pH 10,3 sehr große sowie undefinierbare Konglomerate bildeten und sich bei pH 2 auch nach 1,5 h Zentrifugieren keine Phasenaufspaltung zeigte, war leider keine Charakterisierung mit DLS möglich.

3.1.5.2 Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach Zugabe von Tris Base

Da die nachfolgenden Versuche zur Beschichtung mit Dopamin unter Zugabe des Puffers Tris Base mit pH 8,5 stattfanden, mussten zunächst diejenigen Bedingungen bestimmt werden, die unter 10 mM Tris Base zu einer möglichst großen Aufspaltung der Partikelaggregate und somit geringen Aggregatgröße führten. In diesem Versuch wurde sowohl der Einfluss der TiO₂-Nanopartikelkonzentration als auch der Zeit der Ultraschalltipbehandlung überprüft. Wie in Abbildung 26 deutlich zu erkennen ist, war eine Verringerung der Aggregatgröße durch Ultraschalltipbehandlung nachzuweisen. Während sich die Größe ohne Ultraschallbehandlung deutlich über 100 nm belief, wurden mit einer Ultraschallbehandlung Werte von unter 90 nm gemessen. Innerhalb der Dauer konnten keine deutlichen Unterschiede nachgewiesen werden, so dass für die nachfolgenden Versuche mit Tris Base 2 min Ultraschall ausreichen sollten. Auch bei der unterschiedlichen Konzentration der Nanopartikel konnte kein Unterschied erkannt werden. Um nachfolgende Charakterisierungen aufgrund von einer höheren Konzentration leichter durchführen zu können, wurde bei den Experimenten mit Tris Base eine Konzentration von 0,26 mg/ml ausgewählt.

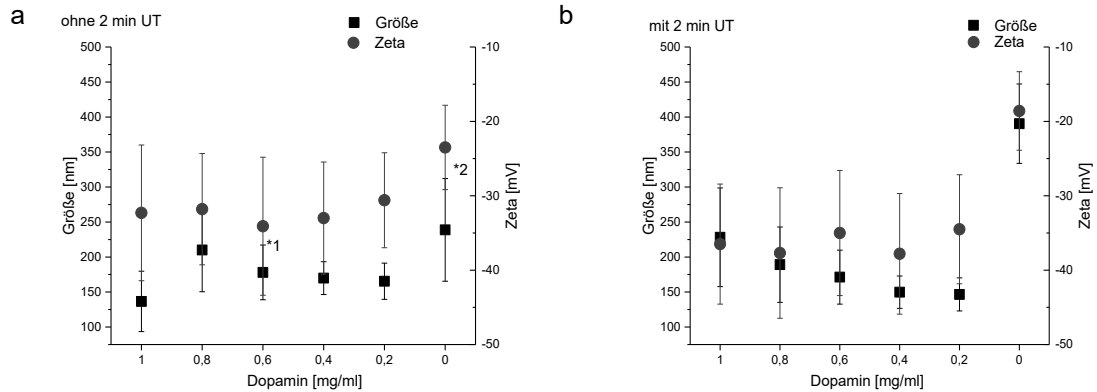


*1 Peak 1: 30,83 nm St. Dev. 4,29 (48,8 %)

Abbildung 26: Ergebnis der Kontrolle der Nanopartikelaggregate nach Zugabe von Tris Base mit pH 8,5.

Die Partikel mit unterschiedlicher Konzentration wurden mit 10 mM Tris Base gelöst und anschließend für einen bestimmten Zeitraum mit Ultraschalltip behandelt. Die Charakterisierung erfolgte via DLS.

3.1.5.3 Einfluss von Ultraschall



*1 Peak 2: 81,5 nm St. Dev. 11,91 (18,5 %)

*2 Peak 2: 83,79 nm St. Dev. 14,52 (32,1 %)

Abbildung 27: Einfluss von Ultraschall auf die Beschichtung mit Dopamin.

Die Partikel mit einer Konzentration von 0,26 mg/ml wurden mit 10 mM Tris Base mit pH 8,5 gelöst und anschließend für 2 min mit Ultraschalltip behandelt. Nach der Zugabe von Dopamin wurde **a** ohne weitere 2 min Ultraschalltipbehandlung und **b** mit weiteren 2 min Ultraschalltipbehandlung via DLS und Zetapotentialmessung charakterisiert.

Auch wenn anhand der DLS Auswertung der Ultraschalltipbehandlung in der Abbildung 27 kein Unterschied hinsichtlich der Aggregatgröße zwischen den einzelnen Gruppen ausgemacht werden konnte, wurde in den nachfolgenden Versuchen mit weiteren 2 min Ultraschalltip gearbeitet. Diese Art der Beschichtung wurde anschließend mit allen vier TiO₂ Proben für die Dopaminkonzentrationen 0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,6 mg/ml und 1 mg/ml durchgeführt und charakterisiert.

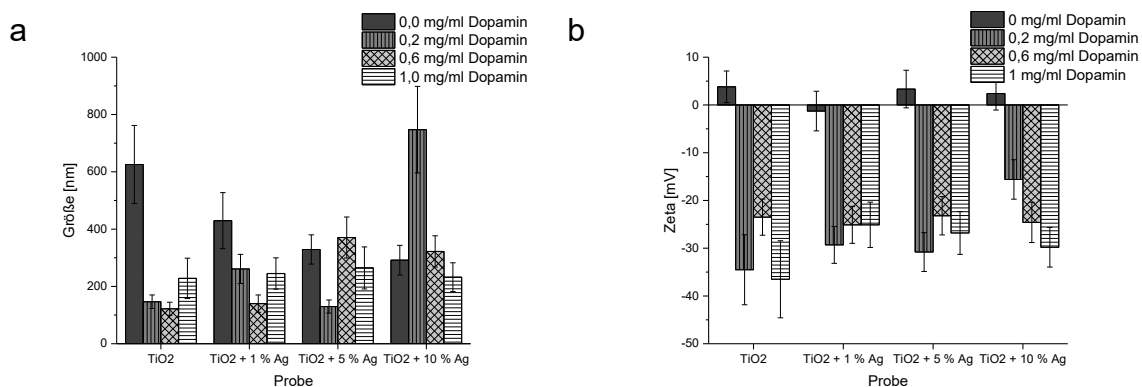


Abbildung 28: Gegenüberstellung von Größe (a) und Zetapotential (b) nach Beschichtung mit Dopamin.

Die Partikel mit einer Konzentration von 0,26 mg/ml wurden mit 10 mM Tris Base gelöst und anschließend für 2 min mit Ultraschalltip behandelt. Nach der Zugabe von unterschiedlichen Dopaminkonzentrationen wurden die Proben nach weiteren 2 min Ultraschalltipbehandlung via DLS und Zetapotentialmessung charakterisiert.

Wie man anhand der Graphen erkennen kann, ist nach der DLS Messung keine eindeutige Dopaminkonzentration hervorzuheben. Während bei Probe TiO₂ und TiO₂ + 1 % Ag die Zugabe von 0,6 mg/ml Dopamin die geringsten Partikelgrößen zur Folge hatte, waren es bei den beiden letzten Proben 0,2 mg/ml und 1 mg/ml Dopamin. Bei Betrachtung des Zetapotentials konnte keine eindeutige Favorisierung festgestellt werden. Es war lediglich ein deutlicher Unterschied zu den unbeschichteten Nanopartikeln (0 mg/ml Dopamin) erkennbar, wo sich das Zetapotential um den Wert 0 mV einpendelte.

Anschließend erfolgten SEM-Aufnahmen von allen beschichteten Proben.

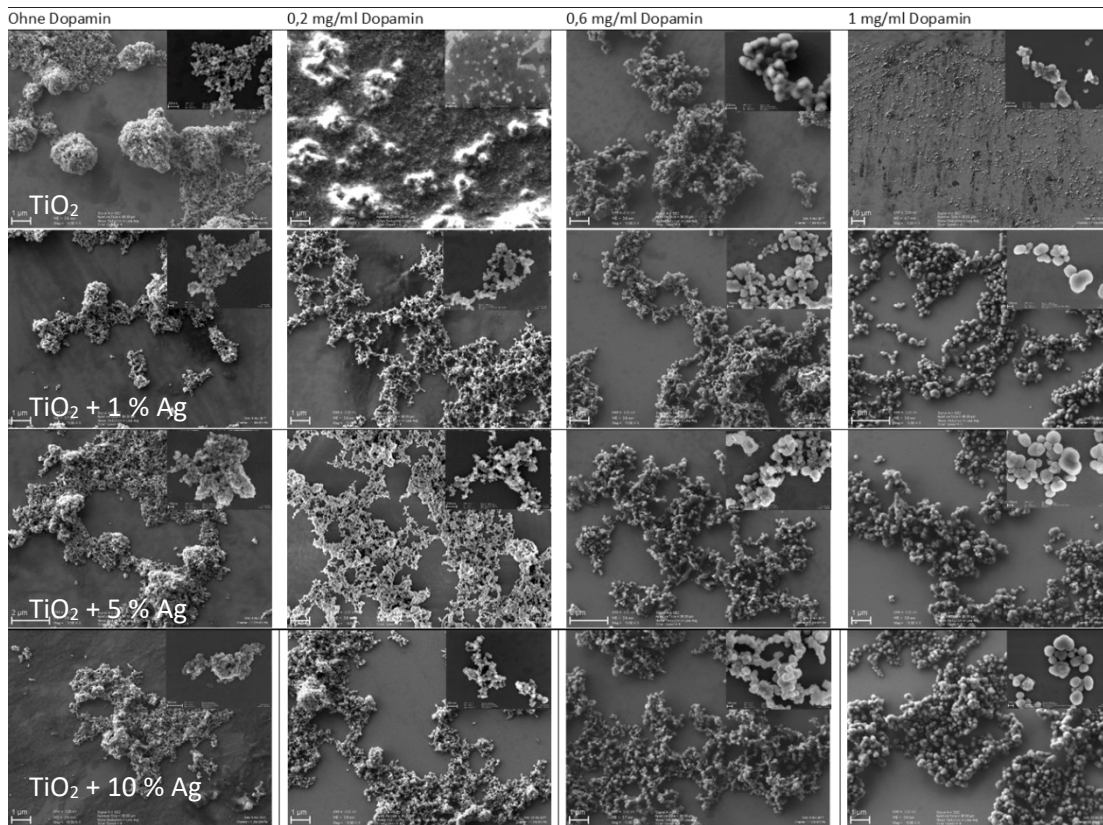


Abbildung 29: SEM Aufnahmen von allen PDA-Beschichtungen der TiO₂ Proben mit unterschiedlicher Dopaminkonzentration.

Wie man an Abbildung 29 erkennen kann, nahm die Größe der Agglomerate mit zunehmender Dopaminkonzentration zu. Allerdings lässt eine SEM Aufnahme keine Differenzierung der Oberflächenzusammensetzung zu, ob es sich hierbei um ein PDA-Beschichtung handelte oder ob die Partikel selbst Agglomerate bildeten. Aus diesem Grund wurden anschließend STEM Aufnahmen durchgeführt. Dadurch, dass sich der Detektor unterhalb der Probe befindet, besteht die Möglichkeit, unterschiedliche Strukturen innerhalb der Oberflächen zu deuten.

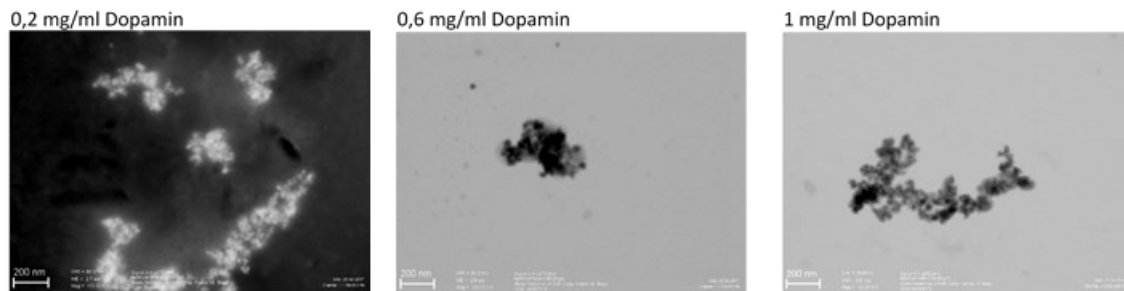


Abbildung 30: STEM-Aufnahme von PDA beschichteten TiO_2 Nanopartikeln mit 0,2 mg/ml, 0,6 mg/ml und 1 mg/ml Dopamin.

Wie hier vor allem bei 0,6 mg/ml und 1 mg/ml Dopamin zu erkennen ist, bildete sich um die Partikel jeweils ein heller Saum. Es war davon auszugehen, dass es sich hierbei um die PDA-Beschichtung handelte. Allerdings ergab sich auch hier kein großer Unterschied hinsichtlich des Saumdurchmessers zwischen den einzelnen Dopaminkonzentrationen.

Da bei der Partikelgröße (s. Abbildung 28) allerdings die 0,6 mg/ml Dopaminzugabe den übrigen Konzentrationen leicht überlegen war und auch in den anderen Charakterisierungen als gut abschnitt, wurde eine Stocksolution mit eben dieser Konzentration hergestellt und auch noch einmal mithilfe des FT IR hinsichtlich ihrer Molekülzusammensetzung charakterisiert.

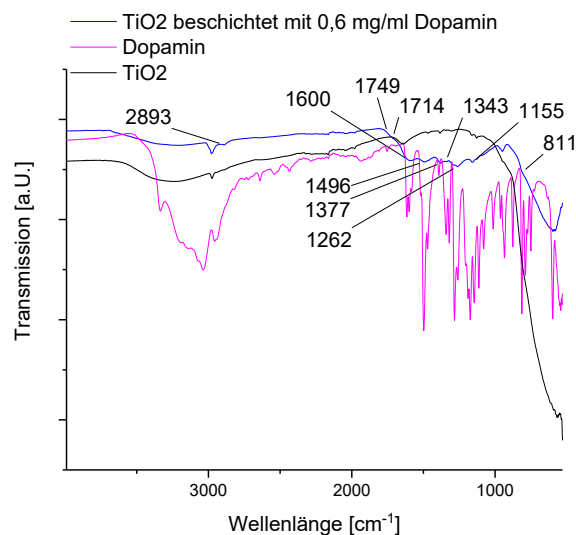


Abbildung 31: FT IR Charakterisierung der PDA-Beschichtung mit 0,6 mg/ml Dopamin (anhand TiO_2).

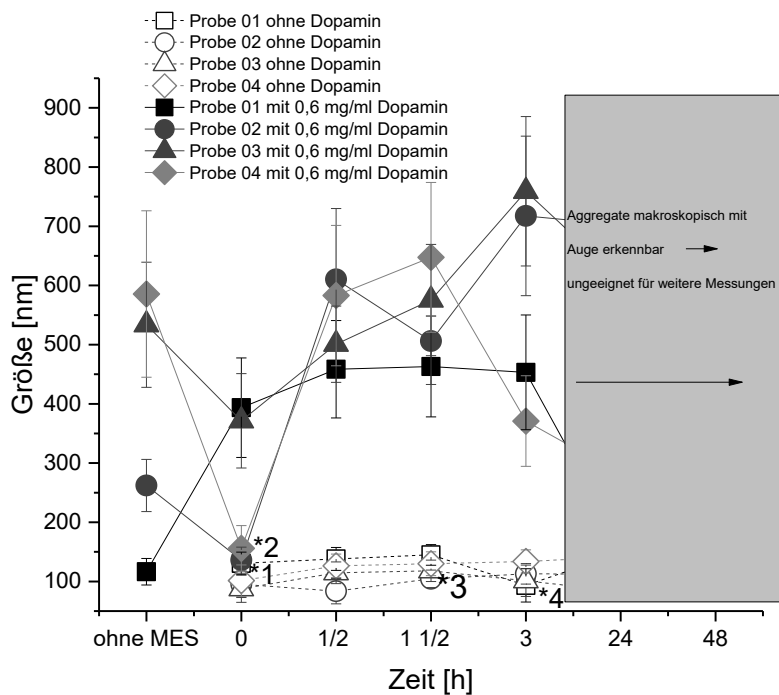
Tabelle 20: Zuordnung der Peaks zu Wellenlängen und anschließende Interpretation (Dopamin).

