

„Auswirkungen synthetischer Nanomaterialien auf den Menschen - NanoCare“  
innerhalb des Rahmenprogramms  
„Werkstoffinnovationen für Industrie und Gesellschaft – WING“

**Abschlussbericht Januar 2014**



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

Zuwendungsempfänger: <b>IPHT Jena</b>	Förderkennzeichen: <b>03X0104E</b>
Vorhabensbezeichnung: <b>Toxikologische Charakterisierung von Nanomaterialien für die diagnostische Bildgebung in der Medizin – NanoMed</b>	
Laufzeit des Vorhabens:	01.09.2010 – 31.08.2013
Berichtszeitraum:	01.09.2010 – 31.08.2013

**Teilprojekt Nr. 5**

**Antragsteller**

**Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT) e.V.**

PF 100239  
07745 Jena

**Ansprechpartner**

**PD Dr. Wolfgang Fritzsche**

Tel.: 03641-206304

Fax.: 03641-206344

E-Mail: [wolfgang.fritzsche@ipht-jena.de](mailto:wolfgang.fritzsche@ipht-jena.de)



## Teil I

### Aufgabestellung

Ziel des IPHT-Teilprojektes im Projekt Nanomed war die Herstellung und Charakterisierung von magnetischen und metallischen Nanopartikeln als Kerne für Kern-Hülle-Strukturen für die geplanten Toxizitätsprüfungen und für die von den Antragstellern verfolgten unterschiedlichen Ziele und Anwendungen. Durch eine Standardisierung der Synthesemethoden sollte eine einheitliche Basis für die Umhüllung der Partikel geschaffen werden. Verschiedene Partikelchargen wurden den Partnern zur Umhüllung mit Polymeren und Funktionalisierung bereitgestellt. Weiterhin wurde die Wirkung der Partikelgröße und bei Magnetpartikeln der Dotierungen auf anwendungsrelevante Eigenschaften (z.B. Bildgebungskontrast) mit den Projektpartnern untersucht. Die funktionelle Umhüllung und deren Testung auf Kompatibilität der Metallpartikel soll validiert werden. Vergleichende magnetische Messungen an Eisenoxidpartikeln sollten die Quantifizierung der Partikel aus Versuchen zum Transportverhalten über biologische Schranken mittels eines Durchflussgeräts ermöglichen, welches in ein Plazenta-Perfusionsexperiment zu integrieren war.

### Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Arbeitsgruppe am IPHT verfügt über ein breites Erfahrungsspektrum zu Herstellung, Eigenschaften und Anwendungen verschiedener magnetischer Materialien, insbesondere von oxidischen, nanokristallinen Materialien, Herstellung von Ferrit- bzw. Eisenoxidpartikeln und Ferrofluiden, aber auch zur Synthese, Biofunktionalisierung, der Charakterisierung und dem bioanalytischen Einsatz von metallischen (insbesondere Au und Au/Ag) Nanopartikeln sowie deren strukturellen, optischen und magnetischen Charakterisierung [1]. Die Herstellung erfolgte nach der Glaskristallisationsmethode (Ferrite) oder nasschemischen Fällungsmethoden (Eisenoxid mit unterschiedlichen Eigenschaften) bzw. Reduktion der Metallsalze zur Bildung kolloidaler Lösungen (Au, Ag). Untersuchungen zum Verständnis von magnetischen Eigenschaften von Partikelsystemen im relevanten Korngrößengebiet (Übergang vom stabilen ferrimagnetischen zum superparamagnetischen Zustand, 10 bis 50 nm) wurden am Ba-Ferrit-System  $\text{BaFe}_{12-2x}\text{Co}_x\text{Ti}_x\text{O}_{19}$  mit großer Kristallanisotropie durchgeführt [2]. Aus superparamagnetischen Ba-Ferritpulvern und Eisenoxidpartikeln wurden Ferrofluide hergestellt und strukturell (Korngröße, Agglomeratgröße) sowie magnetisch untersucht [3, 4]. Von besonderem Interesse waren magnetische Untersuchungen, die Aussagen zur Korngrößenverteilung (Lösung der Langevin-Gleichung) oder zum Relaxationsverhalten erlauben. Durch die Auswahl der Synthesebedingungen (Art und Menge der Reduktionsmittel, Oberflächen-Detergenten) können Form und Größe der Partikel bestimmt werden. Material, Form und Größe sind bei plasmonischen Partikel (Au, Ag, Pt, Pd) ausschlaggebend für die optischen Eigenschaften. Für verschiedene bioanalytische Anwendungen werden vor allem DNA-funktionalisierte Partikel benutzt. Zudem wurde in zahlreichen Untersuchungen die korrelative Detektion und Charakterisierung dieser Partikel auf Einzelpartikelebene mittels AFM und optischer

Dunkelfeldanregung etabliert und durch Mikrospektroskopie (ebenfalls auf Einzelpartikelebene) ergänzt.

Bislang wurde auf dem Gebiet der metallischen Nanopartikel einerseits zu verschiedenen neuartigen Detektionsansätzen für die DNA-Chiptechnologie geforscht, die einen optischen oder elektrischen Nachweis erlauben [5-9]. Andererseits wurde eine Methode zur optischen Manipulation von genetischem Material mittels Laserpulsen entwickelt [10], die auf den besonderen optischen Eigenschaften der Partikel beruht, die durch lokalisierte Oberflächenplasmonenanregung (LSPR) erklärt werden kann [11]. Jüngere Arbeiten der Gruppe konzentrieren sich auf die Selektion der plasmonischen Nanopartikel mit bestmöglichen Eigenschaften als optischen Marker für die Bioanalytik und die Nanomedizin, sowie als optische Transducer für die Sensorik. Dabei zeigen insbesondere die Kern-Hülle-Partikel ein hohes Potential für die sogenannte LSPR Sensorik [12].

Das IPHT verfügt über physikalische und chemische Labore mit der entsprechenden Grundausstattung zur Synthese und Funktionalisierung von metallischen und oxidischen Nanopartikeln über chemische Methoden sowie ihrer grundlegenden Charakterisierung mittels AFM, REM, TEM (externe Messzeit), XRD, optischer (Fluoreszenz-) Mikroskopie, UV/VIS-Spektroskopie und Mikrospektroskopie. Weitere Materialeigenschaften können mittels DTA/TG, Dilatometrie, Vibrationsmagnetometrie, und Dynamischer Lichtstreuung bestimmt werden. Zusätzlich stehen für die theoretischen Berechnungen der optischen Eigenschaften der plasmonischen Nanostrukturen Rechenkapazität zur Verfügung. Auch bioanalytische Nachweistechiken, wie SPR sind etabliert.

Bereits vor dem Start des Projekts bestanden Kooperationen zu den Partnern 4/2, 4/3, 4/5, und 4/8.

## **Planung und Ablauf**

Planung und Ablauf des Projekts wurde in enger Absprache mit den Kooperationspartnern durchgeführt. Das betraf vor allem die rechtzeitige Bereitstellung von Nanopartikeln für andere Partner inklusive der Abstimmung zu geplanten Partikeleigenschaften und Arbeiten, die in Verbindung mit den aufwändigen und relativ selten durchführbaren Plazenta-Perfusionsexperimenten (sehr kurzfristige Planung, je nach „spontaner Bereitstellung“ der Plazenten) und Tierversuchen (festgelegte Planung durch Partner je nach Tieraufzucht) der Partner standen. Alle technischen Parameter zur Partikelquantifizierung in Perfusionsexperimenten wurden an einem Phantomsystem (ohne Plazenta) am IPHT vorgetestet.

Die Charakterisierung (unterschiedliche Methoden) der eigenen als auch von Partnern bereitgestellten Partikel lief über den gesamten Projektzeitraum.

## **Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Die meisten Arbeiten zur Partikelpräparation (Kerne, primäre Hülle) erfolgten nach bekanntem Literaturstand [13, 14] bzw. eigenen, aber bereits veröffentlichten Methoden (15-17). Arbeiten zu speziellen Umhüllungen/Modifizierungen oder Materialkombinationen (z.B. BaSO<sub>4</sub>-Au) betreffen eigenes, nicht veröffentlichtes Know-how.

Alle Charakterisierungsmethoden - außer der magnetischen Messung im Durchfluss mittels MagnetReader - basieren auf kommerziellen Geräten. Jedoch mussten für VSM-Messungen und XRD-Untersuchungen spezielle Probenpräparationsverfahren entwickelt und Messbedingungen getestet werden, um den Spezifika der Proben (Partikelkonzentrationen) gerecht zu werden.

Der von Partner HTS bereitgestellte Magnetreader basiert auf Arbeiten zu dem Projekt 16IN0244, Forschungszentrum Jülich, 2007 (H.-J. Krause "Biomagnetsensor für die point-of-care-Diagnostik", Schlussbericht) und wurde für unsere Messaufgaben modifiziert (siehe Teilprojekt 3).