Wellenlänge [cm^{-1}]	Zuordnung
2893w	$\nu(\text{C-H})$
1749, 1714sh	$\nu(\text{C=O})$
1600br, 1496	$\nu_{\text{ring}}(\text{C=C}), \nu_{\text{ring}}(\text{C=N})$
1377sh, 1343sh, 1262	$\nu_{\text{ring}}(\text{CNC})$
1155	$\nu(\text{CN})$
811w	$\nu(\text{C=C})$
1700-1000	Aromatische sp^2 C-H

Durch die Betrachtung der Abbildung 31 und die dazugehörige Interpretation in Tabelle 20 konnte eindeutig die erfolgreiche Beschichtung der Nanopartikel durch diverse Molekülbindungen bewiesen werden.

3.1.5.4 Abbaustudie von PDA-Beschichtung bei pH 5

Um das spätere Verhalten der PDA-Beschichtung in den Lysozymen zu simulieren, wurden die beschichteten Nanopartikel in MES-Puffer mit pH 5, dem vorherrschenden pH-Wert in den Lysozymen, gelöst und innerhalb einer Zeitspanne von 46 h sechsmal gemessen.



- *1 P 02 mit 66 µl Dopamin: peak 1: 450,3 nm St. Dev. 119,9 (7,1 %)
- *2 P 04 mit 66 µl Dopamin: peak 1: 440 nm St. Dev. 120,7 (13,6 %)
- *3 P 02 ohne Dopamin peak 1: 226,5 nm St. Dev. 42,83 (33,7 %)
- *4 P 01 ohne Dopamin peak 2: 129,4 nm St. Dev. 18,68 (35,7 %)

Abbildung 32: Abbaustudie von PDA-Beschichtung bei einem pH-Wert von 5.

Sowohl unbeschichtete Partikel als auch Partikel, welche gemäß 2.3.5.3 mit Dopamin beschichtet wurden, wurden unter Zugabe von MES-Puffer mit pH 5 innerhalb einer Zeitspanne von 48 h via DLS hinsichtlich ihrer Partikelgröße charakterisiert.

In der Abbildung 32 ist der zeitliche Verlauf der Partikelgröße nach der Zugabe von MES-Puffer abgebildet. Zunächst wurden die Nanopartikelgrößen der beschichteten Proben ohne MES-Puffer bestimmt (Gruppe 3). Anschließend wurde der Puffer hinzugegeben und direkt mittels DLS-Messung als Zeitpunkt „0 h“ charakterisiert. Hierbei fällt auf, dass die unbeschichteten Proben (ohne Dopamin) höhere Ausgangswerte hinsichtlich der Partikelgröße besaßen, als die beschichteten. Nach den weiteren Messungen nach 0,5 h, 1,5 h und 3 h ist deutlich zu erkennen, dass die Proben mit den unbeschichteten Nanopartikeln bei einem relativ konstanten Wert um die 100 nm lagen. Die mit Dopamin beschichteten Partikel hingegen bildeten Agglomerate und führten hierdurch zu einem stetigen Anstieg der Partikelgröße. Nach 24 h und 48 h waren schließlich mit bloßem Auge

Aggregate erkennbar, so dass keine weiteren geeigneten Messungen mehr mit dem DLS durchgeführt werden konnten.

3.1.6 Funktionalisierung mit Polymeren

3.1.6.1 Polymerbeschichtung mit PEG-SH und Einfluss von Polymerkonzentration

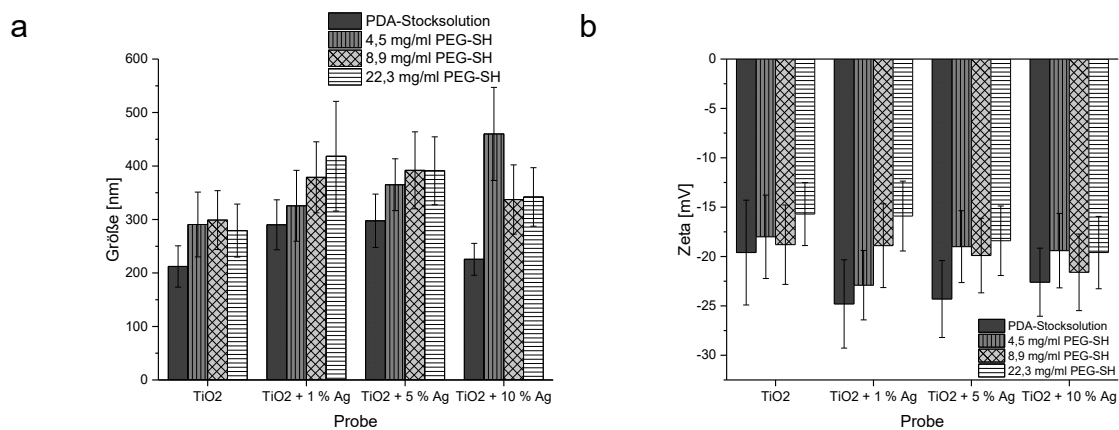


Abbildung 33: Charakterisierung der Polymerfunktionalisierung mit PEG-SH.

1 mg/ml PDA beschichteter Partikel wurden mit 1 mg/ml TCEP und 1 ml Boratpuffer mit pH 8 gelöst und unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an PEG-SH für 22 h auf dem Magnetrührer gerührt. Die Charakterisierung erfolgte mittels DLS und Zetapotentialmessung; **a** Größe; **b** Zetapotential.

In Abbildung 33 a ist eine Gegenüberstellung der Partikelgröße nach der Polymerfunktionalisierung mit PEG-SH aufgezeigt. Alle Partikel, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an PEG-SH beschichtet wurden, waren hierbei größer als die PDA-Stocklösung. 4,5 mg/ml PEG-SH zeigte hier, abgesehen von der TiO₂ + 10 % Ag Probe, die geringste Partikelgröße nach Beschichtung auf und wurde aus diesem Grund für die Herstellung der PEG-SH-Stocklösung für nachfolgende Zellversuche verwendet. In Abbildung 33 b ist der Vergleich des Zetapotentials beleuchtet. Die PDA-Stocklösung zeigte hier bei allen Proben die negativsten Werte auf. Die mit PEG-SH beschichteten Proben wiesen auch keinen deutlichen Ladungsverlust auf, so dass mit der Konzentration von 4,5 mg/ml PEG-SH weitergearbeitet werden konnte.

Anschließend wurden die Proben mithilfe des FT IR hinsichtlich der Molekülzusammensetzung charakterisiert.

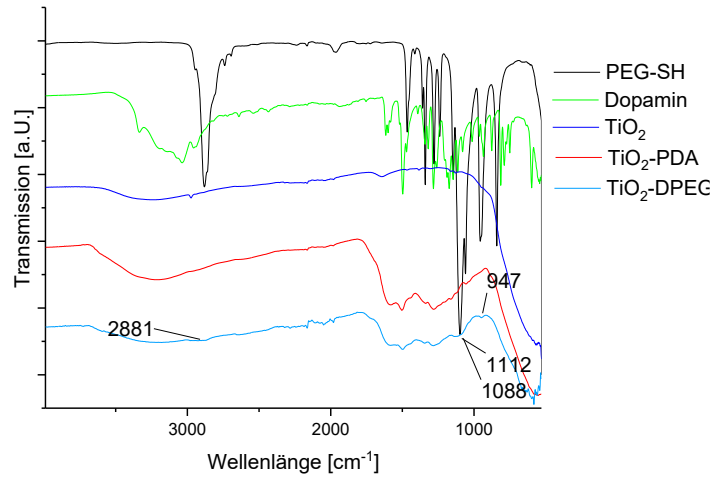


Abbildung 34: FT IR Charakterisierung der PEG-SH-Beschichtung (anhand TiO₂).

Tabelle 21: Zuordnung der Peaks zu Wellenlängen und anschließende Interpretation (PEG-SH).

Wellenlänge [cm ⁻¹]	Zuordnung
2881w	vCH ₂
1112	vC-O-C
1088sh	vC-O
947	vCH
absence of thiol @ 2660	v(CN)

Wie anhand von Abbildung 34 und der dazugehörigen Interpretation in Tabelle 21 zu erkennen ist, wurde anhand der FT IR-Messung die erfolgreiche Beschichtung bewiesen.

3.1.6.2 Polymerbeschichtung mit PMO_x-SH

Nach 22 h auf dem Magnetrührer war mit bloßem Auge deutlich zu erkennen, dass die Beschichtung mit PMO_x-SH aufgrund von nicht gelösten Agglomeraten nicht funktionierte. Dementsprechend wurden die Proben nicht weiter analysiert.

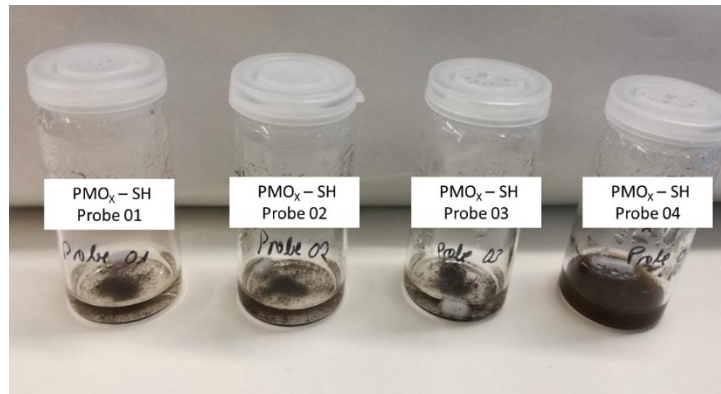


Abbildung 35: PMO_x-SH Proben nach 22h auf dem Magnetrührer.

Deutliche Agglomeratbildung erkennbar. 1 mg/ml PDA beschichtete Partikel wurden mit 1 mg/ml TCEP und 1 ml Boratpuffer mit pH 8 gelöst und unter Zugabe von 4,5 mg/ml PMO_x-SH für 22 h auf dem Magnetrührer gerührt.

3.1.6.3 Polymerbeschichtung mit PG-SH

Nach 22 h auf dem Magnetrührer war mit bloßem Auge deutlich zu erkennen, dass die Beschichtung mit PG-SH aufgrund von nicht gelösten Agglomeraten nicht funktionierte. Dementsprechend wurden die Proben nicht weiter analysiert.

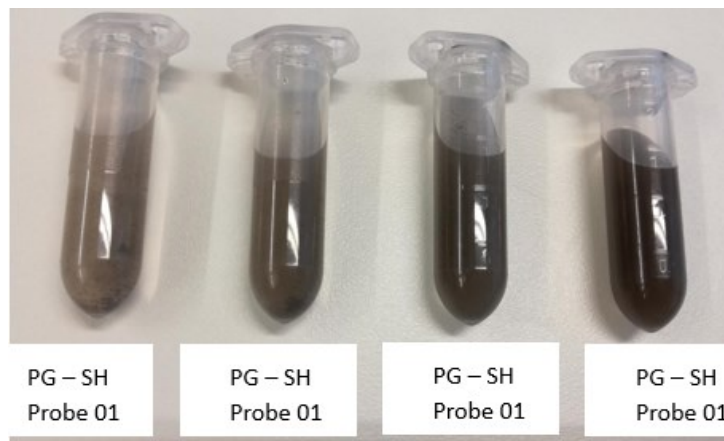


Abbildung 36: PG-SH Proben nach 22 h auf dem Magnetrührer.

Deutliche Agglomeratbildung erkennbar. 1 mg/ml PDA beschichtete Partikel wurden mit 1 mg/ml TCEP und 1 ml Boratpuffer mit pH 8 gelöst und unter Zugabe von 4,5 mg/ml PG-SH für 22 h auf dem Magnetrührer gerührt.

3.1.7 Einfluss von PBS mit pH 7 auf (un-)beschichtete Partikel

Da die Partikel für nachfolgende Zellversuche in der Pufferlösung PBS gelöst wurden, wurde die Auswirkung von PBS bei einem pH-Wert von 7 auf die unbeschichtete und mit APTES, PDA und PEG-SH beschichtete Partikel überprüft. Anhand von Abbildung 37 ist zu erkennen, dass die Partikel alle im Zeitraum von 48 h ihre Partikelgröße beibehalten. Die einzige Ausnahme bildeten PEG-SH beschichtete Nanopartikel nach 48 h. Hier stieg der Wert von ca. 500 nm auf ca. 1000 nm an.

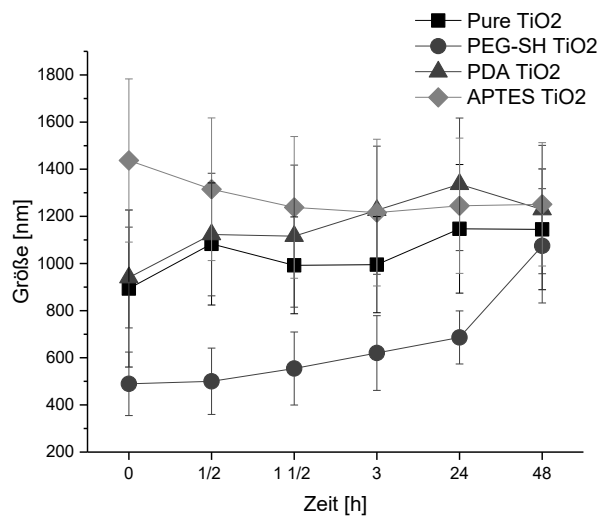


Abbildung 37: Einfluss von PBS mit pH 7 auf (un-)beschichtete TiO₂ Nanopartikel im zeitlichen Verlauf von 48 h.

Die Partikel der Probe 01 wurden gemäß der optimalen Beschichtungsverfahren mit APTES, PEG-SH und PDA beschichtet, mit PBS mit pH 7 gelöst und innerhalb von 48 h sechsmal via DLS charakterisiert. Die Referenzprobe entsprach den unbeschichteten TiO₂ Nanopartikeln unter PBS mit pH 7.

3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Kontrolle der Nanopartikelaggregate

In nachfolgender Tabelle 22 wurden alle Ergebnisse zur Kontrolle der Nanopartikelaggregate unter den verschiedenen Einflüssen wie Ultraschall, Nanopartikelkonzentration, Salzzugabe und Citratzugabe unter der Zugabe von H₂O und Tris Base (pH 8) zusammengefasst.

Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aufspaltung der Nanopartikelaggregate.

	Größe [nm]	SD [nm]	Größe zweiter Peak [nm]	SD [nm]	PDI
Pure NP (Abb. 13 a + b)					
TiO ₂	543	165	169	26	0,63
TiO ₂ + 1 %	100	29			0,47
TiO ₂ + 5 %	237	57	99	20	0,50
TiO ₂ + 10 %	85	18	243	70	0,42
NP nach Ultraschallbadbehandlung (Abb. 13 a)					
30 min					
TiO ₂	688	97	1003	165	0,78
TiO ₂ + 1 %	459	98	151	26	0,59
TiO ₂ + 5 %	102	30			0,50
TiO ₂ + 10 %	95	24			0,55
1 h					
TiO ₂	845	326			0,60
TiO ₂ + 1 %	85	21			0,47
TiO ₂ + 5 %	100	26			0,59
TiO ₂ + 10 %	88	22			0,49
2 h					
TiO ₂	591	88	125	22	0,88
TiO ₂ + 1 %	104	26			0,44
TiO ₂ + 5 %	106	32			0,57
TiO ₂ + 10 %	118	48			0,50
NP nach Ultraschalltipbehandlung (Abb. 13 b)					
2 min					
TiO ₂	95	24			0,63
TiO ₂ + 1 %	77	22			0,45
TiO ₂ + 5 %	83	31			0,49
TiO ₂ + 10 %	101	38			0,44
5 min					
TiO ₂	81	22			0,66
TiO ₂ + 1 %	97	26			0,51
TiO ₂ + 5 %	68	16	44	6	0,42
TiO ₂ + 10 %	136	79			0,37
10 min					
TiO ₂	85	23			0,61
TiO ₂ + 1 %	87	26			0,51
TiO ₂ + 5 %	90	30			0,41
TiO ₂ + 10 %	144	50			0,40
Verschiedene Konzentrationen ohne Ultraschalltipbehandlung (Abb. 14 a)					
0,13 mg/ml NP					
TiO ₂	544	165	169	26	0,63
TiO ₂ + 1 %	100	29			0,47
TiO ₂ + 5 %	237	56	99	20	0,50
TiO ₂ + 10 %	85	18	243	70	0,42

0,065 mg/ml NP					
TiO ₂	223	26	476	104	0,81
TiO ₂ + 1 %	153	20	360	62	0,86
TiO ₂ + 5 %	397	79			0,61
TiO ₂ + 10 %	104	38			0,50
0,0325 mg/ml NP					
TiO ₂	328	47	27	3,37	0,95
TiO ₂ + 1 %	72	9	427	86	0,81
TiO ₂ + 5 %	145	30	327	66	0,63
TiO ₂ + 10 %	97	12	256	39	0,91
0,01625 mg/ml NP					
TiO ₂	48	6	194	22	1,00
TiO ₂ + 1 %	221	23			1,00
TiO ₂ + 5 %	306	73			0,76
TiO ₂ + 10 %	106	11	278	43	0,88
Verschiedene Konzentrationen nach 2 min Ultraschalltipbehandlung (Abb. 14 b)					
0,13 mg/ml NP					
TiO ₂	95	24			0,63
TiO ₂ + 1 %	77	22			0,45
TiO ₂ + 5 %	83	31			0,49
TiO ₂ + 10 %	101	38			0,44
0,065 mg/ml NP					
TiO ₂	108	26			0,57
TiO ₂ + 1 %	174	31			0,71
TiO ₂ + 5 %	101	18	388	98	0,50
TiO ₂ + 10 %	92	17	304	80	0,44
0,0325 mg/ml NP					
TiO ₂	72	14			0,55
TiO ₂ + 1 %	63	11	165	23	0,65
TiO ₂ + 5 %	58	8	98	30	0,42
TiO ₂ + 10 %	163	21			0,73
0,01625 mg/ml NP					
TiO ₂	90	15	172	28	0,66
TiO ₂ + 1 %	129	24			0,89
TiO ₂ + 5 %	128	17			0,93
TiO ₂ + 10 %	127	21			0,72

	Größe [nm]	SD [nm]	Größe zweiter Peak [nm]	SD [nm]	PDI	Zeta-Potential [mV]	SD [mV]
Gegenüberstellung der kleinsten Partikelgrößen für jedes Salz (Abb. 15 a)							
0,1 mM KCl (pH 7,4)	48	12	198	47	0,67		
10 mM KSCN (pH 7,4)	79	17	361	90	0,53		
1 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)	67	16	308	99	0,53		
1 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7,4)	62	14	224	81	0,57		
0,01 mM K ₃ Fe(CN) ₆ (pH 10,3)	54	14	223	71	0,59		

0,1 mM K₄Fe(CN)₆ (pH 10,3)	31	4	142	22	0,91		
Gegenüberstellung der kleinsten Partikelgröße für jeden pH-Wert (Abb. 15 b)							
1 mM KCl (pH 2)	151	22			0,72		
0,1 mM KCl (pH 7,4)	48	12			0,67		
0,1 mM K₄Fe(CN)₆ (pH 10,3)	31	4	142	22	0,76		
Einfluss von 0,1 mM KCl auf Größe und Zetapotential aller vier Proben bei verschiedenen pH -Werten (Abb. 16 a)							
pH 2							
TiO ₂	140	21			0,92		
TiO ₂ + 1 %	477	98			0,54		
TiO ₂ + 5 %	244	56			0,84		
TiO ₂ + 10 %	267	58			0,77		
pH 7,4							
TiO ₂	48	12			0,67		
TiO ₂ + 1 %	83	11			0,84		
TiO ₂ + 5 %	107	19			0,54		
TiO ₂ + 10 %	59	18			0,37		
pH 10,3							
TiO ₂	116	21			0,92		
TiO ₂ + 1 %	92	14	37	5	0,62		
TiO ₂ + 5 %	48	18			0,41		
TiO ₂ + 10 %	112	24			0,49		
Gegenüberstellung der Partikelgröße bei den Citratkonzentrationen 100mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM bei verschiedenen pH-Werten (Abb. 17a)							
pH 2							
100 mM	458	125			0,58		
10 mM	62	11			0,60		
1 mM	261	36			0,92		
0,1 mM	75	15			0,63		
0,01 mM	49	9			0,68		
pH 7,4							
100 mM	436	114			0,60		
10 mM	154	23			0,81		
1 mM	148	23			0,74		
0,1 mM	86	12	140	23	0,89		
0,01 mM	51	10			0,62		
pH 10,3							
100 mM	421	93			0,63		
10 mM	102	18			0,98		
1 mM	67	14			0,60		
0,1 mM	105	14	148	22	0,92		
0,01 mM	56	12			0,61		
Zetapotential bei einer Citratkonzentration von 0,01 mM Citrat							
pH 2						18,4	8,58
pH 7,4						-27,4	3,73
pH 10,3						-28,7	6,31

	Größe [nm]	SD [nm]	Größe zweiter Peak [nm]	SD [nm]	PDI
NP nach Ultraschalltipbehandlung und verschiedenen Konzentrationen unter Tris Base (pH 8) (Abb.26)					
0 min					
0,0625 mg/ml NP	278	45			0,77
0,13 mg/ml NP	111	22			0,48
0,26 mg/ml NP	190	44			0,55
2 min					
0,0625 mg/ml NP	81	15			0,50
0,13 mg/ml NP	84	17			0,45
0,26 mg/ml NP	86	19			0,58
5 min					
0,0625 mg/ml NP	63	13			0,46
0,13 mg/ml NP	70	16			0,49
0,26 mg/ml NP	82	17			0,51
10 min					
0,0625 mg/ml NP	50	9,	33	4	0,54
0,13 mg/ml NP	69	17			0,43
0,26 mg/ml NP	73	17			0,47

3.1.9 Ergebnisse Zellversuche

Um den Einfluss von beschichteten und unbeschichteten TiO₂ Nanopartikeln mit steigendem Silberanteil auf die Zellen zu untersuchen, wurden Splenozyten, mit LPS stimulierte Splenozyten sowie die Tumorzelllinien Panc02 und MOPC Zellen für 24 h mit den Partikeln inkubiert. Für die Überprüfung ihrer Vitalität und Zellzahl wurden die Zellen mit Zombie Aqua™ Fixable (Viability Kit) gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.1.9.1 Auswirkung von unbeschichteten TiO₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen

In Abbildung 38 ist der Einfluss von unbeschichteten TiO₂ auf die Zellen dargestellt.

Die Vitalität der Splenozyten unterschied sich durch die Behandlung mit unbeschichteten Partikeln im Vergleich zum Referenzwert ohne Partikelzugabe (Konzentration 0 µg/ml) nicht (Abbildung 38 A₁). Auch bei den mit LPS stimulierten Splenozyten sank die Vitalität infolge der Partikelzugabe nicht (Abbildung 38 B₁). Die unbeschichteten Partikel zeigten ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Tumorzelllinien Panc02 (Abbildung 38 C₁) und MOPC (Abbildung 38 D₁).

Die Zellzahl wies bei den Splenozyten keinen Unterschied zwischen den mit Partikeln inkubierten und den unbehandelten Zellen (Abbildung 38 A₂) auf. Bei den mit LPS stimulierten Splenozyten (Abbildung 38 B₂) sowie den Panc02 Zellen (Abbildung 38 C₂) und MOPC Zellen (Abbildung 38 D₂) gab es keinen negativen Einfluss auf die Zellzahl.

Der steigende Silberanteil von 1 % bis 10 % in den Proben zeigte auch keine Auswirkung auf die Vitalität oder Zellzahl.

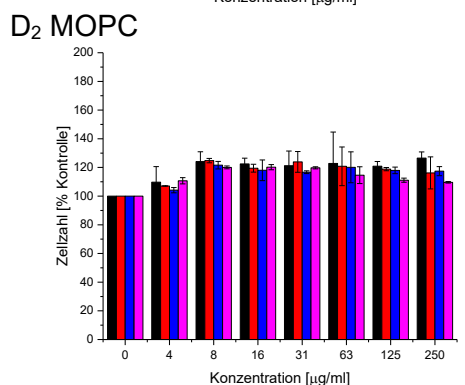
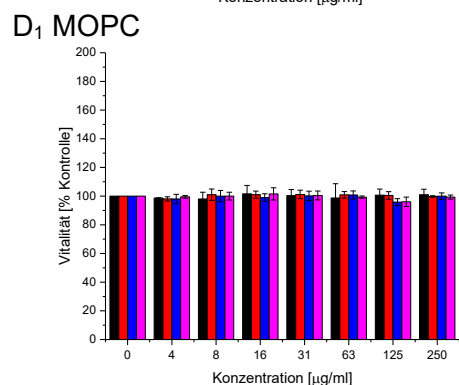
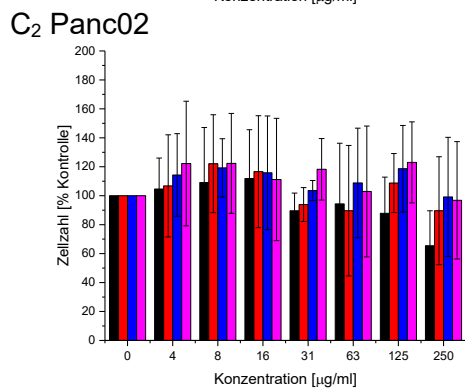
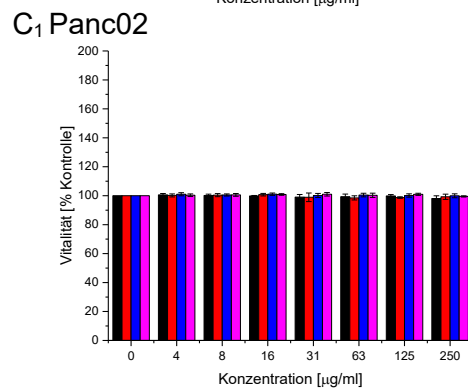
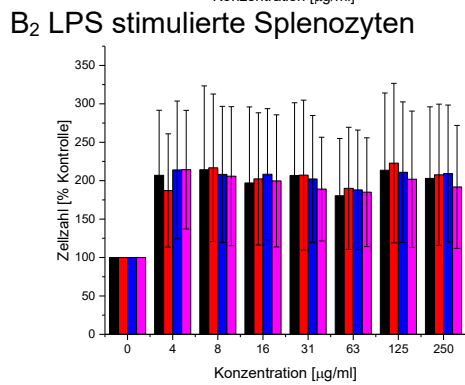
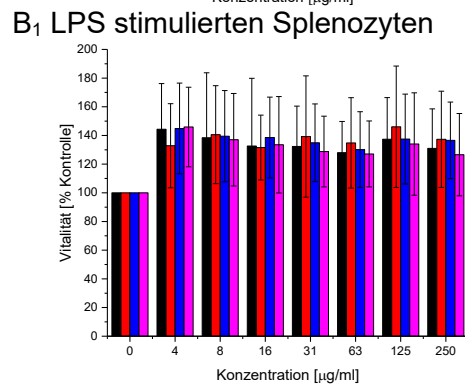
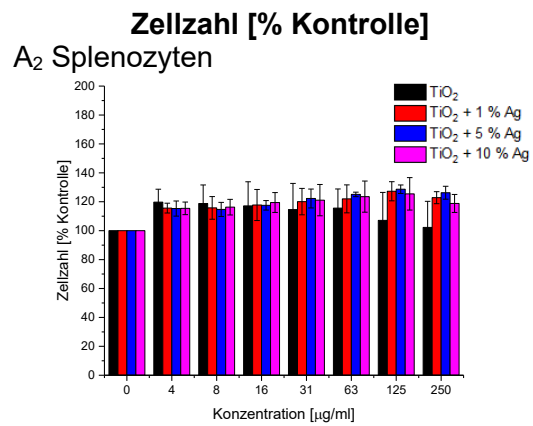
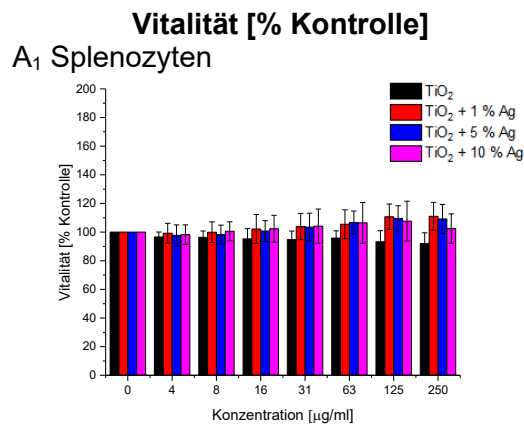


Abbildung 38: Auswirkung von unbeschichteten TiO₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.

Splenozyten, LPS stimulierte Splenozyten (14 - 20 Wochen alte, weibliche B57BL/6 Mäuse), Panc02 und MOPC Zellen wurden 24 h mit unbeschichteten NP mit steigendem Silberanteil inkubiert und anschließend lebend/tot gefärbt (n = 3). Die Messung erfolgte mit Durchflusszytometrie.

3.1.9.2 Auswirkung von PEG-SH beschichteten TiO₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen

Die Einflüsse von PEG beschichteten TiO₂ Nanopartikeln mit steigendem Silberanteil sind in Abbildung 39 dargestellt.

Bei den Splenozyten, den mit LPS stimulierten Splenozyten sowie den Tumorzelllinien Panc02 und MOPC Zellen änderte sich die Vitalität der Zellen durch die Zugabe von PEG-SH beschichteten Partikel nicht (Abbildung 38 A1 – D1).

Die PEG-SH beschichteten TiO₂ Nanopartikel zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Zellzahl (Abbildung 39 A2 – D2).

Auch der steigende Silberanteil wirkte sich nicht auf die Vitalität oder Zellzahl aus.

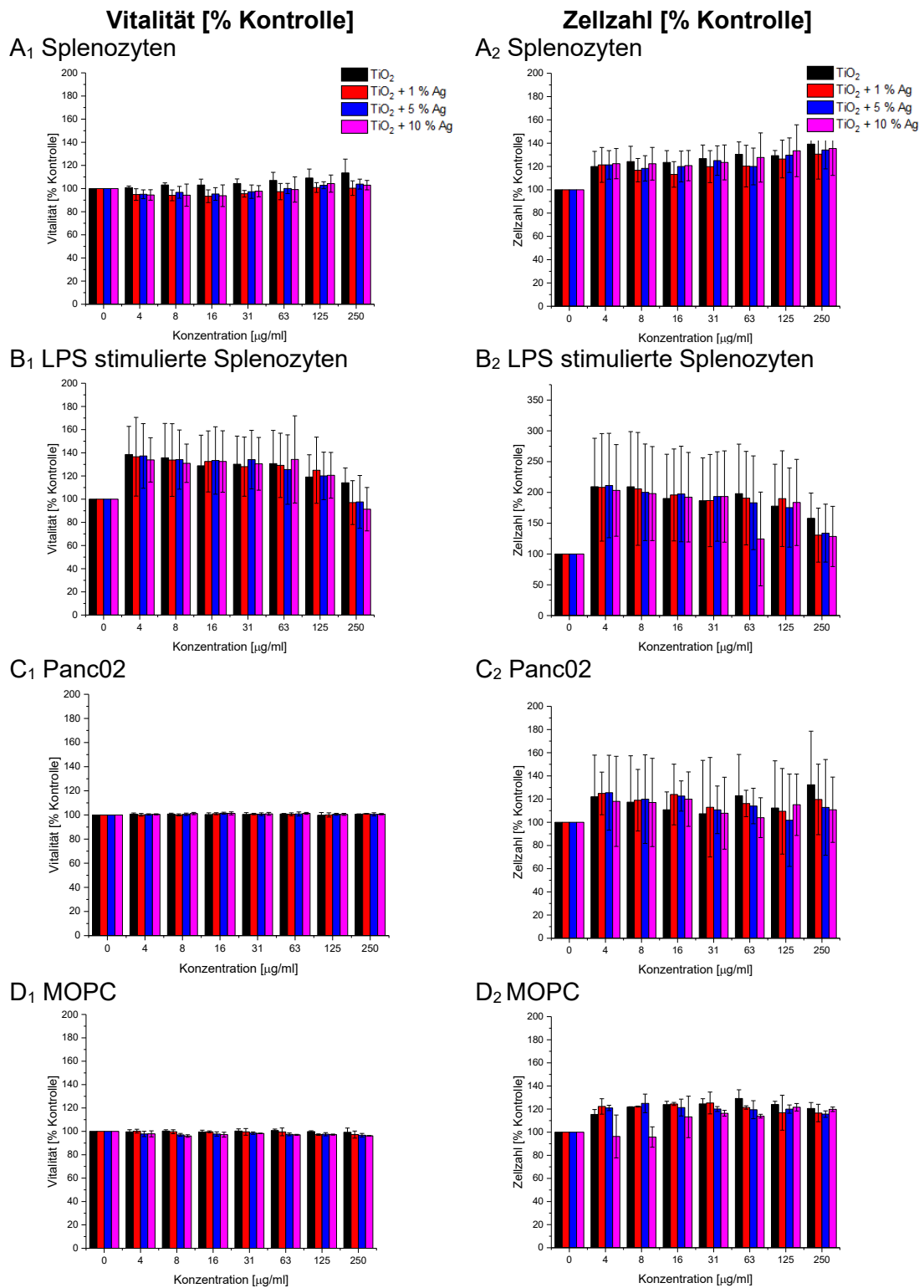


Abbildung 39: Auswirkung von PEG-SH beschichteten TiO₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.