## **Zusammenarbeit**

Innerhalb des Nanomed-Projekts gab es eine intensive Zusammenarbeit zwischen den Partnern. Die wichtigsten Punkte betreffen:

- Bereitstellung von Partikeln für AG 4/2 (Heinze) zur weiteren Umhüllung, AG 4/1 (Fischer) und AG 4/8 (Clement) für biologische Tests, AG 4/6 (Bergmeier) für Tierversuche zur Biodistribution, AG 4/4 (Schleußner) für Perfusionsversuche, AG 4/5 (Hilger) für Kontrastmittelversuche zur Bildgebung
- Untersuchung und Selektion der chemischen Methoden für die Umhüllung der Nanopartikel AG 4/2 (Heinze)
- Test der Hardware-Modifikationen am Magnetreader von Partner 3 (HTS)
- Integration des Magnetreaders in das Perfusionsexperiment mit AG 4/4 (Schleußner) und Partner 3 (HTS) und Messungen damit mit AG 4/4
- Magnetische und z.T. strukturelle Charakterisierung von Partikeln der Partner 1 (chemicell), Partner 2 (Chemagen) und AG 4/2 (Heinze)
- Quantifizierung von Partikeln in biologischen Proben von AG 4/6 (Bergmeier) für die Biodistribution und AG 4/4 (Schleußner) für Perfusionsversuche
- Nachweis von Partikeln in großen Plazenta-Gewebeproben mittels MRX bei AG 4/3 (Seidel)

Außerhalb des Projekts gab es eine Zusammenarbeit mit

F. Wiekhorst (Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Berlin): Magnetic Particle Spectroscopy an Gewebeproben für die Biodistribution

H. Rahn (Institut für Strömungsmechanik, TU Dresden): orts aufgelöster Partikelnachweis in großen Plazenta-Gewebeproben mittels Röntgentomographie

M. Leiterer (Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena): quantitative Analyse mittels ICP-MS

## **Referenzen**

- [1] Müller, R.; Hergt, R.; Dutz, S.; Zeisberger, M.; Gawalek, W.; J. Phys.: Condens. Matter 18 (2006) S2527-S2542
- [2] Schüppel, W.; Müller, R.; Ulbrich, C.; Steinmetz, H.; "Magnetic Oxide Particles Prepared by Glass Crystallization - Properties and Applications" in "Scientific and

- Clinical Applications of Magnetic Carriers”, Plenum Press (Eds. U. Häfeli u.a.), New York, London 1997, S. 109-115
- [3] Hoell, A.; Müller, R.; Heinemann, A.; Wiedenmann, A.; *Magnetohydrodynamics* 39 (2003) 1, 109-116
  - [4] Müller, R.; Hiergeist, R.; Gawalek, W.; Hoell, A.; Wiedenmann, A.; *J. Magn. Magn. Mater.* 252 (2002) 43-45
  - [5] Reichert, J.; Csaki, A.; Kohler, J. M.; Fritzsche, W.; *Anal. Chem.* 2000, 72, (24), 6025-6029
  - [6] Möller, R.; Csaki, A.; Köhler, J. M.; Fritzsche, W.; *Langmuir* (2001) 17, 5426-5430.
  - [7] Csaki, A.; Kaplanek, P.; Möller, R.; Fritzsche, W.; *Nanotechnology* 2003, 14, 1262-1268
  - [8] Fritzsche, W.; *J Biotechnol* 2001, 82, (1), 37-46
  - [9] Fritzsche, W.; Taton, T. A.; *Nanotechnology* 2003, 14, R63-R73
  - [10] Csaki, A.; Garwe, F.; Steinbrück, A.; Maubach, G.; Festag, G.; Weise, A.; Riemann, I.; König, K.; Fritzsche, W.; *Nano Lett.* 2007, 7, (2), 247 - 253
  - [11] Steinbrück, A.; Csaki, A.; Festag, G.; Fritzsche, W.; *Plasmonics* 2006, 1 (1), 79-85
  - [12] Csáki, A.; Berg, S.; Jahr, N.; Leiterer, C.; Schneider, T.; Steinbrück, A.; Zopf, D.; Fritzsche, W., *Plasmonic Nanoparticles - Noble Material for Sensoric Applications.* In *Gold Nanoparticles: Properties, Characterization and Fabrication*, Chow, P. E., Ed. Nova Science Publishers: 2010; pp 245-261
  - [13] Frens, G.; *Nat. Phys. Sci.* Vol. 241 1973, 20-22
  - [14] Turkevich, J., Stevenson, P. L. & Hiller, J. 1951. *Discuss. Faraday Soc.*, 11, 55-75.
  - [15] Dutz, S.; Andrä, W.; Hergt, R.; Müller, R.; Oestreich, Ch.; Schmidt, Ch.; Töpfer, J.; Zeissberger, M.; Bellemann, M.E.; *J. Magn. Magn. Mater.* 311, 51-54 (2007)
  - [16] Knauer, A.; Thete, A.; Li, S.; Romanus, H.; Csáki, A.; Fritzsche, W.; Köhler, J. M.; *Chem. Engineering Journal* 2011, 166, (3), 1164-1169.
  - [17] Knauer, A.; Csaki, A.; Moller, F.; Huhn, C.; Fritzsche, W.; Kohler, J. M.; *J. Phys. Chem. C* 2012, 116, (16), 9251-9258.

## Teil II.

### **Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse**

Der Schwerpunkt der Arbeiten am IPHT lag bei der Bereitstellung von Partikelproben (Edelmetallnanopartikel, magnetische Nanopartikel) für weitergehende Versuche bei den Projektpartnern, Untersuchungen zur Beurteilung bzw. messtechnische Verbesserungen der Methoden zur Nachweisbarkeit und Quantifizierung von Nanopartikeln in biologischen Proben (den MagnetReader), Anpassung der optischen Eigenschaften der Metallpartikelkerne in biologischen Proben und Voruntersuchungen zum Transport von Magnetpartikeln in Gewebe z.T. in Gegenwart eines statischen Magnetfelds.

Die Ergebnisse sind nach Arbeitspaketen geordnet.

<b>AP 1.1.1.</b>	<b>Magnetische Nanopartikel</b>
------------------	---------------------------------

Magnetische Eisenoxidpartikelcluster bis ca. 50 nm Größe wurden durch langsame alkalische Fällung ( $\text{NaHCO}_3$  oder  $\text{KOH}$ ) aus Eisenchloridlösungen ( $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ ) hergestellt. Danach wird die Probe gekocht und nach dem Abkühlen mit destilliertem Wasser gewaschen.

Für die Standard-Umhüllung wird die Partikelsuspension angesäuert und mit Ultraschall behandelt. Die Probe wird auf  $45^\circ\text{C}$  erhitzt und in Wasser gelöstes Carboxymethyldextran (CMD) zugegeben. Nach einer Stunde wird die Proben einmal mittels Magnetseparation gewaschen, um Salze und CMD-Überschuss zu entfernen.

Sowohl Kristallit- als auch Clustergröße haben einen Einfluss auf die magnetischen Eigenschaften (magnetisches Moment der Einzelpartikel, Koerzitivfeldstärke). Diese als auch unumhüllte Partikel wurden der AG Heinze zur weiteren Verarbeitung, d.h. weiterer Umhüllung mit PolyDADMAC und CMD, übergeben (NM\_D008).

Zwei Suspensionen mit CMD-umhüllten Eisenoxidpartikeln unterschiedlicher magnetischer Härte wurden zur Testung des Magnetreaders hergestellt und Partner 3 (HTS) für Vergleichsmessungen (AP 4.2.) übergeben.

Für Tierexperimente am Schaf mit Multicore-Nanopartikelproben (keine magnetischen Polymer-Beads aus Teilprojekt 1) wurden magnetische Eisenoxidcluster unter sterilen Bedingungen mit CMD-Hülle hergestellt (NM\_D017; in Kooperation mit AG Heinze), bzw. nicht umhüllte Kerne an AG Heinze übergeben (NM\_D016). Für die Herstellung von NM\_017 wurde steriles Wasser verwendet und die Suspension anschließend gefiltert.

Der AG Hilger wurde eine Partikelsuspension (CMD-umhüllte Eisenoxid-Partikel NM\_D007) zur Untersuchung der bildgebenden Eigenschaften übergeben.

Eine neue Partikelsuspension (unumhüllte paramagnetische Mangan-haltige Partikel nach der Glaskristallisationsmethode) wurde zur Herstellung eines Kontrastphantoms zur Untersuchung der bildgebenden Eigenschaften übergeben, nachdem selbst Sn-

dotierte Ba-Ferrit-Partikel ( $\text{BaFe}_{12-2x}\text{Co}_x\text{Sn}_x\text{O}_{19}$ ) keinen befriedigenden CT-Kontrast lieferten. Das bedeutet, aus der Gruppe der Spinell- und der Hexaferrite können keine geeigneten Kontrastmittel mit gleichzeitigem CT- und MRT-Kontrast gewonnen werden.

<b>AP 1.1.3.</b>	<b>Metall-Nanopartikel</b>
------------------	----------------------------

Am IPHT wurden Metall-Nanopartikel-Kerne (Gold- und Silber-Nanopartikel) durch Reduktion der Metallsalze mit Kerndimensionen von 12-15 nm bis 60-80 nm nach der Standard-Citratsynthese (siehe Ref. [13] und [14], Teil I) hergestellt. Dabei wurden die Anforderungen an die Partikel in diesen Versuchen berücksichtigt. Es wurden Partikel unterschiedlichen Kerngrößen, aber gleicher Partikelform (sphärisch) und Oberflächenchemie (Zitrathülle) hergestellt. Die Variation der Größe erfolgt über die eingesetzte Menge an Reduktionsmittel. Es wurden Kerndimensionen von ca. 15 nm, 35 nm, 45 nm und 60-80 nm (NM\_D005, NM\_D006, NM\_D010, NM\_D011, NM\_D012 und NM\_D006) ausgewählt, die z.B. die Überwindung der Plazenta-Schranke theoretisch erlauben bzw. behindern, um die Hämokompatibilitätseigenschaften grob zu klassifizieren. Die Proben wurden anschließend den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt (AG Fischer - 4/1, AG Heinze – 4/2, AG Schleußner - 4/4).

Ergebnisse zu Partikeln aus AP 1.1.3. (Beispiel)

NM\_D005: Au 15 nm aus Standard-Citratsynthese, wässrige kolloidale Lösung  
Kerngröße: 16 nm (UV-VIS), **15,1±0,74 nm (TEM)** (Abb. 1), 16,3 nm ( $\text{DLS}_{\text{vol}}$ ), 19,1 nm ( $\text{DLS}_{\text{in}}$ )

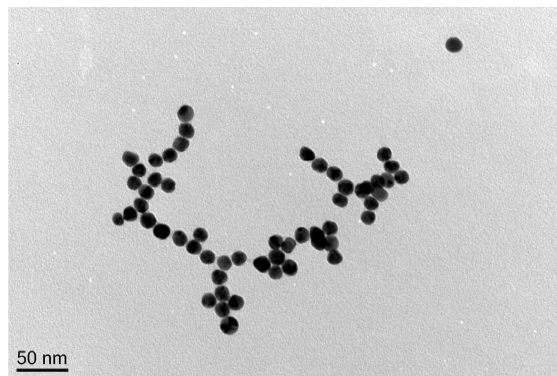


Abb. 1: TEM-Aufnahme von Au NM\_D005

Der AG Hilger wurde eine Partikelsuspension (mit Au-Nanopartikeln < 10 nm umhüllte  $\text{BaSO}_4$ -Partikel im sub- $\mu\text{m}$ -Bereich, Au-Gehalt ca. 0,3%) zur Herstellung eines Kontrastphantoms zur Untersuchung der bildgebenden Eigenschaften übergeben. Die Probe wurde strukturell charakterisiert (Abb. 2a und b).

$\text{BaSO}_4$ -Au-NP erreichen einen etwas höheren Kontrast als die präklinischen Kontrastmittel ExiTron™ nano 6000 und AuroVist™ (15 nm).

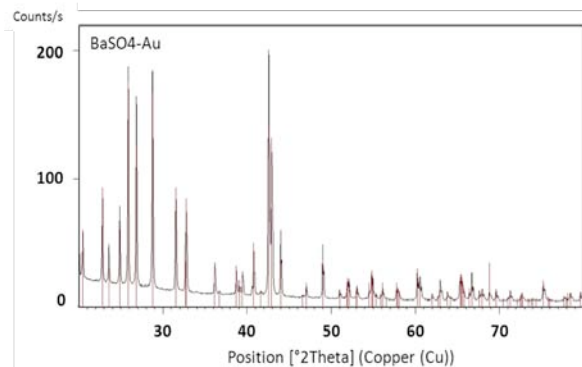
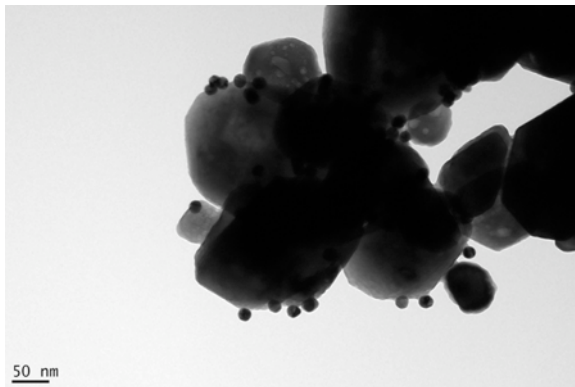


Abb.2a und b: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme der Gold-BaSO<sub>4</sub>-Partikel und XRD-Spektrum (rechts).

Für den AP 3.3/4.2 wurden neu synthetisierte Au-Nanopartikeln (Durchmesser ~ 60 nm) für die Perfusionsversuche aufkonzentriert, sowie Silber-Dreiecksprismen mit einem spektralen Maximum ( $\lambda_{\text{max}} \sim 730 \text{ nm}$ ) abweichend von der Hämoglobin-Resonanz ( $\sim 540 \text{ nm}$ ) synthetisiert (Abb.3) um eine online Quantifizierung durch die spektrale Eigenschaften realisieren zu können.

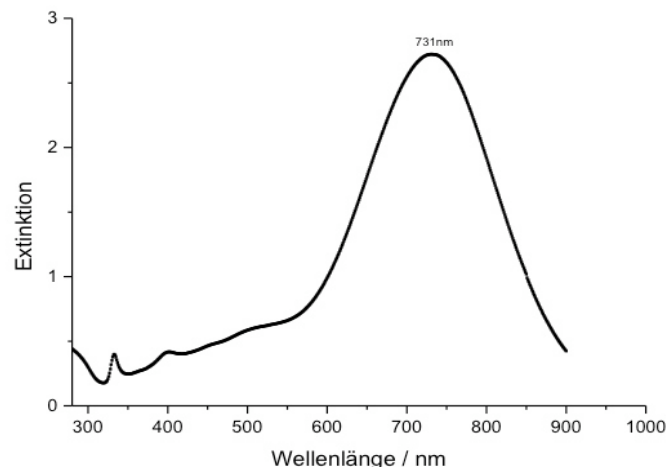


Abb.3: Spektrum der Silber-Dreiecksprismen für die geplante Plazentaperfusion.

#### Versuche zur Optimierung der Charakterisierungsmethode

Eine wichtige Methode zur morphologischen Partikelcharakterisierung ist die Röntgenbeugung (XRD), die neben dem Phasenbestand Aussagen zur Kristallitgröße erlaubt (Scherrer-Formel). Für einkristalline Partikel entspricht diese der Partikelgröße. Im Gegensatz zu Magnetpartikeln werden die Edelmetallpartikel nur im 10- bis 20-mg-Chargen in geringen Konzentrationen hergestellt, sodass für XRD-Messungen nur extrem geringe Probenmengen zur Verfügung stehen. Erste Untersuchungen bezogen sich auf die minimale Partikelmenge, die für XRD-Messungen nötig sind. Es zeigte sich, dass für eine Größenauswertung, d.h. konstante Halbwertsbreite der Peaks etwa  $10^{10}$  Partikel (bei kleineren NP mehr) nötig sind, was ca. 0,5 ml der Ausgangslösung nach der Herstellung entspricht.

**AP 1.2.2. Magnetische Charakterisierung**

Magnetpartikel wurden magnetisch charakterisiert, um deren Qualität (der magnetischen Phase) beurteilen zu können, und um Referenzdaten für eine Partikel-Quantifizierung in Partikelsuspensionen und biologischen Proben (Partikelkonzentration) zu haben. Dazu wurden Partikelsuspension bzw. getrocknete Pulver mittels Vibrationsmagnetometer (VSM) gemessen. Die Qualität wird durch die Koerzitivfeldstärke  $H_C$  in kA/m (Einfluss der Partikelgröße) und die spezifische Sättigungsmagnetisierung  $\sigma$  in  $\text{Am}^2/\text{kg}$  (Einfluss der magnetischen Phase  $\text{Fe}_x\text{O}_y$  bzw. unmagnetischen „Verdünnung“ durch Hüllmaterial, Fremdphasen oder biologisches Material) beschrieben. Neben allen eigenen Partikelproben wurden auch Partikel der Partner 1, 3 und 4/2 untersucht. Siehe auch Arbeiten zur Quantifizierung AP 4.2.

Partikelsuspensionen und getrocknete Pulver der von AG Heinze mehrfach umhüllten Partikel NM\_D008 wurden zur Bestimmung der Konzentration und des wachsenden Hüllmaterialanteils magnetisch und mittels Thermogravimetrie (Masseverlust bei hohen Temperaturen) gemessen. Eine schrittweise Mehrfachumhüllung (drei Hüllen) zeigte sich durch eine entsprechende Abnahme der Magnetisierung.

Der Nachweis von magnetischen Nanopartikeln, und besonders deren Quantifizierung, stellt und stellte bei den im Projekt zu erwartenden extrem kleinen Partikelmengen bzw. -konzentrationen in biologischen Proben eine Herausforderung an die Messtechnik dar, die bis zur Auflösungsgrenze betrieben werden muss. Unter diesen Bedingungen werden (bei Messungen mit dem VSM) störende Effekte vom Probenhalter, Probenbehälter, geometrischen Faktoren immer stärker und müssen aus den Messdaten herausgerechnet werden. Die Quantifizierung erfolgt durch Berechnung des Verhältnisses der spezifischen Sättigungsmagnetisierungen (normiert auf Probenmasse) von Messprobe und reinem Magnetmaterial (Materialkonstante).