Splenozyten, LPS stimulierte Splenozyten (14 - 20 Wochen alte, weibliche B57BL/6 Mäuse), Panc02 und MOPC Zellen wurden 24 h mit PEG beschichteten NP mit steigendem Silberanteil inkubiert und anschließend lebend/tot gefärbt (n = 3). Die Messung erfolgte mit Durchflusszytometrie.

3.1.9.3 Auswirkung von PDA beschichteten TiO₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen

Die Auswirkungen der PDA beschichteten TiO₂ Nanopartikel auf die Zellen sind in Abbildung 40 dargestellt.

Unter dem Einfluss der Partikel änderte sich die Vitalität. Bei den Splenozyten sank die Vitalität ab einer Konzentration von 125 µg/ml PDA beschichteter TiO₂ Nanopartikel (Abbildung 40 A₁). Während die Vitalität bei den PDA beschichteten TiO₂ Nanopartikeln mit 5 % Ag und 10 % Ag geringfügig sank, waren es bei einer Partikelkonzentration von 250 µg/ml sowie einem Silberanteil von 5 % und 10 % Verluste von über 50 %. Bei den LPS stimulierten Splenozyten, Panc02 und MOPC Zellen war keine Auswirkung der Partikel auf die Vitalität zu erkennen (Abbildung 40 B1 – D1).

Die Zellzahl der Splenozyten sank ab einer TiO₂ Nanopartikelkonzentration von 250 µg/ml (Abbildung 40 A2). LPS stimulierte Splenozyten wiesen dagegen keine Veränderungen auf (Abbildung 40 B2). Bei den Panc02 sank die Zellzahl ab einer TiO₂ Nanopartikelkonzentration von 125 µg/ml Zellen (Abbildung 40 C2). Größte Auswirkungen lieferten sowohl bei einer Konzentration von 125 µg/ml als auch 250 µg/ml die TiO₂ Partikel mit einem Silberanteil von 10 %. Die Zellzahl, der mit Partikel inkubierten MOPC Zellen, veränderte sich hingegen nicht (Abbildung 40 D2).

Einen Einfluss auf die Vitalität oder Zellzahl zeigte der Silberanteil. Die Partikel mit 0 % Silberanteil wirkten sich, abgesehen von einer TiO₂ Konzentration von 125 µg/ml auf Panc02 Zellen, weder auf die Zellzahl noch auf die Vitalität aus. Ab einem Silberanteil von 5 % sanken dagegen sowohl bei den Splenozyten als auch den Panc02 Zellen beide Parameter.

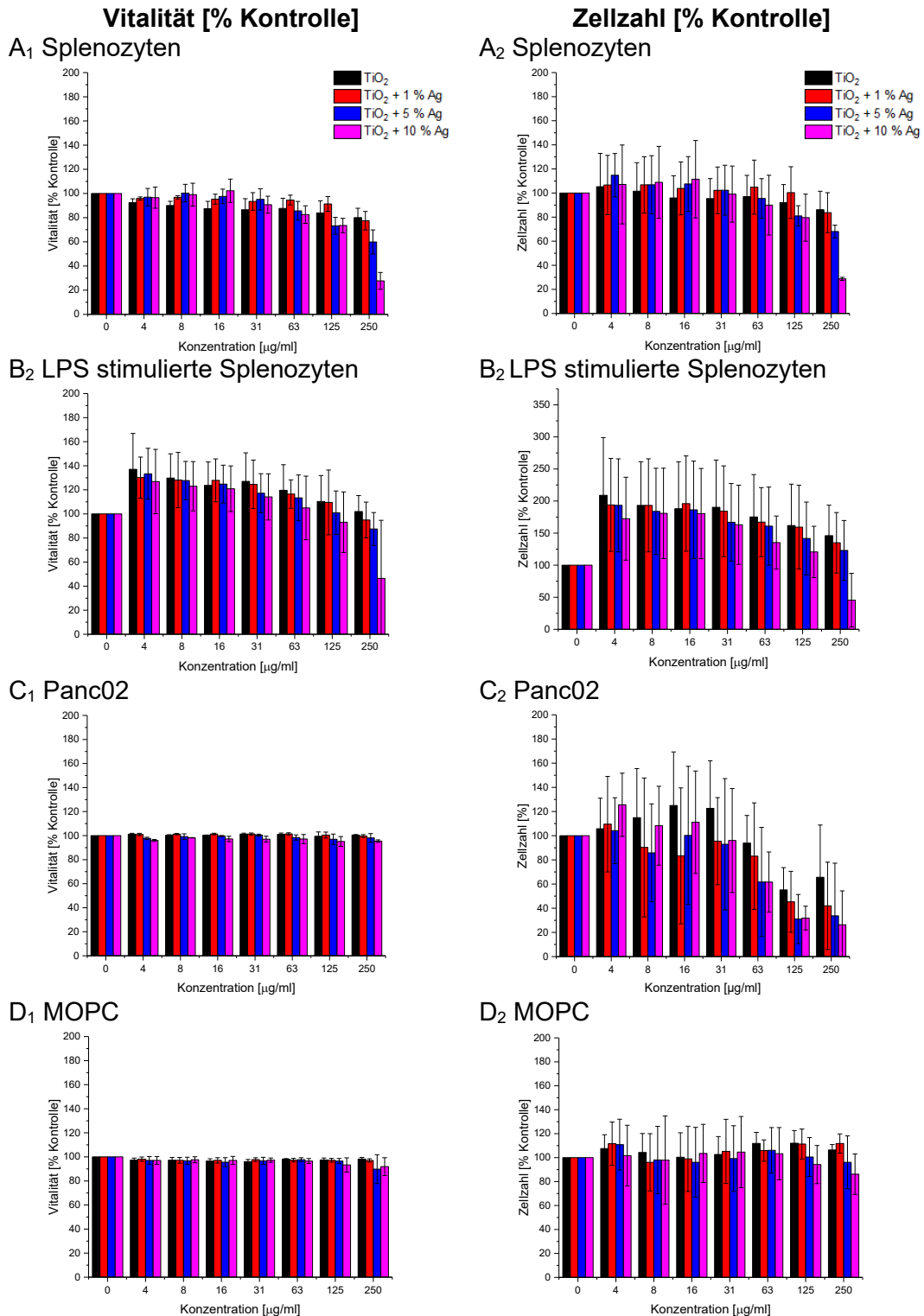


Abbildung 40: Auswirkung von PDA beschichteten TiO₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.

Splenozyten, LPS stimulierte Splenozyten (14 - 20 Wochen alte, weibliche B57BL/6 Mäuse), Panc02 und MOPC Zellen wurden 24 h mit PDA beschichteten NP mit steigendem Silberanteil inkubiert und anschließend lebend/tot gefärbt (n = 3). Die Messung erfolgte mit Durchflusszytometrie.

3.1.9.4 Auswirkung von APTES beschichteten TiO₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen

In Abbildung 41 ist die Auswirkung von APTES beschichteten TiO₂ Nanopartikeln auf die verschiedenen Zellen dargestellt. Die Vitalität änderte sich durch die APTES beschichteten Partikel weder bei den Splenozyten, den LPS stimulierten Splenozyten, noch bei den Panc02 und MOPC Zellen (Abbildung 41 A1 – D1). Auch die Zellzahl blieb bei den Splenozyten (Abbildung 41 A2) und den LPS stimulierten Splenozyten nach der Inkubation mit APTES beschichteten Partikeln gleich (Abbildung 41 B2). Durch die Behandlung der Panc02 Zellen mit den beschichteten TiO₂ Partikeln in einer Konzentration von 250 µg/ml, verringerte sich die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 40 C2). Auf die MOPC Zellen zeigten die APTES beschichteten Partikel keinen Effekt (Abbildung 40 D2). Der steigende Silberanteil hatte keine Auswirkung auf Vitalität und Zellzahl.

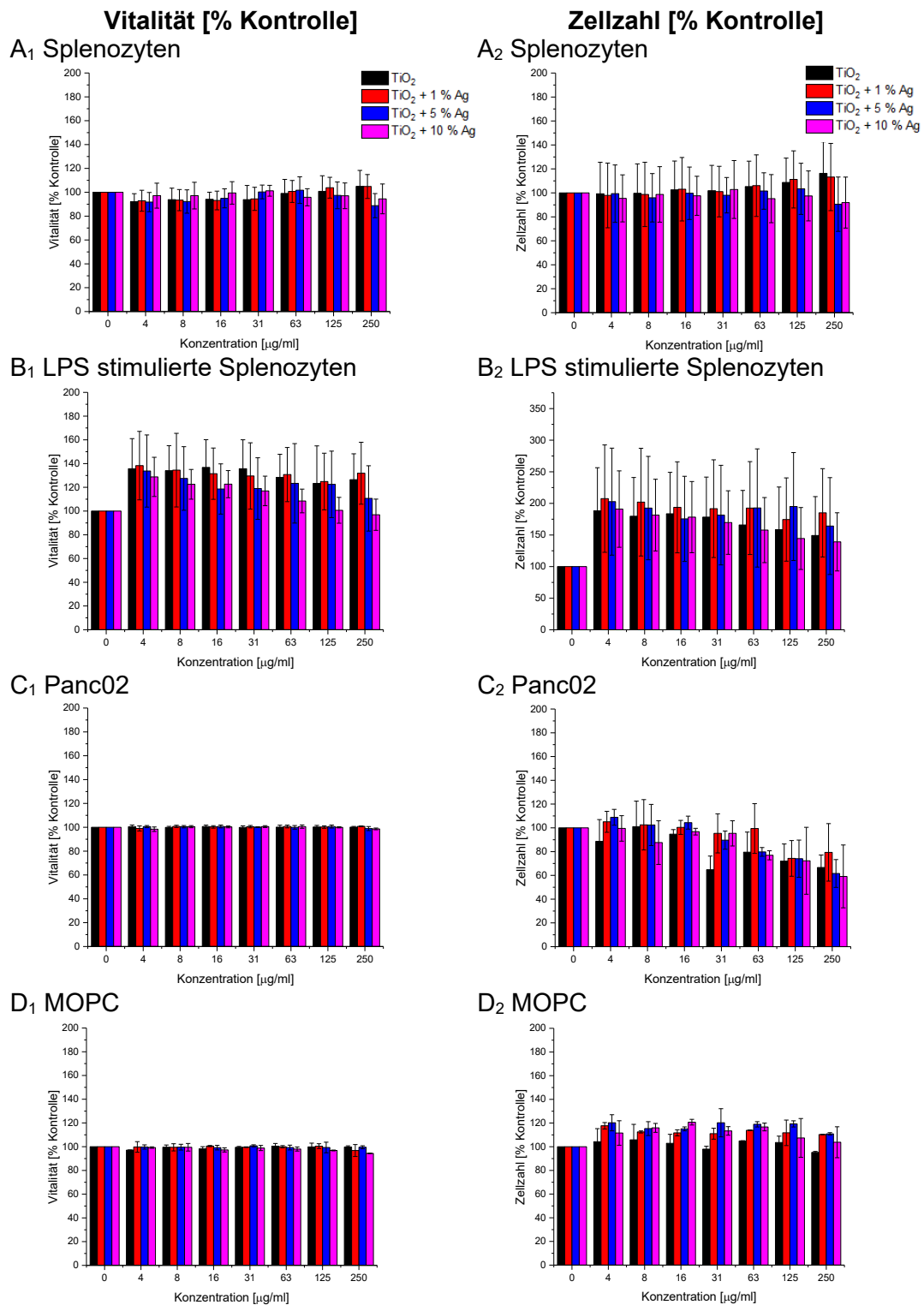


Abbildung 41: Auswirkung von APTES beschichteten TiO₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.

Splenocyten, LPS stimulierte Splenocyten (14 - 20 Wochen alte, weibliche B57BL/6 Mäuse), Panc02 und MOPC Zellen wurden 24 h mit APTES beschichteten NP mit steigendem Silberanteil inkubiert und anschließend lebend/tot gefärbt (n = 3). Die Messung erfolgte mit Durchflusszytometrie.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung einer erfolgreichen Beschichtung

4.1.1 Kontrollieren der Partikelaggregate

Einfluss von Ultraschall

Ziel dieses Versuches war es, die TiO₂ Nanopartikelaggregatgrößen durch Re-dispergierung mit Hilfe von Ultraschallbad und Ultraschalltip zu kontrollieren. Dadurch sollte im späteren Verfahren eine Beschichtung einzelner Partikel gewährleistet werden. Es wurden dafür Partikelgrößen von 10 nm +/- 7 nm, entsprechend den Werten, welche der SEM-Aufnahmen der unbeschichteten TiO₂-Partikel zu entnehmen waren, angestrebt. Die Ultraschallwellen verbreiten sich im flüssigen Medium als alternierende Hoch- und Niederdruckkreisläufe bei einem Frequenzbereich zwischen 20 und 40 Hz. Während des Niederdruckkreislaufes bilden sich mikroskopisch kleine Dampfblasen. Dieser Effekt wird *Kavitation* genannt. Die Blasen kollabieren nun während des Hochdruckkreislaufes und entwickeln Schockwellen, welche eine enorme mechanische und thermische Energie besitzen und nachfolgend Agglomerate brechen können (Taurozzi, Hackley, & Wiesner, 2011).

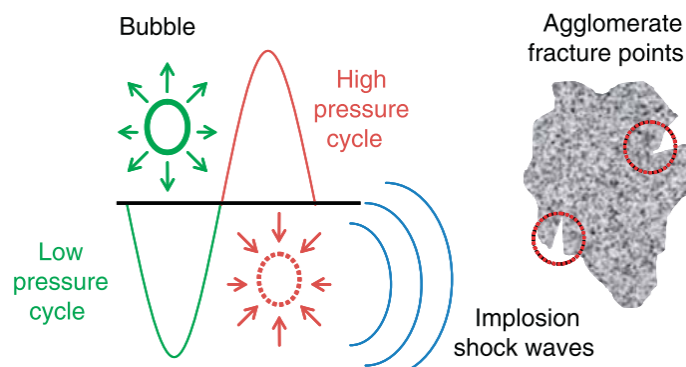


Abbildung 42: Schematische Darstellung der ultraschallwelleninduzierten Kavitation und des Agglomeratbruchs nach Taurozzi et al.
(Darstellung nach (Taurozzi et al., 2011) unter der Genehmigung von Taylor & Francis modifiziert).

Das Ergebnis des DLS zeigt, dass im direkten Vergleich der beiden Möglichkeiten, die Behandlung mit Ultraschalltip eine weitaus größere Partikelgrößenreduzierung als durch eine Ultraschallbadbehandlung zur Folge hatte. Gerade bei Probe 01, d.h. TiO₂ Nanopartikel ohne Silberanteil, zeigte die Prozedur mit Ultraschalltip deutlich positivere Ergebnisse. Auch wenn keine Werte von 10 nm +/- 7 nm gemessen wurden, so reduzierte sich die durchschnittliche Aggregatgröße von 1200 nm bei der Ultraschallbadbehandlung auf unter 200 nm durch die Behandlung mit dem Ultraschalltip.

Die Ursache hierfür liegt im Unterschied der indirekten (Ultraschallbad) und direkten (Ultraschalltip) Ultraschallbehandlung. Bei der indirekten Form müssen die Schallwellen sowohl das Bad als auch den Probenbehälter passieren, bevor sie die Suspension erreichen. Bei der direkten Ultraschallbehandlung ist der Ultraschalltransduktor dagegen in der Probe und die Schallwellen müssen keine physikalischen Barrieren mehr überwinden. Auf diese Weise kommt eine größere Endenergie in der Suspension an (Taurozzi et al., 2011). Ein weiterer Ansatz für einen positiven Effekt des Ultraschalltips besteht darin, dass ein Ultraschalltip eine einzige aktive Zone mit einer hohen Konzentration an Kavitäten formiert. Das Ultraschallbad dagegen entwickelt mehrere aktive Zonen, an denen sich Kavitäten mit einer geringeren Konzentration bilden (Jingkun Jiang, Oberdörster, & Biswas, 2009).