Um diese Effekte abschätzen zu können, wurden Messungen an einer Verdünnungsreihe einer Ferrofluidprobe mit einer Konzentration von ca. 0,8 % mit bis zu 256facher Verdünnung durchgeführt. Ab der Verdünnung 1/8 ist eine Überlagerung des ferrimagnetischen Partikelsignals durch diamagnetische Effekte von Probenhalter und Probenbehälter erkennbar. Diese Effekte müssen bei verdünnten Proben berücksichtigt werden, z.B. durch Bestimmung der Differenz des Gesamtsignals zum diamagnetischen Signals der Magnetisierungskurve.

VSM-Untersuchungen an Testproben aus dem Plazentalabor (AG Schlußner) vor und nach dem Passieren einer Plazenta wurden durchgeführt, um prinzipielle Fehlerquellen im Perfusionssystem (agglomerationsbedingte Sedimentation im Reservoir, Lecks) und den Verbleib der Partikel im Plazentagewebe zu erkennen. Dabei mussten probenspezifische Messprobleme berücksichtigt werden: mögliche Sedimentation der Partikel während der Messung, füllstandsabhängige Korrektur der Probenposition im Magnetfeld, Einfluss der Position und Größe des leeren Probenbehälters. Wenn es möglich war (dünnflüssige Proben), wurde eine Quantifizierung durch Anreicherung und Messung aller Partikel realisiert.

Für Untersuchungen zur Biodistribution musste geklärt werden, welchen magnetischen Beitrag in der Biologie übliche Substanzen liefern. Dazu wurden Messungen an Blut mit 4facher Konzentration an roten Blutkörperchen, dem eisenreichsten "Gewebe" im Körper, durchgeführt. Die Proben zeigen diamagnetisches Verhalten in der Größenordnung von Wasser.

Die Messungen an Perfusionsproben zeigten, dass sich nach dem Versuch die Mehrheit der Partikel nicht mehr im Reservoir befindet. Daraufhin wurden erstmals Gewebeproben (Plazenta mit Partikeln nach Perfusion) gefriergetrocknet und gemessen und die Partikelmenge in einem Kotelydo (Gewebebereich mit einheitlichem Gefäßsystem) bestimmt. Die Messungen legen eine inhomogene Partikelverteilung im Gewebe nahe, wie durch Magnetorelaxometrie und Röntgentomographie bestätigt wurde (siehe AP 4.2).

<b>AP 2.1.1.</b>	<b>Standardisierung der Nanopartikelkerne</b>
------------------	---

Die Arbeiten konzentrierten sich auf die Erstellung der Zertifikate für die synthetisierten Nanopartikelarten und die SOPs. Für eine Vergleichbarkeit der Partikellösungen wurde eine einheitliche Konzentrationsangabe diskutiert. Zusätzlich wurden Standard-Hüllenmaterialien definiert, die sich in der Oberflächenladung unterscheiden (siehe AP 2.1.2.). Diese wurden ohne Partikelkerne als auch gebunden an standardisierte Kerne untersucht. Die Partikeldaten wurden in die Projektdatenbank eingestellt.

<b>AP 2.1.2.</b>	<b>Funktionelle Polysaccharidhülle</b>
------------------	--

Nanopartikelkerne wurden mit einer Ligandenschicht aus Mercaptoundekansäure (MUA) umhüllt (AG Fritzsche), die für die Layer-by-Layer-Technik (AG Heinze) als Starterschicht diente. Nach den Umhüllungsversuchen durch AG Heinze wurden die verschiedenen Schritte der Umhüllung von Metall-Nanopartikelkernen mittels ultramikroskopischen Methoden, zeta-Potenzial-Messungen und SPR (siehe AP 2.2.2) charakterisiert.

Zusätzlich zu dem anionischen (MUA) und neutralen Hüllenmaterial (CMD) wurde die Umhüllung mit PEI als kationische und toxikologisch-relevante Schicht auf die Gold-Nanopartikel umgesetzt. Die Resultate der AP 3.1 zeigten besonders toxische Eigenschaften für kommerzielle Nanopartikel mit PEI-Umhüllung. Die Resultate der AP 2.2.2 (mit der SPR) deuteten auf eine verhältnismäßig einfache Bindungschemie und Kinetik der Bindung des PEI an Goldoberflächen. Nach einer Inkubation der Gold-Kerne mit PEI wurde der Umhüllungsprozess spektral, mit TEM (Abb.4), mit der DLS auf Ladung (Abb.5) und Größe untersucht und die Produkte charakterisiert.

Die Partikel konnten auch mit MUA-Cellulose in einem Schritt für Bioaffinitätstests umhüllt werden. Die PEI-umhüllten Nanopartikel wurden im Projekt für die Toxizitätsmessungen weitervermittelt.

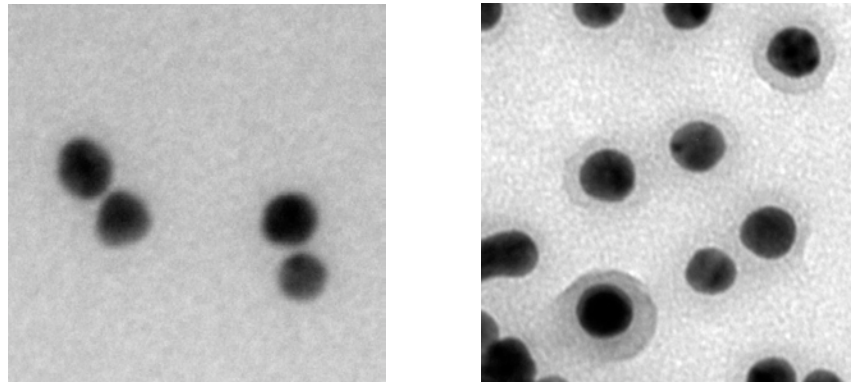


Abb.4: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen der Gold-Nanopartikel-Kerne (14 nm) vor (rechts) und nach der Umhüllung (links) (Kantenlänge jeweils 100 nm).

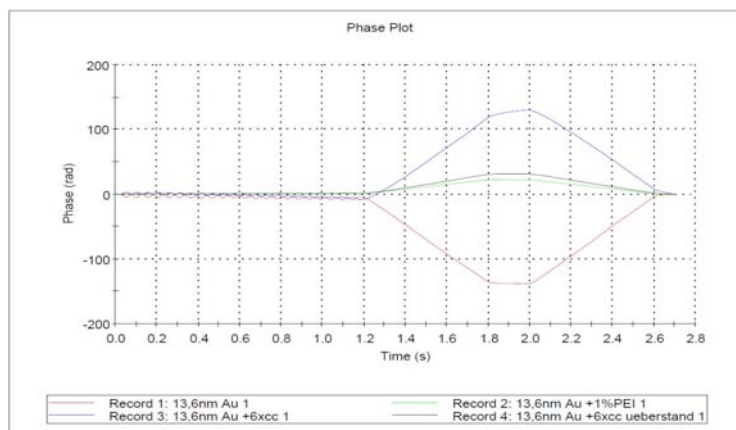


Abb.5: Die mit dem Zetasizer messbare Änderung der Oberflächenladung der Partikel deutet auf eine erfolgreiche PEI-Umhüllung hin.

<b>AP 2.2.1.</b>	<b>Hämokompatibilität</b>
------------------	---------------------------

Die Au-Partikelkerne NM\_D005 und D006 wurden in verschiedenen Medien (physiologische Lösungen, Nährmedien usw.) hinsichtlich ihres Sedimentationsverhaltens getestet und Umhüllungen am IPHT und bei Partnern erprobt. Die Wiederfindbarkeit der Nanopartikel in den biologischen Proben unter Einbeziehung der Partner aus der FSU (AG Fischer - 4/1, AG Heinze – 4/2, AG Schleußner - 4/4, AG Bräuer) wurde untersucht, insbesondere mittels Dunkelfeldmikroskopie und UV-VIS-Spektroskopie. Leider sind Nanopartikel kaum von den Bestandteilen der Perfusionslösungen optisch unterscheidbar. Eine Detektion der verwendeten Nanopartikel war wegen der hohen Streueffekt der Zellkompartimente und Gewebeproben extrem schwierig. Deswegen wurde eine autokatalytische Silberabscheidung für die Vergrößerung der Partikeldurchmesser und damit verbundene bessere Sichtbarkeit angewendet. Diese Signalverstärkung ermöglichte die histologische Lokalisierung der Nanopartikel in der Plazentagewebe.

**AP 2.2.2. Bioaffinitätstests**

Die verwendete Methode der SPR (*surface plasmon resonance*) zum Nachweis von Bindungsreaktionen organischer Moleküle auf Oberflächen basiert auf der Erzeugung propagierender Oberflächenplasmonen in dünnen Metallfilmen. Dieser Metallfilm, hier Gold, dient als Modelloberfläche für Bindungsstudien diverser chemischer Umhüllungsmethoden auf Metallnanopartikeln. Abb. 6 zeigt ein Grundschemata vom Bindungsverlauf während einer SPR-Messung. Der Verlauf (Anstieg) der Kurve gibt Hinweise über die Kinetik der Bindung. Nach dem Waschprozess kann die Stabilität der Bindung überprüft werden.

Die Versuche wurden mit einem SPR SR7000DC mit Zweikanal-Sensor von Reichert Analytical Instruments (Depew, NY, USA) durchgeführt.