Doch auch zu lange Ultraschallzeiten wirken sich negativ auf die TiO₂ Proben aus, sodass eine effiziente Ultraschallbehandlung bei niedrigen Temperaturen und einer geringen kinetischen Energie angestrebt wird (Löning, Horst, & Hoffmann, 2002). Aufgrund der extremen lokalen Hitzeentwicklung während des Kavitationseffektes kommt es zu einer Erwärmung der Probe. Da eine übermäßige Temperatursteigerung zu Flüssigkeitsverlust aufgrund von Evaporation führt, kann es daraufhin zu einer Volumenänderung der Probe oder zu einer Verschlechterung der Medienzusammensetzung kommen (Taurozzi et al., 2011). Um dem ganzen vorzubeugen, wurde eine pulsierende Ultraschalltipbehandlung mit einem Pulsintervall von 0,5 s durchgeführt. Auf diese Weise wurde eine Steigerung des Kavitationseffektes erreicht, während ungewollte Nebeneffekte durch Hitzeentwicklung verhindert wurden (Taurozzi et al., 2011). Außerdem kommt

hinzu, dass bei einer Reduzierung der Ultraschalldauer durch das Einfügen von inaktiven Zeitintervallen eine größere Pulsfrequenz und dadurch eine kontinuierliche Beschallung gewährleistet werden kann (Nguyen, Rouxel, Hadji, Vincent, & Fort, 2011).

Einfluss von TiO_2 Nanopartikelkonzentration

Ein weiterer Faktor, der hinsichtlich seiner Auswirkung auf die Aggregatgröße untersucht wurde, war die Partikelkonzentration. Es ist bekannt, dass ein gleichbleibendes Volumen, aber eine höhere Partikelkonzentration in einem Anstieg der Kollisionfrequenz der Teilchen endet. Dies führt zum einen aufgrund ansteigender Partikel-Partikel-Zusammenstöße zu einer Verbesserung der Partikelauflösung, zum anderen bilden sich bei einer erhöhten Kollisionfrequenz, sobald ausreichende Energien erzielt werden, auch Agglomerate und Aggregate. Die Auswirkung der Konzentration ist somit sowohl abhängig von der Energie, welche mittels Ultraschallwellen schlussendlich in der Suspension ankommt, und zum anderen von den physiochemischen Eigenschaften der Suspensionen. Einen weiteren Aspekt stellt auch der Einfluss der Nanopartikelkonzentration auf die akustischen Eigenschaften der Suspensionen dar. Sobald die Viskosität des Mediums und die akustische Leitfähigkeit beeinflusst werden, kann es zu Auswirkungen auf die in der Suspension ankommende Energie führen. Dieser Effekt tritt aber erst ein, wenn mit stark konzentrierten Stocksolutions gearbeitet wird, welche noch nicht verdünnt wurden (Taurozzi et al., 2011).

Beim Vergleich der verschiedenen Konzentrationen von 0,13 mg/ml bis 0,01625 mg/ml innerhalb der Gruppe mit 2 min Ultraschalltipbehandlung konnte kein einheitliches Ergebnis festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass sich die Konzentrationen in einem so niedrigen Bereich befanden, welcher noch keine Auswirkungen auf die Kollisionfrequenz oder akustischen Leitfähigkeit besaß.

4.1.2 Einfluss von Salzen auf die Stabilität

Eine Möglichkeit zur Stabilitätssteigerung von Suspensionen, ist die auf der DLVO-Theorie basierte Entwicklung einer elektrostatischen Stabilisierung der Partikel. Entsprechend der DLVO-Theorie nach Derjaguin, Landau (1941) sowie Verwey und Overbeek (1948) (Verwey & Overbeek, 1948), treten zwischen einzelnen Partikeln zwei verschiedene Wechselwirkungsenergien, nämlich eine anziehende und eine abstoßende Kraft auf. Die Gesamtbilanz dieser zwei kontroversen Kräfte gibt am Ende Auskunft darüber, ob eine Dispersion stabil oder instabil ist und Agglomerate bilden. Während die anziehenden Kräfte auf den Van-der-Waals-Kräften gründen, ergeben sich die abstoßenden aus den Interaktionen zwischen den elektrostatischen Doppelschichten der Partikeln (Jingkun Jiang et al., 2009). Die Stabilisatoren, welche die elektrostatische Doppelschicht bilden, sind Anionen (Aiken, Lin, & Finke, 1996). Anionen werden entweder separat zu den Lösungen hinzugegeben oder liegen durch Reduktion von Metallsalzen vor. Sie werden an ungesättigte, elektrophile Nanopartikeloberflächen gebunden und bilden so die abstoßende Komponente zwischen zwei nun anionisch geladenen Partikeln (Ott & Finke, 2007). Neben den Anionen liegen auch Gegenionen, in diesem Fall Kationen, vor, welche die Oberflächenladung kompensieren. Sie bilden eine diffuse Ionenschicht um die Teilchen und vervollständigen die elektrostatische Schicht. Die Doppelschicht wird grundlegend von zwei Größen charakterisiert. Zum einen durch das Zetapotential und zum anderen durch die Dicke der Schicht (Morrison & Ross, 2002). Steigen diese Größen an, steigen gleichzeitig auch die abstoßenden Kräfte und die Dispersion ist stabil (Jingkun Jiang et al., 2009). Beim Zetapotential müssen hierfür Werte von $\geq + 30$ mV bzw. $\leq - 30$ mV erreicht werden (Bihari et al., 2008; Mandzy, Grulke, & Druffel, 2005).

Einfluss des pH-Wertes

Rouster et al. untersuchten nun den Einfluss des pH-Wertes und der damit veränderten Oberflächenladung sowie die Ionenstärke auf das Aggregationsverhalten der Partikel (Rouster, Pavlovic, & Szilagyi, 2017). Der Versuchsaufbau wurde dem von Rouster et al. angeglichen. Die in Wasser gelösten Partikel wurden nach der Zugabe von sechs verschiedenen Salzen (KCl, KNO₃, KSCN, KH₂PO₄,

K_2SO_4 , $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$) unter drei verschiedenen pH-Werten (pH 2, pH 7,4 und pH 10,3) elektrophoretisch und via DLS gemessen. Durch die Veränderung des pH-Wertes entsteht eine Steigerung der Oberflächenladung und dadurch ebenfalls eine Steigerung der abstoßenden Kräfte zwischen Partikeln (Jingkun Jiang et al., 2009). Wie zu erwarten, sank das Zetapotential bei zunehmendem pH-Wert (Abbildung 15 b), sodass sich bei einem pH-Wert von 2 eine positive und bei pH 7,4 und pH 10,3 eine negative Oberflächenladung mit starkem Zetapotential bildete. In Abbildung 43 ist die erwartete Kurve des Zetapotentials in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt.

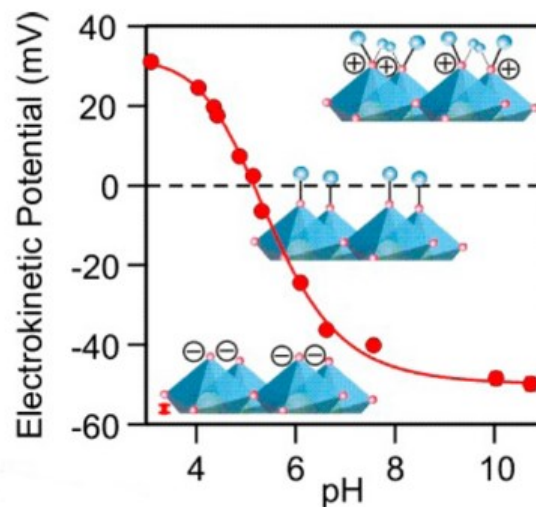


Abbildung 43: Schematische Darstellung des elektrokinetischen Potentials (Zetapotential) bei unterschiedlichen pH-Werten nach Rouster et al. (Darstellung unter der Genehmigung von (Rouster et al., 2017) modifiziert. Copyright © 2017 American Society).

Einfluss der Salzkonzentration

Eine weitere Möglichkeit die Oberflächenladung zu kontrollieren, besteht in der Zugabe von dispergierten Salzen, welche in unterschiedlich geladene Ionen dissoziieren können. Die Ionen werden dann in wässriger Umgebung von den Partikeln adsorbiert und führen ebenfalls zu einer Veränderung der Oberflächenladung und des Zetapotentials (Jingkun Jiang et al., 2009). Nach der Zugabe von Salzen mit einwertigen (KCl , KNO_3 , $KSCN$, KH_2PO_4) und mehrwertigen Anionen (K_2SO_4 , $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$), konnte allerdings kein einheitliches und reprä-

sentatives Ergebnis festgehalten werden. Während bei einer Steigerung der Ionenstärke eine anwachsende Partikelgröße zu erwarten war (Jingkun Jiang et al., 2009), wurden beispielsweise bei KSCN bei 10 mM, der zweitgrößten Masse, die geringste Größe gemessen. In diesem Fall kann die DLVO-Theorie nicht als bestätigt angesehen werden, sodass in den nachfolgenden Versuchen keine Salzzugabe mehr durchgeführt wurde.

4.1.3 Einfluss von Citrat auf Stabilisierung

Beim Betrachten des Einflusses von Citrat auf die Stabilität der Nanopartikel, wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie beim Versuch der Stabilisierung mit Salzen. Die Änderungen des pH-Wertes zeigten deutliche Auswirkungen auf das Zetapotential der Proben. Während bei pH 2 wieder positive Zetapotentialwerte gemessen wurden, sanken sie bei pH 7,4 und 10,3 rasch auf negative Werte um – 30 mV. Die Auswirkung der Citratzugabe zeigte dagegen bei der Partikelgröße nur ungenaue Ergebnisse. Auch wenn bei der höchsten Konzentration von 100 mM, wie zu erwarten, die größten Partikelgrößen und bei 0,01 mM die niedrigsten Partikelgrößen gemessen wurden, so gab es Ungenauigkeiten bei den Messungen der übrigen Konzentrationen. Aus diesem Grund wurde auch bei den nächsten Versuchen nicht mehr auf diese Möglichkeit der Partikelstabilisierung zurückgegriffen.

4.1.4 Aminfunktionalisierung von Partikeln mit APTES

Um Metallnanopartikel für biologische Anwendungen anzupassen und ihre Stabilität zu verbessern, muss die hydrophobe Oberfläche durch eine hydrophile, biokompatible und funktionelle Beschichtung ersetzt werden, welche kontrollierte Interaktionen mit biologischen Spezies zulässt (De Palma et al., 2007). In nachfolgenden Versuchen wurden Beschichtungen mit (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) durchgeführt.

Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach der Zugabe von Toluol

Da die Gefahr besteht, dass APTES unter Wasserzufuhr hydrolysiert wird und es zur Agglomeratsbildung kommt, wurden die Versuche unter wasserfreiem Toluol durchgeführt. Um bei nachfolgenden Versuchen eine Beschichtung einzelner Partikel und keiner Aggregate oder Agglomerate gewährleisten zu können, wurden die TiO₂ Nanopartikel zunächst in Toluol gelöst, mit Hilfe von Ultraschall redispersiert und auf eine möglichst geringe Größe reduziert. Ein wichtiger Faktor, der bei Toluol berücksichtigt werden musste, war die Gefahr der Überhitzung und Evaporation bei der Ultraschallbehandlung. Aus diesem Grund wurden die Epipis während der Ultraschallbehandlung in Eis gelegt (Taurozzi et al., 2011). Bei der Gegenüberstellung der drei verschiedenen Ultraschalltipzeiten, wurden, wie auch beim Redispersieren in Wasser, die besten Ergebnisse hinsichtlich der Partikelgröße bei 2 min erreicht. Auf den Vergleich mit einer Ultraschallbadbehandlung verzichtete man aufgrund der Ergebnisse in Versuch 3.1.1.1. Bei der Gegenüberstellung der verschiedenen TiO₂ Nanopartikelkonzentrationen von 0,13 mg/ml bis 0,01625 mg/ml wurde kein einheitliches Ergebnis festgestellt. Es ist davon auszugehen, dass sich auch hier die Konzentrationen in einem so niedrigen Bereich befanden, welcher noch keine Auswirkungen auf die Kollisionfrequenz oder akustischen Leitfähigkeit besaß (Taurozzi et al., 2011).

Einfluss von Magnetrührtechniken

Ein weiterer Faktor, welcher bei der Modifizierung der Partikel mit APTES berücksichtigt wurde, war die Art und Weise der Magnetrührtechnik. Dabei wurden die Partikel wie bei Uyanik (Uyanik, 2008) einmal unter Raumtemperatur und wie bei De Palma et al. unter Zugabe von Essigsäure sowie Erhöhung der Temperatur (De Palma et al., 2007) gerührt und miteinander verglichen. Die DLS Messung zeigte, dass die geringsten Partikelgrößen unter Temperaturerhöhung auf 40 °C erzielt wurden, sodass in den nächsten Versuchen immer darauf zurückgegriffen wurde.

Einfluss von APTES-Konzentration und Waschprozessen

Bei der Gegenüberstellung der zwei verschiedenen Waschprozesse wurde ein deutlicher Vorteil der Zentrifugenbehandlung gegenüber der Dialyse zugeschrieben, da nach der Dialysenbehandlung aufgrund von sehr instabilen Dispersionen nur ungenaue DLS-Messungen mit mehreren Peaks gemacht werden konnten. Deshalb wurden daraufhin die unterschiedlichen APTES Konzentrationen nur nach der Zentrifugenaufbereitung miteinander verglichen und eindeutig bessere Ergebnisse hinsichtlich der Partikelgröße bei 2 % APTES festgestellt. Diese Konzentration wurde für nachfolgenden Versuch verwendet.

Der erste Versuch, eine erfolgreiche APTES Beschichtung der TiO₂ Nanopartikel durchzuführen, scheiterte. Zum einen wurde keine Änderung der Partikelgröße erreicht, wovon bei einer zusätzlichen Schicht um die Partikel normalerweise auszugehen ist. Zum anderen wurden bei einem pH-Wert von 7,4 deutlich negative Werte im Bereich von mindestens – 10 mV gemessen. Laut Literatur zeigen TiO₂, welche mit APTES modifiziert wurden, bei einem pH-Wert von 7,4 positive Werte auf. Durch die Zugabe von HCl und dem damit verbundenen niedrigeren pH-Wert müsste das Zetapotential auch noch deutlicher im positiven Bereich liegen (Ukaji, Furusawa, Sato, & Suzuki, 2007; Youssef et al., 2017).

Einfluss von Tensid auf die Beschichtung

Eine weitere Möglichkeit die Stabilität zu steigern und das Zetapotential zu beeinflussen, ist die Zugabe eines Stabilisators (Choi, Stathatos, & Dionysiou, 2006; Powers et al., 2006). Dieser wird zu der Suspension hinzugeführt, adsorbiert schließlich an der Partikeloberfläche und verhindert das Annähern anderer Partikel (Bihari et al., 2008). In diesem Experiment wurde auf Tween 80, ein Tensid, zurückgegriffen. Es sollte durch die Anbindung auf der Partikeloberfläche zu einer Vergrößerung der Oberflächenspannung, dadurch zu einer Erhöhung der Stabilität und einer Vermeidung von Aggregatsbildung führen. Bei der anschließenden DLS Messung der APTES beschichteten und mit Tween 80 versehenen Partikel wurde eine Erhöhung der Partikelgröße gegenüber den unbeschichteten TiO₂ Partikeln festgestellt. Die Erhöhung der Partikelgröße wird der zusätzlichen

Schicht an APTES zugeschrieben. Eine erhoffte Erhöhung der Stabilität durch eine Veränderung des Zetapotentials in Bereiche um + 30 mV konnten aber auch durch die Zugabe von Tween 80 nicht erreicht werden, so dass dieses Experiment als gescheitert anzusehen war.

Einfluss von Temperatur

Ein neuer Ansatz, eine erfolgreiche Beschichtung zu schaffen, war die Beeinflussung der Temperatur während des Funktionalisierungsvorganges. Wie De Palma et al. feststellten, ist die benötigte Temperatur stark abhängig vom Silantyp (De Palma et al., 2007). Durch eine Erhöhung der Temperatur von 40 °C auf 120 °C sollte eine Steigerung der Stabilisierung erreicht werden. Wie die DLS Messungen zeigten, wurden neben einer Erhöhung der Partikelgröße, welche durch die zusätzliche Schicht an APTES zu erklären ist, erstmals auch beim Zetapotential Veränderungen sichtbar. Die Werte wechselten nun von negativen auf positive Werte zwischen 24 mV (TiO₂ + 10 % Ag) und 30 mV (TiO₂), so war die Beschichtung als erfolgreich zu werten.