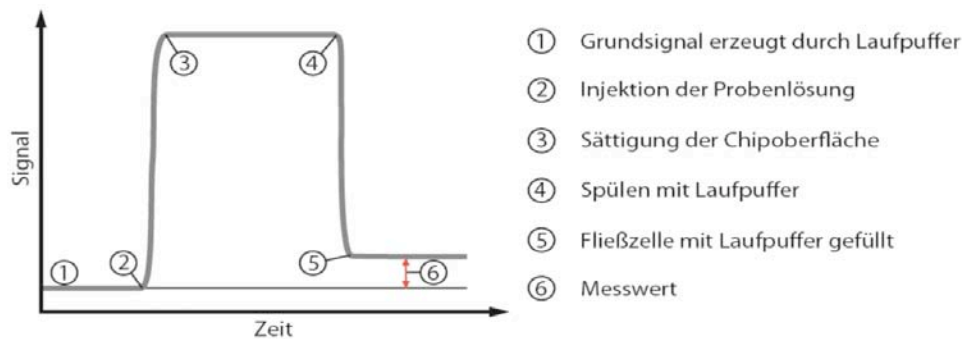


Abb. 6: Signal einer SPR-Messung mit Erklärung der Einzelschritte

Durch die SPR Technik konnten verschiedene Umhüllungsarten für die Metallnanopartikel auf deren Reaktionsdauer, Kinetik, Inkubationstemperatur und das notwendige Medium untersucht und optimiert werden. Die SPR Methode zeigt außerdem die Stabilität der erzeugten Modellschichten, die denen auf den Nanopartikeln chemisch gleich sind. Diese Methode kann für die Validierung der Umhüllungsmethoden verwendet werden. In erster Linie wurde die realisierte Layer-by-Layer Technologie der AG Heinze getestet (siehe Abb. 6a). Die erste Schicht aus Mercaptoundekansäure konnte nur mit einer Inkubationsdauer von 12-20 h stabil aufgebracht werden. Die Anbindung des PDADMAC und anschließend von CMD konnte mit kürzeren Reaktionszeiten realisiert werden.

Des Weiteren konnten mit der MUA-Cellulose (Abb. 7) und PEI Umhüllung weitere Methoden der AG Heinze zur Herstellung von Standardpartikel getestet werden. Diese Umhüllungen wurden mit einem Inkubationsschritt auf die Modelloberfläche stabil aufgebracht.

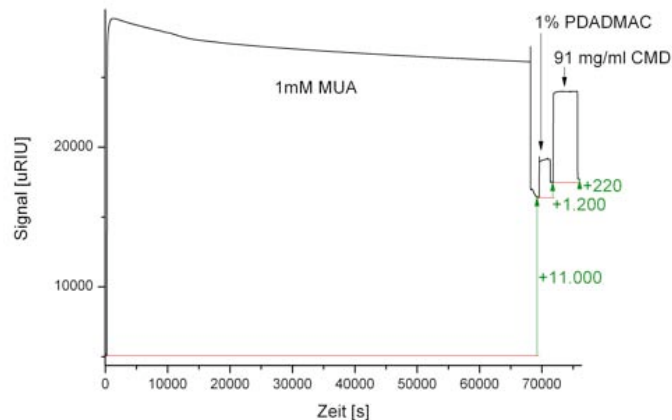


Abb. 7: Test der Polysaccharid-Umhüllung (AP 2.1.2, AG Heinze) mittels SPR.

#### AP 4.2. Quantifizierung der Nanopartikel

Die Arbeiten zur Quantifizierung magnetischer Nanopartikel konzentrierten sich auf die Punkte: Bestimmung der Partikel in einem strömenden Medium (Perfusionsflüssigkeit aus Plazentaversuchen, AG Schleussner) mittels Magnetreader sowie die Bestimmung mittels statischer VSM-Messungen (siehe AP 1.2.2.) an Blut-, Gewebe- u.a. Proben (AG Schwab). Bisher gibt es keine standardisierte Messmethode für in strömenden Medien. Das Messprinzip des Magnetreaders beruht auf der Auswertung der höheren Harmonischen als Antwort auf ein Gemisch von magnetischen Anregungsfeldern mit unterschiedlichen Frequenzen [H.-J. Krause "Biomagnetsensor für die point-of-care-Diagnostik", Final report Project 16IN0244, FZ Jülich, 2007]. Zur Verringerung der (thermischen) Drift und des Rauschens sowie für eine bessere Integrierbarkeit in das Perfusionsexperiment wurden durch Partner HTS Modifizierungen an der Hardware und Software durchgeführt. Die Messungen sind semiquantitativ, da die Messsignalgröße auch von der Magnetisierungskennlinie der Partikel und nicht nur von der Partikelmenge abhängt. An einer Verdünnungsreihe einer Probe wurden Vergleichsmessungen zwischen Magnetreader und Vibrationsmagnetometer, welches absolute Partikelmengen misst, durchgeführt. Die Ergebnisse beider Messgeräte wurden über die Konzentration miteinander korreliert.

Messungen zur Testung des Magnetreaders und zum Einfluss geänderter Hardware (neue Küvettengeometrie für Durchflussküvetten, Kühlung der Elektronik, Küvettenmaterial, Flussrate) wurden zunächst an einem Phantomsystem (bestehend aus Partikelreservoir, Membranpumpe und Schläuchen) am IPHT ohne Plazenta bzw. in einseitigen, maternalen Perfusionsexperimenten durchgeführt. (Nach den Durchflussmessungen am Phantomsystem wurde der Magnetreader in das Plazentalabor überführt und in das ex vivo-Plazenta-Modell integriert.) Es zeigte sich, dass der Magnetreader etwa eine Größenordnung empfindlicher ist als das VSM. Eine höhere Empfindlichkeit ist Voraussetzung für die geplanten Messungen im Durchfluss, da bei diesen die Integrationszeit von der Strömungsgeschwindigkeit im Perfusionssystem vorgegeben, d.h. limitiert wird.

Bereits am Phantomsystem ohne Plazenta wurde gezeigt, dass der Magnetreader der Fa. HTS Systeme mit modifizierter Messkammer aus Polyoximethylen (POM) zur Messung im Durchfluss geeignet ist, aber gewisse technische Einschränkungen bestehen.

Es wurde eine Messung der einseitigen, maternalen Perfusion mit NM\_A001- Partikeln (Polyethylenimid-umhüllt) durchgeführt, die Sprünge im Magnet-Reader-Signal und einen fast konstanten Wert  $>0$  nach ca. drei Stunden zeigen (Abb.8 links). Diese Werte korrespondieren nicht mit VSM-Messungen (Abb.8 rechts) an in bestimmten zeitlichen Abständen aus dem Reservoir entnommenen Proben, deren Magnetisierung nach drei Stunden nahezu auf Null absinkt. Diese Diskrepanz kann nur durch Adsorption von Partikeln in der Messzelle erklärt werden. Während der Entnahme der Messkammer scheinen statisch adsorbierte Partikel durch die Erschütterungen aus der Kammer gelöst worden zu sein (besonders deutlich bei der Messzeit 90 Minuten zu erkennen). Etwa 109 Minuten nach Beginn der Messung musste die Pumpe aufgrund eines technischen Problems für 5 Minuten ausgeschaltet werden. Der Peak bei 110 min ist das Resultat der Messwertdrift, die bei statischen Messungen auftritt.

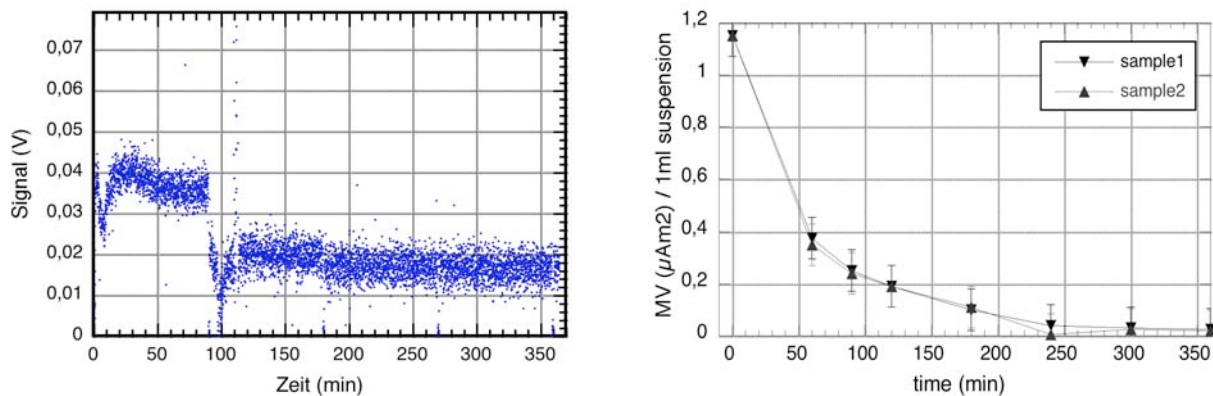


Abb.8: Magnetische Messungen (offset-korrigiertes Magnetreader-Signal) der Perfusionslösung bei der maternalen Perfusion einer Plazenta mit NM\_A001-Partikeln mit PEI-Hülle (links) –und zugehörige statische VSM-Messungen (magnetisches Moment pro Volumen, rechts) als Funktion der Zeit

In einem weiteren Versuch der einseitigen, maternalen Perfusion wurden NM\_A002-Partikel (Stärke-umhüllt) genutzt. Die Verdünnung des Originalfluides betrug 1:6400. Die an der Partikelsuspension gemessene Magnetisierung von  $0,6 \mu\text{Am}^2/\text{kg}$  stimmt etwa mit der aus der Verdünnung berechneten überein. Nach etwa 15 Minuten erreichten die Partikel erstmals die Messkammer. Die Werte, die etwa alle 30 min mit Spannungen kleiner 5 mV auftraten, entstanden durch das Entfernen der Messkammer aus dem Magnetreader. Sie geben den Offset an, dessen Mittelwert abgezogen werden muss. Die Messung zeigt einen monotonen Abfall des Signals um ca. 20% innerhalb von 5 Stunden (ähnlicher Konzentrationsverlauf wie maternale Daten in Fig. 11). Ursache könnte ein Abfall der Partikelkonzentration im Reservoir aufgrund Bindung selbiger „fehlender“ Partikel im Plazentagewebe sein. Die Messung kann allerdings eine Partikelanlagerung in geringerem Umfang in der Messzelle nicht ausschließen.