4.1.5 Beschichtung mit Dopamin

Einfluss von pH-Wert auf die Beschichtung

Für diesen Versuch wurde die Beschichtung von TiO₂ mit Dopamin unter dem Einfluss von drei verschiedenen pH-Werten (pH 2, pH 7,4 und pH 10,3) untersucht. Hierbei sollte der Unterschied zwischen saurem, neutralem und basischem Milieu hinsichtlich der Beschichtung mit Dopamin dargestellt werden. Während bei pH 2 und pH 7,4 eine Beschichtung der Partikel mit Dopamin zu erwarten war (Deng et al., 2017), so sollte sich in wässriger, basischer Umgebung bei pH 10,3 aus der Dopaminbeschichtung eine PDA-Beschichtung bilden (J. Jiang et al., 2011; H. Lee et al., 2007; Tao et al., 2016; Wang et al., 2016). Da sich bei den Suspensionen von pH 7,4 und pH 10,3 sehr große und undefinierbare Konglomerate gebildet hatten und sich bei pH 2 auch nach 1,5 h Zentrifugieren keine Phasenaufspaltung gezeigt hatte, war keine Charakterisierung hinsichtlich der unterschiedlichen Beschichtungen möglich.

Kontrollieren der Nanopartikelaggregate nach der Zugabe von Tris Base

Da Dopamin nur unter alkalischen Bedingungen eine Selbstpolymerisation durchläuft und stabile PDA-Filme bildet (H. Lee et al., 2007; Tao et al., 2016; Wang et al., 2016), wurden in nachfolgenden Versuchen die Partikel unter 10 mM Tris Base mit pH 8,5 wie bei Lee et al. (H. Lee et al., 2007) gelöst.

Entsprechend der Redispergierung mit Wasser und Toluol wurden auch bei der Lösung der Partikel unter Tris Base zunächst die optimalen Bedingungen für eine möglichst ausgeprägte Aggregataufspaltung ermittelt. Es wurden sowohl der Einfluss der Partikelkonzentration als auch die Ultraschallzeit miteinander verglichen.

Bei der Ultraschallzeit wurde zwischen 2, 5 und 10 min unterschieden. Es war eine eindeutig reduzierte Aggregatgröße nach der Behandlung mit Ultraschalltip gegenüber den unbehandelten Proben zu erkennen. Dies ist auf die in 4.1.4 erörterten Faktoren zurückzuführen. Hinsichtlich der Ultraschalldauer gab es allerdings keine Unterschiede, sodass zur Vereinfachung der nachfolgenden Experimente eine Ultraschallzeit von 2 min ausgewählt wurde.

Beim Betrachten der Nanopartikelkonzentrationen wurde ebenfalls keine Überlegenheit einer bestimmten Konzentration ermittelt. Da die nachfolgenden Charakterisierungen bei einer höheren TiO₂ Konzentration leichter durchzuführen waren, wurde auf 26 mg/ml TiO₂ zurückgegriffen.

Einfluss von Ultraschall

Auch wenn anhand der DLS Auswertung der Ultraschalltipbehandlung in der Abbildung 27 kein Unterschied hinsichtlich der Aggregatgröße zwischen den einzelnen Gruppen ausgemacht werden konnte, wurde in den nachfolgenden Versuchen mit weiteren 2 min Ultraschalltip gearbeitet.

Abbaustudie von PDA-Beschichtung bei pH 5

Lysozyme sind Enzyme des Körpers, welche als Teil des angeborenen Immunsystems fungieren und z.B. für den Abbau der PDA-Beschichtung zuständig wären. Da die maximale Stabilität von Lysozymen bei einem pH-Wert von 5 erreicht

wird (Cueto, Dorta, Munguía, & Llabrés, 2003), wurde nachfolgender Versuch zur Abbaustudie der PDA-Beschichtung bei pH 5 durchgeführt.

Es wurde erwartet, dass die reinen TiO₂ Partikel bei einem konstanten Partikelgrößenbereich bleiben, da sie keine abbaubare Beschichtung besitzen. Die beschichteten Partikel dagegen sollten mit ansteigender Dauer hinsichtlich der Partikelgröße, gemäß dem Abbau ihrer Beschichtung, abnehmen.

Wie Abbildung 32 zeigt, blieben die unbeschichteten Partikel auf einem konstanten Größenniveau bei ca. 100 nm. Die Größe der mit Dopamin beschichteten Partikel dagegen stieg konstant an, bis sogar makroskopisch Agglomerate zu erkennen waren.

4.1.6 Funktionalisierung mit Polymeren

In diesem Versuch war es Ziel, eine funktionierende Polymerbeschichtung der Partikel zu erzeugen. Zunächst wurden die Partikel mit einer stabilen PDA versehen, welche zahlreiche Amino- und Katecholgruppen besitzt. Das Polymer PEG-SH wurde dann durch Reaktion zwischen den terminalen Aminogruppen und den Katecholgruppen der PDA-Beschichtung an die Oberfläche angeheftet (J. Liu et al., 2017).

Durch den Anstieg der Partikelgröße der PEG-SH beschichteten Partikel im Vergleich zu den mit PDA beschichteten Partikeln zeigten die DLS Messungen eine weitere mögliche Beschichtung.

Das Zetapotential wies, wie auch in der Literatur beschrieben (J. Liu et al., 2017), negative Werte auf. Eine gesteigerte Stabilisierung durch ein gesteigertes Zetapotential konnte aber nicht festgestellt werden. Die Werte zwischen den mit PEG-SH beschichteten und den mit PDA beschichteten Partikeln zeigten keine starken Veränderungen auf. Sie verliefen alle im negativen Bereich um – 20 mV. Die mit PDA beschichteten Partikel waren dagegen sogar in einem etwas niedrigeren Bereich um – 30 angesiedelt und zeigten eine größere Stabilität.

Da bei den Polymeren PMO_x-SH und auch PG-SH keine erfolgreichen Beschichtungen entwickelt werden konnten und die Proben nach 24 h makroskopisch sichtbare Agglomerate zeigten, konnten die Partikel nicht weiter charakterisiert werden.

4.1.7 Einfluss von PBS mit pH 7 auf (un-)beschichtete Nanopartikel

Da die Partikel für nachfolgende Zellversuche in PBS gelöst wurden, wurde die Auswirkung von PBS bei einem pH-Wert von 7 auf die unbeschichteten und mit APTES, Dopamin und PEG-SH beschichteten Partikel innerhalb eines Zeitraumes von 48 h überprüft. Da der große Vorteil der beschichteten Partikel darin liegt, dass ihre Stabilität erhöht wird (Edmondson et al., 2004; Gref et al., 2000; Liebscher et al., 2013; Lyngé et al., 2015; Storm et al., 1995), wurde erwartet, dass sich die Partikel innerhalb der Zeitspanne auf einem konstanten Niveau befinden, während die Größe der unbeschichteten Partikel aufgrund ihrer großen Neigung zur Agglomeratsbildung zunimmt. Wie man anhand von Abbildung 37 allerdings sehen kann, gab es keine Unterschiede zwischen den Partikeln hinsichtlich ihrer Größenentwicklung innerhalb einer Zeitspanne von 48 h.

4.2 Zellversuche

Ziel dieses Teils der Arbeit ist es, die Auswirkungen von beschichteten TiO₂ mit steigendem Silberanteil auf verschiedenen Zelllinien zu überprüfen. Zum einen wurden die Reaktionen auf Maus-Splenozyten und Splenozyten, die für 48 h mit LPS stimuliert wurden, untersucht, zum anderen die Effekte auf den Tumorzelllinien Panc02 und MOPC.

4.2.1 Einfluss des Silberanteils

Nach Akhtar et al. bieten metallocdotierte Nanopartikel eine exzellente Grundlage für den ROS induzierten Zelltod bei Tumorzellen (Akhtar et al., 2015).

Wie bereits beschrieben (s. 1.4), zeichnen sich Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen durch einen höheren Gehalt an ROS aus. Da ein zu hohes Vorkommen an ROS zu Apoptose, Autophagie und Nekroptose zum Zelltod führt (Y. H. Lee et al., 2014), können entartete Zellen nur geringe Mengen an zusätzlichem ROS tolerieren. Dies machen sich Tumormedikamente, wie auch metallocdotierte Nanopartikel, zunutze und initiieren einen weiteren ROS Anstieg, sodass Krebszellen abgetötet und normale Zellen verschont werden.

In den vorangegangenen Versuchen wurden Partikel mit einem steigenden Silberanteil von 0 % Ag bis 10 % Ag verwendet und somit der Einfluss von Silber auf die Zellen überprüft. Auch wenn in der Literatur beschrieben ist, dass silberdotierte Nanopartikel zu Autophagie führen (Y. H. Lee et al., 2014), wurde bei den unbeschichteten Partikeln mit einem Silberanteil von 1 – 10 % kein Absinken der Zellvitalität oder Zellzahl verzeichnet, sodass sie entgegen der Erwartungen, als nicht toxisch anzusehen sind. Auch die Tatsache, dass bei einer TiO₂ Konzentration von 250 µg/ml ohne Silberanteil, die Zellzahl der Panc02 auf einen Wert von 65 % sank und somit toxischer als die Partikel mit Silberanteil waren, steht im Gegensatz zu Literaturergebnissen (Pujalté et al., 2011).

Bei den beschichteten Partikeln wurde jedoch eine Auswirkung des Silberanteils auf die Zellen festgestellt. Splenozyten und Panc02 Zellen zeigten bei PDA beschichteten TiO₂ Nanopartikel bei einem steigenden Silberanteil ein stärkeres Absinken der Vitalität und Zellzahl. Die undotierten Partikel wiesen dagegen keine Auswirkung auf die Zellen auf und waren als nicht toxisch anzusehen. Dies entspricht den laut Literatur zu erwartenden Ergebnissen (Ahamed et al., 2017; Pujalté et al., 2011). Bei den mit PEG-SH beschichteten Partikeln waren keinerlei Auswirkungen auf die Vitalität oder Zellzahl zu erkennen, sodass weder die Partikel mit Silberanteil, noch die reinen Partikel, zytotoxische Wirkungen auf die Zellen hatten.

Bei den mit APTES beschichteten Partikel auf Panc02 Zellen waren auch keine Auswirkungen des Silberanteils auf die Zytotoxizität zu erkennen. Hier war die Konzentration der Partikel und nicht der Silberanteil der entscheidende Faktor für das Absinken der Zellzahl.

4.2.2 Einfluss der Konzentration an (un-)beschichteten Nanopartikeln

Ein weiterer Faktor, der hinsichtlich der Auswirkung der Partikel auf die Zellen überprüft wurde, war die Konzentration der verwendeten beschichteten und unbeschichteten Nanopartikel. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 0 bis 250 µg/ml Nanopartikel für 24 h inkubiert und anschließend auf ihre Vitalität und

Zellzahl hin untersucht. Wie anhand der Ergebnisse in 3.1.9 zu erkennen ist, wurden erste Auswirkungen der Partikel auf die Zellen ab einer Konzentration von 125 µg/ml sichtbar, wie es bei der Inkubation mit PDA beschichteten Partikeln auf die Splenozyten und Panc02 Zellen zu erkennen war. Bei den Splenozyten änderte sich die Vitalität und bei den Panc02 die Zellzahl. Die größten Effekte waren aber ab einer Konzentration von 250 µg/ml zu verzeichnen. Unter diesen Bedingungen sank bei den Splenozyten auch die Zellzahl und die Panc02 Zellen erfuhren einen größeren Rückgang der Zellzahl. Der Einfluss der mit APTES beschichteten Partikel auf die Panc02 zeichnete sich bei den reinen, unbeschichteten TiO₂ auch erst ab einer Konzentration von 250 µg/ml ab.

Es ist demnach zu erkennen, dass der Einfluss der beschichteten und unbeschichteten Partikel eindeutig von ihrer Konzentration abhängt, wie es bei Ahamed et al. auch beschrieben ist. Allerdings wurden erste Ergebnisse nicht wie in ihrer Studie schon ab 25 µg/ml, sondern erst ab 125 µg/ml verzeichnet (Ahamed et al., 2017).

4.2.3 Einfluss auf adhärenente Zellen

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Vitalität und Zellzahl nahm, war der Unterschied zwischen adhärenent wachsenden und in Suspension lebenden Zellen. Die größten Auswirkungen der Partikel waren eindeutig bei der Tumorzelllinie Panc02 zu erkennen. Während Splenozyten und MOPC Zellen Suspensionszellen sind, zählen Panc02 Zellen zu den adhärenent wachsenden Zellen (Corbett et al., 1984). Die Zellzahl der Panc02 Zellen sank sowohl unter Einfluss von PDA als auch APTES beschichteten Partikeln. Bei den PDA beschichteten Partikeln wurde die geringste Zellzahl des gesamten Versuchsaufbaus mit einem Wert von unter 20 % gemessen.

4.2.4 Einfluss auf Tumorzellen

Für eine mögliche Tumorthherapie ist es unabdingbar, dass die Partikel tatsächlich ausschließlich Tumorzellen abtöten und gesunde Zellen nur gering oder besser

überhaupt nicht schädigen. Wie man an den Ergebnissen der Zellversuche erkennt (s. 3.1.9), ist keine einheitliche Aussage zu treffen. Während die gesunden Splenozyten unter dem Einfluss unbeschichteter, mit PEG-SH beschichteter und mit APTES beschichteter Partikel keine Reduzierung der Vitalität oder Zellzahl zur Folge hatten, sanken beide Parameter durch die Inkubation mit PDA beschichteten Partikeln. Auch bei den Tumorzelllinien ist kein eindeutiges Ergebnis zu erkennen. Während die Zellzahl der Panc02 Zellen sowohl durch PDA, als auch durch APTES beschichtete TiO₂ Nanopartikel zwar reduziert wurde, war durch die Zugabe von PEG-SH beschichteten Partikeln keine Auswirkung erkennbar. MOPC Tumorzellen wurden sogar weder durch die Zugabe von unbeschichteten, noch durch beschichtete Partikel hinsichtlich ihrer Vitalität oder Zellzahl beeinflusst. Aus diesem Grund wurde die Aussage, dass Tumorzellen abgetötet werden, während nicht entartete Zellen überleben (Akhtar et al., 2015; Pelicano et al., 2004; Trachootham et al., 2009) hier nicht bestätigt.

4.2.5 Einfluss der Beschichtung

Ein weiteres Kriterium, welches in Hinblick auf die Auswirkung der Partikel auf die Zellen beobachtet wurde, war die Beschichtung. Untersucht wurde der Einfluss von TiO₂ Partikel, welche mit PEG-SH, PDA oder APTES beschichtet wurden, auf gesunde Zellen und auf Tumorzellen. Die Referenzgruppe wurde mit unbeschichteten Partikeln behandelt.

Die Referenzgruppe zeigte keine gravierenden Effekte hinsichtlich der Vitalität und Zellzahl auf die Zellen.

Während PEG-SH beschichtete Partikel weder auf gesunde noch auf entartete Zellen einen Einfluss hatte, sank unter dem Einfluss APTES beschichteter Partikel zumindest die Zellzahl der Panc02 Tumorzellen. Dennoch ist bei diesen Arten der Beschichtung von keiner Toxizität auszugehen.

Die größte Wirkung fand eindeutig unter den PDA beschichteten Partikeln statt. Durch die Inkubation der Zellen mit PDA beschichteten TiO₂ Nanopartikeln wurde die geringste Zellzahl der Panc02 Tumorzellen mit einem Wert von unter 20 % gemessen. Außerdem wurde bei der Behandlung der Splenozyten mit diesen Partikeln sowohl ein Absinken der Vitalität als auch der Zellzahl verzeichnet und

somit erstmals eine Toxizität erreicht. Dies steht im Gegensatz zu den positiven Eigenschaften des PDAs. PDA ist normalerweise gekennzeichnet durch seine geringe Toxizität und hohe Biokompatibilität (Hong et al., 2011; X. Liu et al., 2013; Luo et al., 2013; Orishchin et al., 2017).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, eine erfolgreiche Beschichtung der verschiedenen TiO₂ Nanopartikel mit aufsteigendem Silberanteil herzustellen, um eine ausgeprägte Stabilisierung und Biokompatibilität der Partikel zu erreichen. Anschließend wurde ihre Wirkung gegenüber gesunden Zellen und Tumorzellen anhand von Zellversuchen untersucht.

Zunächst mussten die TiO₂ Aggregate nach ihrer Redispergierung in Wasser, Toluol oder Tris Base gespalten werden, damit anschließend eine kontrollierte Beschichtung einzelner Nanopartikel durchgeführt werden konnte. Der Einfluss von Ultraschall in Form einer zweiminütigen Ultraschalltipbehandlung lieferte hierbei die niedrigsten Partikelgrößen in der DLS-Messung. Dennoch wurden keine Partikelgrößen von 10 nm +/- 7 nm erreicht. Die Partikelkonzentration hatte dagegen keine Auswirkungen auf die Größe. Es ist davon auszugehen, dass die Konzentrationen in einem zu niedrigen Bereich lagen, um einen Einfluss auf die Partikelgröße zu erzielen.