Messungen am Phantom-System mit diesen Partikeln zeigten eine sehr geringe Adsorption.

Zur Kontrolle wurde an einem gefriergetrockneten großen Stück der Plazenta mittels Magnetrelaxometrie MRX (AG Seidel, Partner 4) eine Beladung mit Magnetpartikeln qualitativ mit grober Ortsauflösung (cm-Bereich) nachgewiesen. An derselben Probe wurden mittels Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) an der TU Dresden (H. Rahn, Institut für Magnetofluidynamik) die Partikel als Bereiche erhöhter mittlerer Ordnungszahl lokalisiert.

Um der Unsicherheit der Partikeladsorption in der Messzelle zu entgehen, wurde eine Messzelle aus Glas gefertigt. Eine Messung am Phantomsystem (bestehend aus Partikelreservoir, Membranpumpe und Schläuchen) ergaben einen konstanten Wert während der Strömung der Partikelsuspension, und einen Abfall des Signals nach Spülung mit Wasser auf den Ausgangswert der Messung vor Ankunft der Partikel in der Messzelle. Das Messsignal mit Glasmesszelle zeigt keine Abhängigkeit von der Flussrate. Ab einer Konzentration von 1 bis 2  $\mu\text{g/ml}$  zeigt der MagnetReader ein fast lineares Verhalten ohne offset-Korrektur (Abb.9). (Eine typische Ausgangskonzentration der Partikel in der Perfusionslösung ist 15  $\mu\text{g/ml}$ .) Der Magnetreader in Kombination mit einer Messkammer aus Glas ist der Messkammer aus POM überlegen (geringere Drift), weshalb alle folgenden Messungen mit Partikeln NM\_A002 (Stärke-umhüllt) und einer Glasküvette durchgeführt wurden.

Für Details zur Verbesserung der Hardware bezüglich Drift siehe Teilprojekt 3.

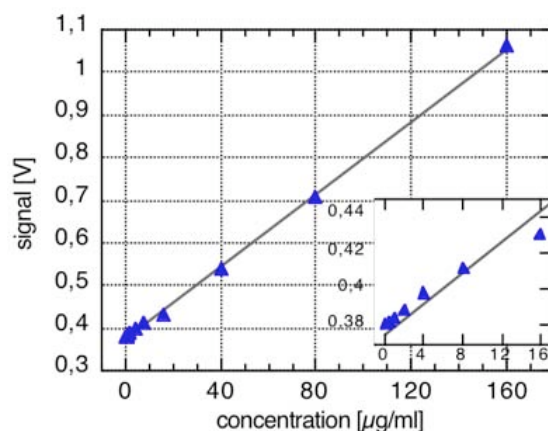


Abb.9 (links): MagnetReader-Signal (Rohdaten) einer Messung an NM\_A001-Partikeln in einer Glas-Messzelle. (rechts): Abhängigkeit des MagnetReader-Signals von der Nanopartikelkonzentration (NM\_A002), gemessen mit Glas-Messzelle

Zweiseitige Perfusionsversuche im maternalen und im fetalen Kreislauf sind erheblich komplexer im Aufbau (Abb.10) als auch im Ablauf als beim einseitigen Versuch. Neben medizinischen „Stoffwechselfparametern“ müssen hier die Kanülierung der fetalen Gefäße und der Perfusionsdruck (Kontrolle des Freispülens der Gefäße, Nachweis von auftretenden „Lecks“) überwacht werden.

Deshalb wurde zunächst der Magnetreader in das System integriert, aber nur Messungen im maternalen Kreislauf vorgenommen. Da das Projekt nur über ein

Magnetreader-Gerät verfügt, müssten bei Messung beider Plazentaseiten fluid-durchströmte Küvetten aus maternalem und fetalem Kreislauf in einem festzulegenden Zeitschema umgesteckt werden. Da die bisher manuell hergestellten Glasmesszellen nicht über ein definiert einstellbares Volumen (maternale  $\neq$  fetale Seite) verfügen, müssen die Signale für die Messung absoluter Werte auf das jeweilige Volumen normiert werden. Für zeitabhängige Relativmessungen ist das nicht erforderlich.

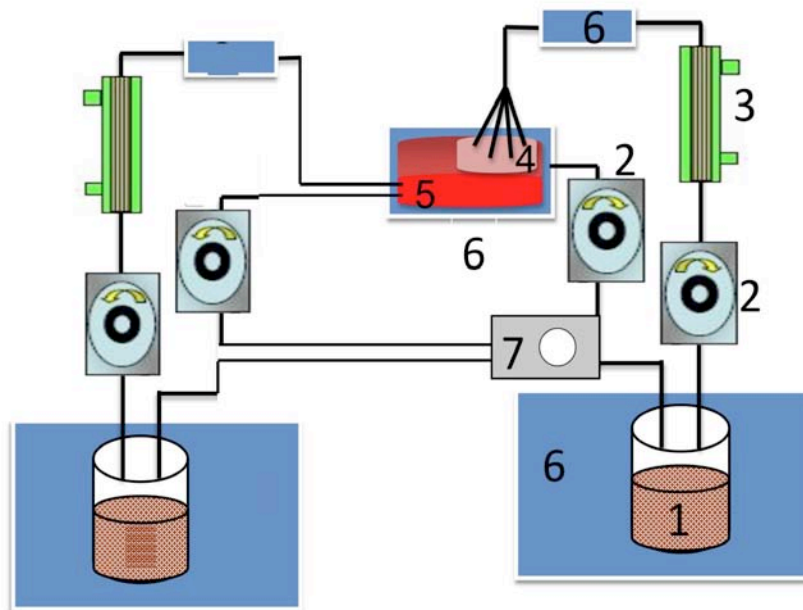


Abb.10: Schematischer Aufbau eines zweiseitigen Perfusionsversuchs mit fetalem Kreislauf links und maternalem Kreislauf rechts.

1 Magnetpartikel in Perfusionsflüssigkeit suspendiert (Rührer nicht gezeigt).

2 Pumpe

3 Oxygenator

4 Plazenta, maternale Seite mit verbundenem Kotyledon

5 Plazenta – fetale Seite

6 Wärmebad 37°C

7 MagnetReader (Computer nicht gezeigt)

Die Perfusionsdruckmessung ist nicht gezeigt, befindet sich aber zwischen dem oberen Wärmebad und der Plazenta auf der fetalen Seite. Auf der fetalen Seite enthält das Flüssigkeitsreservoir (1) nur dann Partikel, wenn diese die Blut-Plazenta-Schranke überwinden.

Die Resultate der zweiseitigen Perfusionsexperimente sind in Abb. 11 und 12 zu sehen: Abbildung 11 zeigt die offset-korrigierten Rohdaten einer ersten Messung und Abb. 12 die volumen-korrigierten Daten aus Abb. 11. Die Volumenkorrektur ergibt sich aus einer „Leckrate“ im maternalen Kreislauf von 14 ml/h, die als Volumenänderung im Flüssigkeitsreservoir (Nr.1 in Bild 10) gemessen wird. In einer zweiten unabhängigen Messung (nicht im Bild dargestellt) ist nach Korrektur der Leckrate von 1 ml/h der gleiche prinzipielle Verlauf zu sehen. In beiden Experimenten kann ein Abfall der Partikelkonzentration im maternalen Kreislauf um ca. 20 bzw. 25% nach 6h beobachtet werden. Nach dem Perfusionsexperiment konnten mit unabhängigen Methoden Partikel,

die an Plazentagewebe gebunden sind, detektiert werden. Im fetalen Kreislauf wurde ein geringer Anstieg des Signals von 1,5 bis 1,8% des maternalen Ausgangssignals gemessen (ca. 3mV). Da das Signal an der unteren Grenze des linearen Messbereichs liegt, kann die Partikelkonzentration nur abgeschätzt werden.