Nachdem die Zugabe von Salzen und Citrat zu keiner steigenden Stabilisierung der Partikel führte, wurden zur Erhöhung ihrer Biokompatibilität Beschichtungen mit APTES, Dopamin und PEG-SH unter Einfluss von unterschiedlichen Ultraschalltipzeiten, Konzentrationen, Temperaturen, pH-Werten, Salzen sowie verschiedenen Magnetrührtechniken und Waschprozessen entwickelt. Durch die Charakterisierungsmethoden via dynamischer Lichtstreuung, Zetapotentialmessung, Infrarotspektroskopie, REM und STEM wurde jede Beschichtung analysiert und auf diese Weise ihre optimale Herstellungsmethode erarbeitet. Für eine erfolgreiche APTES-Beschichtung wurden schließlich 2 g Partikel in Toluol via zwei-minütiger Ultraschalltipbehandlung redispergiert und unter der Zugabe von 2 % APTES für 5 h bei 120 °C auf dem Magnetrührer gerührt. Um TiO₂ Nanopartikel mit PDA zu beschichten, wurden 26 mg Partikel in Tris Base mit pH 8,5 gelöst, unter zweiminütiger Ultraschalltipbehandlung redispergiert und anschließend 0,6 mg/ml Dopamin hinzugegeben. Nach erneuter zweiminütiger Ultraschalltipbehandlung wurde die Suspension für 24 h mit Alufolie abgedeckt, um die Proben vor äußeren Lichteinflüssen zu schützen und anschließend auf dem

Magnetrührer gerührt. Die Beschichtung mit PEG-SH erfolgte unter der Zugabe von PDA beschichteten TiO₂ Nanopartikeln. Hierfür wurden 1 mg/ml PDA beschichtete TiO₂ mit 1 mg/ml TCEP und 1 ml Boratpuffer mit pH 8 gelöst, anschließend 4,5 mg/ml PEG-SH hinzugegeben und für 22 h, ebenfalls mit Alufolie abgedeckt, auf dem Magnetrührer gerührt.

Schlussendlich wurde der Einfluss unbeschichteter sowie mit APTES, PDA und PEG-SH beschichteter TiO₂ Nanopartikel mit steigendem Silberanteil anhand gesunder Zellen und Tumorzellen *in vitro* untersucht. Die Zellen wurden für 24 h mit den Partikeln inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Generell wurde nur eine geringfügige Auswirkung der Partikel auf die Zellen beobachtet. Die in der Literatur beworbene Aussage, dass silberdotierte TiO₂ in der Lage sind, entartete Zellen zu töten, während gesunde Zellen ausgespart werden, konnte nicht bestätigt werden. Dennoch besaßen einige Faktoren einen Einfluss auf die Vitalität und Zellzahl. So spielte der steigende Silberanteil bei den Zellen eine Rolle, die einen Effekt auf die TiO₂ Nanopartikel zeigten. Mit steigendem Ag-Anteil sanken Zellzahl und Vitalität stärker. Auch eine ansteigende Konzentration der beschichteten Partikel wirkte sich positiv auf das Absinken der Zellzahl aus. Besonders die adhärent wachsende Tumorzelllinie Panc02 zeigte sich sensibel gegenüber den beschichteten und unbeschichteten Partikeln. Die Beschichtung, welche die größte Auswirkung auf die Zellzahl- und Vitalitätsminderung der Zellen hatte, war eindeutig die PDA-Beschichtung.

In zukünftigen Untersuchungen sollten weitere Möglichkeiten zur Aufspaltung der Partikelaggregate überprüft werden. Trotz Behandlung mit Ultraschallbad, Ultraschalltip und der Gegenüberstellung unterschiedlicher Partikelkonzentrationen, wurden keine Werte von 10 nm +/- 7 nm erreicht.

Ein weiterer Faktor, der unbedingt weiterer Forschungen bedarf, ist die Erhöhung der Partikelstabilität und somit auch der Biokompatibilität durch die Optimierung der Polymerbeschichtung. Gerade bei den PDA beschichteten Nanopartikeln ist eine deutliche Toxizität hinsichtlich der Partikel gegenüber gesunden Splenozyten zu erkennen und somit Zeugnis einer instabilen Beschichtung.

Auch wenn durch eine Steigerung des Silberanteils der TiO₂ Nanopartikel sowie der Konzentration der beschichteten Partikel eine ausgeprägtere Wirkung hinsichtlich Zellzahl und Vitalität erreicht wurde, so muss von einer weiteren Erhöhung der Parameter abgesehen werden.

Schlussendlich sollten die beschichteten TiO₂ Nanopartikel durch Tierversuche *in vivo* getestet werden.

6 Literaturverzeichnis

- Ahamed, M., Khan, M. A. M., Akhtar, M. J., Alhadlaq, H. A., & Alshamsan, A. (2017). Ag-doping regulates the cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles via oxidative stress in human cancer cells. *Sci Rep*, 7(1), 17662. doi:10.1038/s41598-017-17559-9
- Aiken, J. D., Lin, Y., & Finke, R. G. (1996). A perspective on nanocluster catalysis: polyoxoanion and (n-C₄H₉)₄N⁺ stabilized Ir(0)~300 nanocluster 'soluble heterogeneous catalysts'. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 114(1), 29-51. doi:10.1016/S1381-1169(96)00302-0
- Aitken, R. J., Chaudhry, M. Q., Boxall, A. B., & Hull, M. (2006). Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occup Med (Lond)*, 56(5), 300-306. doi:10.1093/occmed/kql051
- Akhtar, M. J., Alhadlaq, H. A., Kumar, S., Alrokayan, S. A., & Ahamed, M. (2015). Selective cancer-killing ability of metal-based nanoparticles: implications for cancer therapy. *Archives of Toxicology*, 89(11), 1895-1907. doi:10.1007/s00204-015-1570-1
- Arys, A., Philippart, C., Dourov, N., He, Y., Le, Q. T., & Pireaux, J. J. (1998). Analysis of titanium dental implants after failure of osseointegration: Combined histological, electron microscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy approach. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43(3), 300-312. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199823)43:3<300::AID-JBM11>3.0.CO;2-J
- Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., . . . Krombach, F. (2008). Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Particle and Fibre Toxicology*, 5(1), 14. doi:10.1186/1743-8977-5-14
- Brien, W. W., Salvati, E. A., Betts, F., Bullough, P., Wright, T., Rimnac, C., . . . Garvin, K. (1992). Metal levels in cemented total hip arthroplasty. A comparison of well-fixed and loose implants. *Clinical orthopaedics and related research*(276), 66-74.
- Bruce, I. J., & Sen, T. (2005). Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with Alkoxysilanes and Their Application in Magnetic Bioseparations. *Langmuir*, 21(15), 7029-7035. doi:10.1021/la050553t
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11(2), 85-95. doi:10.1038/nrc2981
- Carp, O. (2004). Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in Solid State Chemistry*, 32(1-2), 33-177. doi:10.1016/j.progsolidstchem.2004.08.001
- Chen, Q., Shi, H., Shi, W., Xu, Y., & Wu, D. (2012). Enhanced visible photocatalytic activity of titania-silica photocatalysts: effect of carbon and silver doping. *Catalysis Science & Technology*, 2(6). doi:10.1039/c2cy00545j
- Choi, H., Stathatos, E., & Dionysiou, D. D. (2006). Sol-gel preparation of mesoporous photocatalytic TiO₂ films and TiO₂/Al₂O₃ composite membranes for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*, 63(1), 60-67. doi:10.1016/j.apcatb.2005.09.012
- Corbett, T. H., Roberts, B. J., Leopold, W. R., Peckham, J. C., Wilkoff, L. J., Griswold, D. P., & Schabel, F. M. (1984). Induction and Chemotherapeutic Response of Two Transplantable Ductal Adenocarcinomas of the Pancreas in C57BL/6 Mice. *Cancer Research*, 44(2), 717-726.
- Cueto, M., Dorta, M. J., Munguía, O., & Llabrés, M. (2003). New approach to stability assessment of protein solution formulations by differential scanning calorimetry. *International journal of pharmaceutics*, 252(1-2), 159-166. doi:10.1016/s0378-5173(02)00627-0

- Dalai, S., Pakrashi, S., Kumar, R. S. S., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2012). A comparative cytotoxicity study of TiO₂ nanoparticles under light and dark conditions at low exposure concentrations. *Toxicology Research*, *1*(2). doi:10.1039/c2tx00012a
- De Palma, R., Peeters, S., Van Bael, M. J., Van den Rul, H., Bonroy, K., Laureyn, W., . . . Maes, G. (2007). Silane Ligand Exchange to Make Hydrophobic Superparamagnetic Nanoparticles Water-Dispersible. *Chemistry of Materials*, *19*(7), 1821-1831. doi:10.1021/cm0628000
- Deng, F., Guan, Y., Shi, Z., Wang, F., Che, X., Liu, Y., & Wang, Y. (2017). The effect of dopamine modified titanium dioxide nanoparticles on the performance of Poly (vinyl alcohol)/titanium dioxide composites. *Composites Science and Technology*, *150*, 120-127. doi:10.1016/j.compscitech.2017.07.009
- Ding, Y. H., Floren, M., & Tan, W. (2016). Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. *Biosurface and Biotribology*, *2*(4), 121-136. doi:10.1016/j.bsbt.2016.11.001
- Donaldson, K., Stone, V., Gilmour, P. S., Brown, D. M., & MacNee, W. (2000). Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *358*(1775), 2741-2749. doi:10.1098/rsta.2000.0681
- Eckert, R. (1998). *Sehen heißt wissen - das Rasterelektronenmikroskop im Fehleranalyiselabor* (1 ed.). Stuttgart: Druckerei E. Kurz & Co.
- Edmondson, S., Osborne, V. L., & Huck, W. T. (2004). Polymer brushes via surface-initiated polymerizations. *Chem Soc Rev*, *33*(1), 14-22. doi:10.1039/b210143m
- Feng, N., Wang, Q., Zheng, A., Zhang, Z., Fan, J., Liu, S.-B., . . . Deng, F. (2013). Understanding the High Photocatalytic Activity of (B, Ag)-Codoped TiO₂ under Solar-Light Irradiation with XPS, Solid-State NMR, and DFT Calculations. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(4), 1607-1616. doi:10.1021/ja312205c
- Fujishima, A., Rao, T. N., & Tryk, D. A. (2000). Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, *1*(1), 1-21. doi:10.1016/S1389-5567(00)00002-2
- Gázquez, M. J., Bolívar, J. P., Garcia-Tenorio, R., & Vaca, F. (2014). A Review of the Production Cycle of Titanium Dioxide Pigment. *Materials Sciences and Applications*, *05*(07), 441-458. doi:10.4236/msa.2014.57048
- Gelis, C., Girard, S., Mavon, A., Delverdier, M., Paillous, N., & Vicendo, P. (2003). Assessment of the skin photoprotective capacities of an organo-mineral broad-spectrum sunblock on two ex vivo skin models. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, *19*(5), 242 - 253.
- Gong, Z.-l., Tang, D.-y., & Guo, Y.-d. (2012). The fabrication and self-flocculation effect of hybrid TiO₂ nanoparticles grafted with poly(N-isopropylacrylamide) at ambient temperature via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Journal of Materials Chemistry*, *22*(33). doi:10.1039/c2jm32168h
- Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., . . . Müller, R. H. (2000). 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *18*(3), 301-313. doi:10.1016/S0927-7765(99)00156-3
- Günzler, H., & Böck, H. (1983). *IR-Spektroskopie - Eine Einführung* (2 ed.). Weinheim: Verlag Chemie GmbH.
- Gurr, J. R., Wang, A. S., Chen, C. H., & Jan, K. Y. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, *213*(1-2), 66-73. doi:10.1016/j.tox.2005.05.007

- Haggerty, J. E. S., Schelhas, L. T., Kitchaev, D. A., Mangum, J. S., Garten, L. M., Sun, W., . . . Tate, J. (2017). High-fraction brookite films from amorphous precursors. *Sci Rep*, *7*(1), 15232. doi:10.1038/s41598-017-15364-y
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev*, *116*(5), 3029-3085. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00407
- Hong, S., Kim, K. Y., Wook, H. J., Park, S. Y., Lee, K. D., Lee, D. Y., & Lee, H. (2011). Attenuation of the in vivo toxicity of biomaterials by polydopamine surface modification. *Nanomedicine*, *6*(5), 793-801. doi:10.2217/nnm.11.76
- Jaeger, A., Weiss, D. G., Jonas, L., & Kriehuber, R. (2012). Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology*, *296*(1-3), 27-36. doi:10.1016/j.tox.2012.02.016
- Jiang, J., Oberdörster, G., & Biswas, P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, *11*(1), 77-89. doi:10.1007/s11051-008-9446-4
- Jiang, J., Zhu, L., Zhu, L., Zhu, B., & Xu, Y. (2011). Surface characteristics of a self-polymerized dopamine coating deposited on hydrophobic polymer films. *Langmuir*, *27*(23), 14180-14187. doi:10.1021/la202877k
- Jiang, Z., Wei, W., Mao, D., Chen, C., Shi, Y., Lv, X., & Xie, J. (2015). Silver-loaded nitrogen-doped yolk-shell mesoporous TiO₂ hollow microspheres with enhanced visible light photocatalytic activity. *Nanoscale*, *7*(2), 784-797.
- Lagopati, N., Tsilibary, E. P., Falaras, P., Papazafiri, P., Pavlatou, E. A., Kotsopoulou, E., & Kitsiou, P. (2014). Effect of nanostructured TiO₂ crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *Int J Nanomedicine*, *9*, 3219-3230. doi:10.2147/IJN.S62972
- Lee, H., Dellatore, S. M., Miller, W. M., & Messersmith, P. B. (2007). Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*, *318*(5849), 426-430. doi:10.1126/science.1147241
- Lee, Y. H., Cheng, F. Y., Chiu, H. W., Tsai, J. C., Fang, C. Y., Chen, C. W., & Wang, Y. J. (2014). Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. *Biomaterials*, *35*(16), 4706-4715. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.02.021
- Li, N., Duan, Y., Hong, M., Zheng, L., Fei, M., Zhao, X., . . . Hong, F. (2010). Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol Lett*, *195*(2-3), 161-168. doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.1116
- Liebscher, J., Mrowczynski, R., Scheidt, H. A., Filip, C., Hadade, N. D., Turcu, R., . . . Beck, S. (2013). Structure of polydopamine: a never-ending story? *Langmuir*, *29*(33), 10539-10548. doi:10.1021/la4020288
- Linsebigler, A. L., Lu, G., & Yates Jr, J. T. (1995). Photocatalysis on TiO₂ surfaces: principles, mechanisms, and selected results. *Chemical reviews*, *95*(3), 735-758.
- Liu, J., Xu, H., Tang, X., Xu, J., Jin, Z., Li, H., . . . Jin, X. (2017). Simple and tunable surface coatings via polydopamine for modulating pharmacokinetics, cell uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *RSC Advances*, *7*(26), 15864-15876. doi:10.1039/C7RA01354J
- Liu, X., Cao, J., Li, H., Li, J., Jin, Q., Ren, K., & Ji, J. (2013). Mussel-Inspired Polydopamine: A Biocompatible and Ultrastable Coating for Nanoparticles in Vivo. *ACS Nano*, *7*(10), 9384-9395. doi:10.1021/nn404117j
- Liu, Y., Li, Y., Li, X. M., & He, T. (2013). Kinetics of (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir*, *29*(49), 15275-15282. doi:10.1021/la403269u
- Löning, J.-M., Horst, C., & Hoffmann, U. (2002). Investigations on the energy conversion in sonochemical processes. *Ultrasonics Sonochemistry*, *9*(3), 169-179. doi:10.1016/S1350-4177(01)00113-4

- Luo, R., Tang, L., Zhong, S., Yang, Z., Wang, J., Weng, Y., . . . Huang, N. (2013). In vitro investigation of enhanced hemocompatibility and endothelial cell proliferation associated with quinone-rich polydopamine coating. *ACS Appl Mater Interfaces*, *5*(5), 1704-1714. doi:10.1021/am3027635
- Lyngé, M. E., Schattling, P., & Stadler, B. (2015). Recent developments in poly(dopamine)-based coatings for biomedical applications. *Nanomedicine (Lond)*, *10*(17), 2725-2742. doi:10.2217/nnm.15.89
- Malvern Instruments GmbH. (2017a). Dynamische Lichtstreuung (DLS) - Dynamische Lichtstreuung für die Partikelgrößencharakterisierung von Proteinen, Polymeren und kolloidalen Dispersionen. Retrieved from <https://www.malvern.com/de/products/technology/dynamic-light-scattering>
- Malvern Instruments GmbH. (2017b). Zetasizer Nano Series - Performance, Simplicity, Versatility In M. I. GmbH (Ed.).
- Malvern Instruments GmbH. (2018). Zeta-potenzial - Die Vorteile der Verwendung von Zetapotenzialmessungen zur Verbesserung der Rezepturstabilität und der Haltbarkeit sowie zur Verringerung des Zeit- und Kostenaufwands für die Rezeptur. Retrieved from <https://www.malvern.com/de/products/measurement-type/zeta-potential>
- Mandzy, N., Grulke, E., & Druffel, T. (2005). Breakage of TiO₂ agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions. *Powder Technology*, *160*(2), 121-126. doi:10.1016/j.powtec.2005.08.020
- Morrison, I. D., & Ross, S. (2002). *Colloidal Dispersions - Suspensions, Emulsions, and Foams*. Canada: Wiley-Interscience.
- Müller, R. (1995). *Grundlagen der Halbleiter-Elektronik* (7 ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Nguyen, V. S., Rouxel, D., Hadji, R., Vincent, B., & Fort, Y. (2011). Effect of ultrasonication and dispersion stability on the cluster size of alumina nanoscale particles in aqueous solutions. *Ultrason Sonochem*, *18*(1), 382-388. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.07.003
- Orishchin, N., Crane, C. C., Brownell, M., Wang, T., Jenkins, S., Zou, M., . . . Chen, J. (2017). Rapid Deposition of Uniform Polydopamine Coatings on Nanoparticle Surfaces with Controllable Thickness. *Langmuir*, *33*(24), 6046-6053. doi:10.1021/acs.langmuir.7b00671
- Ott, L. S., & Finke, R. G. (2007). Transition-metal nanocluster stabilization for catalysis: A critical review of ranking methods and putative stabilizers. *Coordination Chemistry Reviews*, *251*(9-10), 1075-1100. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.016
- Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, *7*(2), 97-110. doi:10.1016/j.drug.2004.01.004
- Powers, K. W., Brown, S. C., Krishna, V. B., Wasdo, S. C., Moudgil, B. M., & Roberts, S. M. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci*, *90*(2), 296-303. doi:10.1093/toxsci/kfj099
- Pujalté, I., Passagne, I., Brouillaud, B., Tréguer, M., Durand, E., Ohayon-Courtès, C., & L'Azou, B. (2011). Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle and Fibre Toxicology*, *8*(1), 10. doi:10.1186/1743-8977-8-10
- Rouster, P., Pavlovic, M., & Szilagy, I. (2017). Destabilization of Titania Nanosheet Suspensions by Inorganic Salts: Hofmeister Series and Schulze-Hardy Rule. *J Phys Chem B*, *121*(27), 6749-6758. doi:10.1021/acs.jpcc.7b04286
- Saini, R., Lee, N. V., Liu, K. Y., & Poh, C. F. (2016). Prospects in the Application of Photodynamic Therapy in Oral Cancer and Premalignant Lesions. *Cancers (Basel)*, *8*(9). doi:10.3390/cancers8090083

- Salmaso, S., & Caliceti, P. (2013). Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers. *J Drug Deliv*, 2013, 374252. doi:10.1155/2013/374252
- Seaton, A., Tran, L., Aitken, R., & Donaldson, K. (2010). Nanoparticles, human health hazard and regulation. *J R Soc Interface*, 7 Suppl 1, S119-129. doi:10.1098/rsif.2009.0252.focus
- Stone, V., Miller, M. R., Clift, M. J. D., Elder, A., Mills, N. L., Moller, P., . . . Cassee, F. R. (2017). Nanomaterials Versus Ambient Ultrafine Particles: An Opportunity to Exchange Toxicology Knowledge. *Environ Health Perspect*, 125(10), 106002. doi:10.1289/EHP424
- Storm, G., Belliot, S. O., Daemen, T., & Lasic, D. D. (1995). Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17(1), 31-48. doi:10.1016/0169-409X(95)00039-A
- Tanaka, K., Capule, M. F. V., & Hisanaga, T. (1991). Effect of crystallinity of TiO₂ on its photocatalytic action. *Chemical Physics Letters*, 187(1,2), 73 - 76.
- Tao, W., Zeng, X., Wu, J., Zhu, X., Yu, X., Zhang, X., . . . Mei, L. (2016). Polydopamine-Based Surface Modification of Novel Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates for In Vivo Breast Cancer Targeting and Enhanced Therapeutic Effects. *Theranostics*, 6(4), 470-484. doi:10.7150/thno.14184
- Taurozzi, J. S., Hackley, V. A., & Wiesner, M. R. (2011). Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment--issues and recommendations. *Nanotoxicology*, 5(4), 711-729. doi:10.3109/17435390.2010.528846
- Thomas, J., & Gemming, T. (2013). *Analytische Transmissionselektronenmikroskopie - Eine Einführung für den Praktiker*. Wien: Springer-Verlag.
- Tomankova, K., Horakova, J., Harvanova, M., Malina, L., Soukupova, J., Hradilova, S., . . . Kolarova, H. (2015). Reprint of: Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro. *Food Chem Toxicol*, 85, 20-30. doi:10.1016/j.fct.2015.10.012
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., & Hiai, H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*, 358(1), 1-3. doi:10.1016/0014-5793(94)01368-B
- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, 8(7), 579-591. doi:10.1038/nrd2803
- Ukaji, E., Furusawa, T., Sato, M., & Suzuki, N. (2007). The effect of surface modification with silane coupling agent on suppressing the photo-catalytic activity of fine TiO₂ particles as inorganic UV filter. *Applied Surface Science*, 254(2), 563-569. doi:10.1016/j.apsusc.2007.06.061
- Uyanik, M. (2008). *Synthesis and Characterization of TiO₂ Nanostars*. Universität Saarbrücken, Verwey, E. J. W., & Overbeek, J. T. G. (1948). Theory of the stability of lyophobic colloids -. *Elsevier Publishing Company, Inc*.
- Waite, H. J. Q., Xiaoxia. (2001). Polyphosphoprotein from the Adhesive Pads of *Mytilus edulis*. *Biochemistry* 2001, 40, 2887-2893.
- Wang, S., Zhao, X., Wang, S., Qian, J., & He, S. (2016). Biologically Inspired Polydopamine Capped Gold Nanorods for Drug Delivery and Light-Mediated Cancer Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(37), 24368-24384. doi:10.1021/acsami.6b05907
- Xu, Q., Kong, Q., Liu, Z., Zhang, J., Wang, X., Liu, R., . . . Cui, G. (2014). Polydopamine-coated cellulose microfibrillated membrane as high performance lithium-ion battery separator. *RSC Advances*, 4(16). doi:10.1039/c3ra45879b
- Yin, J. J., Liu, J., Ehrenshaft, M., Roberts, J. E., Fu, P. P., Mason, R. P., & Zhao, B. (2012). Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes--generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 263(1), 81-88. doi:10.1016/j.taap.2012.06.001

Yin, Z. F., Wu, L., Yang, H. G., & Su, Y. H. (2013). Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. *Phys Chem Chem Phys*, 15(14), 4844-4858. doi:10.1039/c3cp43938k

Youssef, Z., Arnoux, P., Colombeau, L., Toufaily, J., Hamieh, T., Frochot, C., & Roques-Carnes, T. (2017). *Comparison of two procedures for the design of dye-sensitized nanoparticles targeting photocatalytic water purification under solar and visible light* (Vol. 356).

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Kristallstrukturen von Anatas, Rutil und Brookit.....	2
Abbildung 2:	Beziehung zwischen ROS-Level und Tumor nach Cairns et al.	5
Abbildung 3:	Unterschiedliche Toleranz der Zellen gegenüber weiterem ROS-Anstieg nach Akhtar et al.	6
Abbildung 4:	Strukturformel von APTES.	7
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Silanisierung von TiO ₂ mit APTES.	8
Abbildung 6:	Strukturformel von Dopamin mit Katechol- und Amingruppe.	8
Abbildung 7:	Schematische Darstellung einer möglichen Funktionalisierung mit PDA bei pH 8,5.	9
Abbildung 8:	Strukturformel von Polyethylenglycol (PEG).	10
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der Funktionalisierung von PDA beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln mit PEG-SH.....	11
Abbildung 10:	Abgrenzung der lebenden von den toten Zellen durch das Setzen sog. Gates bei a Splenozyten, b LPS stimulierte Splenozyten, c Panc02, d MOPC Zellen.	19
Abbildung 11:	XRD Auswertung der vier TiO ₂ Nanopartikelproben.....	43
Abbildung 12:	SEM-Aufnahmen von unbeschichteten TiO ₂ -Partikeln mit deutlicher Aggregatsbildung.....	44
Abbildung 13:	Gegenüberstellung des Einflusses von Ultraschallbad und Ultraschalltip auf die Größe der Partikelaggregate.....	45
Abbildung 14:	Gegenüberstellung der TiO ₂ Nanopartikelkonzentrationen.....	46
Abbildung 15:	Einfluss von Salzen auf die Größe und das Zetapotential der TiO ₂ Nanopartikel.	47
Abbildung 16:	Einfluss von 0,1 mM KCl auf Größe und Zetapotential aller vier Proben.....	48
Abbildung 17:	Einfluss von Citrat unter verschiedenen pH-Werten und Konzentrationen auf die Größe und das Zetapotential der TiO ₂ Nanopartikel.	49
Abbildung 18:	Einfluss von Ultraschalltip auf das Kontrollieren der Nanopartikelaggregate.....	50
Abbildung 19:	Einfluss der Nanopartikelkonzentration auf das Kontrollieren der Aggregate.....	51
Abbildung 20:	Einfluss von Magnetrührtechniken auf die APTES-Funktionalisierung.....	52
Abbildung 21:	Einfluss von unterschiedlichen APTES Konzentrationen (2% und 10 % APTES) und Waschprozessen (Zentrifuge und Dialyse).	53
Abbildung 22:	APTES Beschichtung unter 2 % APTES, 3 d Magnetrührer bei 40 °C und anschließender Zentrifugenbehandlung.	54
Abbildung 23:	Größen- und Zetapotentialmessung nach Zugabe von Tween 80.	55

Abbildung 24:	Größen- und Zetapotentialmessung der APTES Beschichtung bei 120 °C.	56
Abbildung 25:	FT IR-Messung der mit APTES beschichteten Partikel.	57
Abbildung 26:	Ergebnis der Kontrolle der Nanopartikelaggregate nach Zugabe von Tris Base mit pH 8,5.....	59
Abbildung 27:	Einfluss von Ultraschall auf die Beschichtung mit Dopamin.	59
Abbildung 28:	Gegenüberstellung von Größe (a) und Zetapotential (b) nach Beschichtung mit Dopamin.	60
Abbildung 29:	SEM Aufnahmen von allen PDA-Beschichtungen der TiO ₂ Proben mit unterschiedlicher Dopaminkonzentration.....	61
Abbildung 30:	STEM-Aufnahme von PDA beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln mit 0,2 mg/ml, 0,6 mg/ml und 1 mg/ml Dopamin.	62
Abbildung 31:	FT IR Charakterisierung der PDA-Beschichtung mit 0,6 mg/ml Dopamin (anhand TiO ₂).	62
Abbildung 32:	Abbaustudie von PDA-Beschichtung bei einem pH-Wert von 5.	64
Abbildung 33:	Charakterisierung der Polymerfunktionalisierung mit PEG-SH.....	65
Abbildung 34:	FT IR Charakterisierung der PEG-SH-Beschichtung (anhand TiO ₂).	66
Abbildung 35:	PMO _x -SH Proben nach 22h auf dem Magnetrührer.	67
Abbildung 36:	PG-SH Proben nach 22 h auf dem Magnetrührer.	67
Abbildung 37:	Einfluss von PBS mit pH 7 auf (un-)beschichtete TiO ₂ Nanopartikel im zeitlichen Verlauf von 48 h.	68
Abbildung 38:	Auswirkung von unbeschichteten TiO ₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.....	74
Abbildung 39:	Auswirkung von PEG-SH beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.	76
Abbildung 40:	Auswirkung von PDA beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.	78
Abbildung 41:	Auswirkung von APTES beschichteten TiO ₂ Nanopartikeln auf Zellzahl und Vitalität von Zellen.	80
Abbildung 42:	Schematische Darstellung der ultraschallwelleninduzierten Kavitation und des Agglomeratbruchs nach Taurozzi et al.	81
Abbildung 43:	Schematische Darstellung des elektrokinetischen Potentials (Zetapotential) bei unterschiedlichen pH-Werten nach Rouster et al.	85

8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	Die vier verwendeten TiO ₂ Nanopartikel.....	13
<i>Tabelle 2:</i>	Parameter für V. 2.3.1.1 (Ultraschallbad).....	20
<i>Tabelle 3:</i>	Parameter für V.2.3.1.1 (Ultraschalltip).....	21
<i>Tabelle 4:</i>	Parameter für V. 2.3.1.2.....	21
<i>Tabelle 5:</i>	Parameter für die Herstellung der Suspensionen für die Überprüfung des Einflusses von Salzen.....	22
<i>Tabelle 6:</i>	Parameter für die Herstellung der Suspensionen für die Überprüfung des Einflusses von KCl.....	23
<i>Tabelle 7:</i>	Parameter für die Herstellung der Suspensionen für die Überprüfung des Einflusses von Citrat.....	24
<i>Tabelle 8:</i>	Parameter für V. 2.3.4.1 (Einfluss von Ultraschalltipbehandlung).....	25
<i>Tabelle 9:</i>	Parameter für V. 2.3.4.1 (Einfluss von TiO ₂ Nanopartikelkonzentration).....	26
<i>Tabelle 10:</i>	Parameter für V. 2.3.4.2.....	26
<i>Tabelle 11:</i>	Parameter für V.2.3.4.3 (Einfluss von APTES-Konzentration).....	27
<i>Tabelle 12:</i>	Parameter für V. 2.3.4.3 (Einfluss des Waschprozesses).....	28
<i>Tabelle 13:</i>	Parameter für ersten Versuch der APTES-Beschichtung.....	29
<i>Tabelle 14:</i>	Parameter für die Herstellung der Suspensionen zur Überprüfung des Einflusses des pH-Wertes auf die Beschichtung mit Dopamin (exemplarische Rechnung für pH 2).....	31
<i>Tabelle 15:</i>	Parameter für V. 2.3.5.2.....	32
<i>Tabelle 16:</i>	Einteilung der zwei Gruppen für den Einfluss von Ultraschall auf die Beschichtung mit Dopamin.....	33
<i>Tabelle 17:</i>	Einteilung der drei Gruppen für Abbaustudie von PDA-Beschichtung bei pH 5.....	34
<i>Tabelle 18:</i>	Parameter für V.2.3.6.1.....	35
<i>Tabelle 19:</i>	Zuordnung der Peaks zu Wellenlängen und anschließende Interpretation (APTES).....	57
<i>Tabelle 20:</i>	Zuordnung der Peaks zu Wellenlängen und anschließende Interpretation (Dopamin).....	63
<i>Tabelle 21:</i>	Zuordnung der Peaks zu Wellenlängen und anschließende Interpretation (PEG-SH).....	66
<i>Tabelle 22:</i>	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aufspaltung der Nanopartikelaggregate.....	69

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Groll für die Möglichkeit der Promotion an seinem Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde bedanken.

Frau Dr. Krystyna Albrecht-Groll danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die wissenschaftliche Anleitung und fachliche Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Sonja Horvat, die mich sowohl während der praktischen Durchführung der Partikelbeschichtung als auch der anschließenden Niederschrift unterstützt hat. Durch ihre Mithilfe, Ratschläge und ständiges Engagement trug sie maßgeblich zu dieser Arbeit bei.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Tim Steinfatt bedanken, der mir innerhalb der Tätigkeiten im Rahmen der Zellversuche enorm zur Seite stand.

Anschließend möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des FMZ und der Beilhack-AG für ihre Hilfe bei der Versuchsdurchführung und Ergebnisauswertung bedanken.

Zuletzt danke ich natürlich meiner Familie und meinem Freund für die tatkräftige Unterstützung und den psychischen Beistand während meiner Dissertation und meiner Schwester für das Korrekturlesen dieser Arbeit.