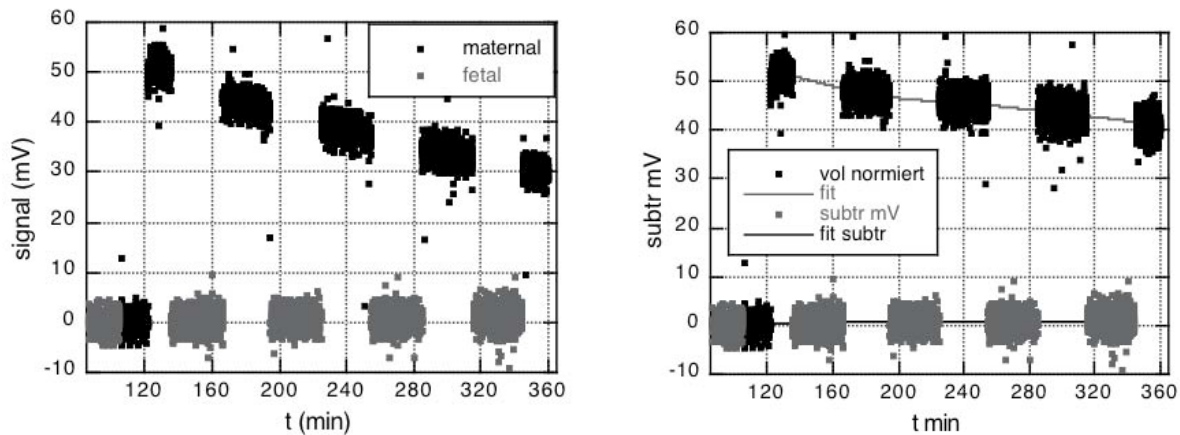


Fig.11 und 12: Langzeitmessungen an Partikelsuspensionen im Perfusionssystem mit Plazentagewebe. Links: offset-korrigiert, rechts: nach Volumenkorrektur mittels Polynom-Fit

Die Biodistribution von Magnetpartikeln, die in Ratten injiziert wurden (AG Schwab), wurden sowohl an Blut-, Kot- und Urinproben zeitabhängig ab der Injektion bis zur Opferung der Tiere nach wenigen Tagen, als auch an unterschiedlichen Organen (i.d.R. Darm, Fettgewebe, Gehirn, Harnblase, Haut, Herz, Leber, Lunge, Milz, Niere) nach dem Sezieren und an kompletten Feten mittels VSM untersucht. Während in Urinproben keine Partikel und in Blutproben ein Abfall der Partikelkonzentration auf Null innerhalb einer Stunde gemessen wurde, schwankten die Werte der Kotproben zeitlich stark. Eine Überprüfung des Tierfutters ergab einen geringen Gehalt an Magnetpartikeln, weshalb Kotproben nicht weiter untersucht werden. Organe mit dem größten Nanopartikelgehalt sind i.d.R. Lunge, Leber und Milz. Hier werden mittlere spezifische Magnetisierungen (Mittelwerte von zehn z.T. unterschiedlich behandelten Ratten) bis ca.  $70 \mu\text{Am}^2/\text{kg}$ , und an Einzelmessungen bis ca.  $300 \mu\text{Am}^2/\text{kg}$  (an Milz und Lunge) erreicht. Das Organ mit dem geringsten/keinem Partikelgehalt (an der Nachweisgrenze) ist das Gehirn. Keine Partikel konnten in Rattenfeten nachgewiesen werden.

Die Biodistribution von magnetischen Nanopartikeln in Schafen wurde an Gewebeproben von Mutterschafen und Schaffeten untersucht. Eine genaue Auswertung der Daten erfolgt durch die AG Schwab. Organe mit dem größten Nanopartikelgehalt sind i.d.R. Lunge, Leber, Knochenmark und Milz. Auffällig ist die hohe Partikelkonzentration in Lungeninfarktgewebe (Abb. 13).

Da die Sensitivität des Vibrationsmagnetometers nicht ausreicht, um für die anderen Organe mit geringerer Partikelkonzentration (ca.  $< 1 \mu\text{Am}^2/\text{kg}$ ) eindeutige Aussagen zu treffen, wurden ausgewählte Proben an der Physikalisch Technischen Bundesanstalt in Berlin (F. Wiekhorst, Fachbereich Biosignale) gemessen. Dabei kann auch ein „natürlich“ auftretender Gehalt an magnetischen Partikeln (z.B. Partikelgehalt durch Nahrungsaufnahme oder äußere Verunreinigung) nicht ausgeschlossen werden und

muss durch Messungen von Kontrolltierproben betrachtet werden. Die PTB verfügt über ein Magnetic Particle Spectrometry-System (MPS), welches in der Empfindlichkeit mit SQUID-Systemen vergleichbar ist. Nicht-ferrimagnetische Eisenbestandteile aus dem Hämoglobin im Blut der Tiere werden nicht gemessen. Schaffeten zeigen bei Applizierung der Partikel in das Muttertier nicht die Verteilung mit den o.g. „Vorzugsorganen“.

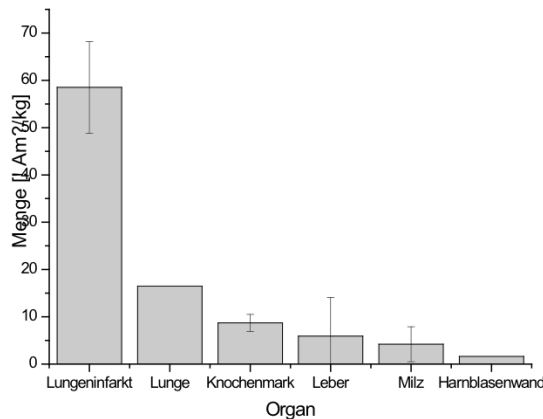


Abb. 13: Magnetpartikelkonzentration (als spezifische Magnetisierung) für unterschiedliche Organe des Schafs (Muttertiere)

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der MPS-Messungen. Spalte A3 gibt das magnetische Moment der Proben in Am<sup>2</sup> an. Die Spalte „>DL“ gibt an, ob das magnetische Moment über dem Detektionslimit DL liegt. Gewebeproben von Schaffötus A Schaf 3 zeigen bei Herz, Haut, Marklayer und Muskel Werte über der Nachweisgrenze des MPS.

Tab.1: Magnetpartikelkonzentration (als spezifische Magnetisierung) mittels MPS für unterschiedliche Organe eines Schaffötus (DL: *Detection limit*)  
Erklärung siehe Text.

ID	A3 Am <sup>2</sup>	m <sub>tiss</sub> mg	> DL +/-
<b>S3A Organe</b>			
Herz	5,20E-11	176	+
Lunge	1,20E-11	69	-
Muskel	3,10E-09	116	+
Mark Layer	2,80E-11	155	+
Niere	2,30E-11	74	-
Fett	8,60E-12	103	-
Darm	7,50E-12	120	-
Milz	8,20E-12	62	-
Haut	2,90E-11	100	+
Leber	7,30E-12	50	-
<b>Untergrund</b>	1,20E-11		

Weitere Arbeiten zur Quantifizierung magnetischer Nanopartikel konzentrierten sich auf optische Voruntersuchungen zum zeitabhängigen Transportverhalten von Nanopartikeln in einem flüssigen Medium.

Zunächst wurde der Einfluss eines externen Magnetfelds auf die Agglomeratbildung in verdünnten wässrigen Suspensionen (in einem Tropfen) untersucht. Zur Bildung von Agglomeraten unter Feldeinwirkung mit nur geringem Feldgradient  $< 10 \text{ T/m}$  zur Vermeidung starker lateraler Bewegungen der Partikel unter dem Mikroskop (Abb.1) wurde der Spalt zwischen zwei NdFeB-Permanentmagneten genutzt. Die axiale Komponente der Feldstärke und der Magnetfeldgradient wurden in Abhängigkeit des Abstands vom Magneten simuliert (Abb. 14).

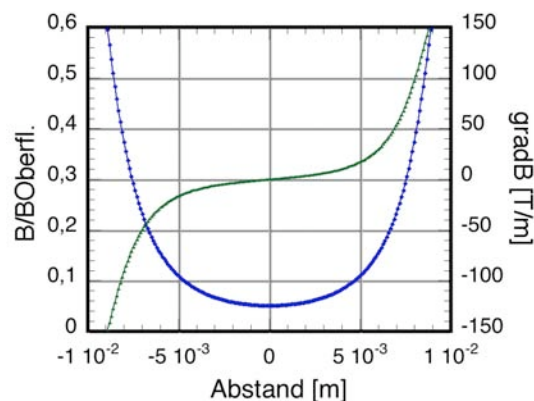


Abb. 14: Simulation des axialen Magnetfeldverlaufs (blau; normiert auf Wert an der Oberfläche des Magneten) und Feldgradient (grün) über dem Abstand vom Mittelpunkt. Abstand der Magnete: 20mm; Durchmesser: 4mm

In Abb. 15 ist die Agglomeratbildung magnetischer Partikel (CMD-umhüllte Eisenoxidpartikel in wässriger Suspension in Folge eines statischen Magnetfelds von ca. 10 mT zu sehen. Es handelt sich dabei nicht um ideal superparamagnetische Magnetkerne, wie sie in kommerziellen magnetischen Beads üblicherweise Verwendung finden, deren Agglomerate sich im feldfreien Fall wieder „auflösen“ sollen. Erkennbar ist die zeitabhängige Bildung von Agglomeraten im Magnetfeld und der Erhalt einer ungerichteten Agglomeratstruktur nach Abschalten des Feldes.

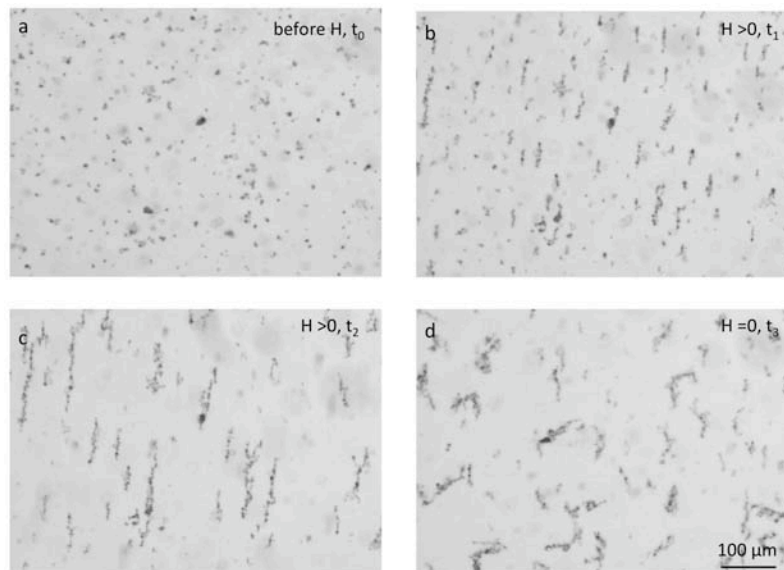


Abb. 15: Lichtmikroskopische Bilder (10fach Objektiv, Hellfeld) magnetisch geführter Nanopartikel: a) vor Anlegen des externen Magnetfeldes; b) ca. 20s und c) ca. 2min nach Anlegen des Magnetfeldes; d) nach Abschalten des Magnetfeldes

### *Metall-Nanopartikel*

Goldnanopartikel (Durchmesser 60 nm) wurden in einseitiger, maternaler Perfusion getestet. Dabei wurden Perfusionslösungen mit Partikeln versehen und vor und nach dem Perfusionsversuch untersucht, um die Wiederfindbarkeit sowie die Quantität der Partikel zu ermitteln. Eine spektrale Quantifizierung dieser Partikel in der Perfusionslösung, die in erster Linie angestrebt wurde, war nicht möglich, da sich Peaks der Partikel und der Blutbestandteile überlagern (siehe Abb.16). Deshalb wurde versucht, Partikel mit einem geeigneteren UV-Vis-Spektrum für diese Untersuchungen zu nutzen. Die Wahl fiel auf eine Suspension aus Ag-Nanoprismen, deren spektrales Maximum bei ca. 730 nm liegt. Die Ag-Partikel konnten in kleinen Mengen der Perfusionsflüssigkeit suspendiert werden, ohne dass es zu sichtbaren Änderungen kam. Im Perfusionsversuch wurde diese konzentrierte Suspension zu ca. 160 ml Perfusionsflüssigkeit im thermostatierten Reservoir gegeben, worauf hin sich die Lösung entfärbte. Ursache ist wahrscheinlich eine Partikelagglomeration. Das Spektrum der Lösung vor und nach der Verdünnung ist in Abb. 17a zu sehen. Abb. 17b zeigt die typische Färbung einer Ag-Prismen-Suspension.

Da eine optische Quantifizierung der Metallpartikel in der Perfusionsflüssigkeit nach fünfständiger Plazentaperfusion nicht möglich war, wurde eine chemische Analyse mittels ICP-MS (hochempfindliche Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) an der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft in Jena durchgeführt.

Die Konzentrationen für Gold betragen 2,60 µg/l in maternalen Kreislauf und <0,6 µg/l im fetalen Kreislauf. Die für Silber betragen 4,60 µg/l in maternalen Kreislauf und 0,17 µg/l im fetalen Kreislauf.

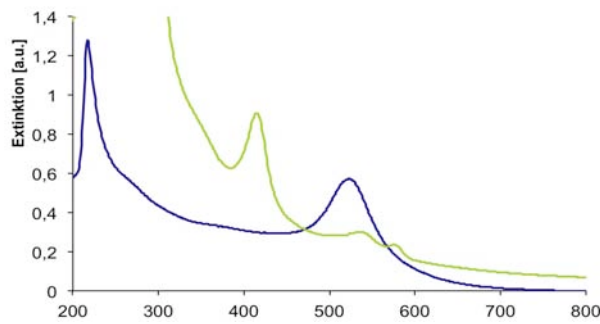


Abb.16: UV-VIS-Spektrum einer Suspension sphärischer Au-Partikel (blaue Kurve), dessen Peakposition bei ca. 530 nm mit denen von perfundierter Perfusionsflüssigkeit teilweise überlagert.

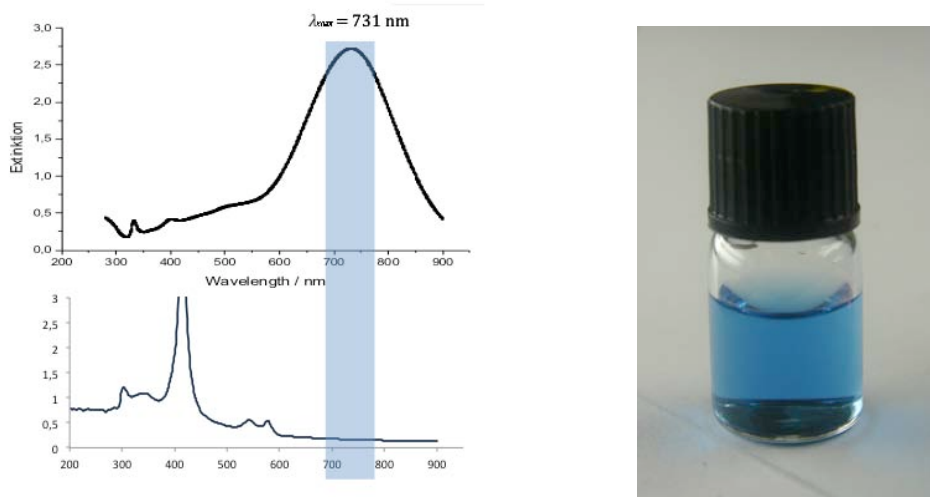


Abb.17a und b: a: UV-VIS-Spektrum einer Suspension prismenförmiger Ag-Partikel vor (oben) und nach Verdünnung (unten) mit Perfusionsflüssigkeit. b: typische Färbung der Suspension vor der Verdünnung

**AP 4.4. Histopathologische Untersuchungen der Toxizität im in vivo- und ex vivo-Modell**

In Kooperation mit der AG Schleußner und AG Bräuer wurden histopathologische Schnitte der Plazenta (ex-vivo-Modell) zusätzlich auch am IPHT untersucht. Dabei konnten Gold-NP im Gewebe mit der histochemischen Silberverstärkung und unter spezieller mikroskopischer Detektion genauer lokalisiert werden (Abb.18).

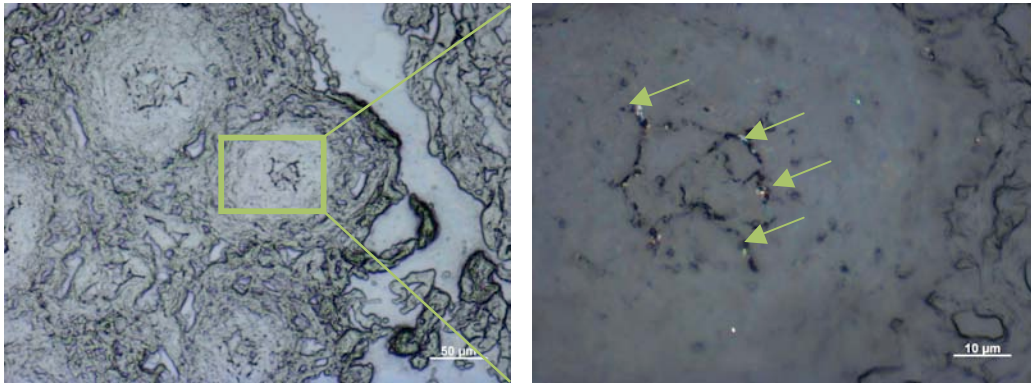


Abb. 18 Mikroskopische Aufnahmen einer Nanopartikel-perfundierten Gewebeprobe der Plazenta. Die Pfeile zeigen auf einzelne Nanopartikeln.

## Teil III.

### **Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Die wissenschaftlichen Resultate des Projektes wurden einem breiten Publikum zu nationalen und internationalen Tagungen präsentiert. Sie sind auf eine große Resonanz gestoßen, woraus einige Einladungen für Konferenzvorträge resultierten.

Die Ergebnisse führten zu einem neuen Antrag für ein Forschungsprojekt: „Neue Biomarker zur Analyse der Exposition mit Nanomaterialien – **NanoExposure**“ (BMBF-Förderprogramm „Werkstoffinnovationen für Industrie und Gesellschaft - WING“ und zum Thema „Sicherer Umgang mit synthetischen Nanomaterialien - Erforschung der Auswirkungen auf den Menschen und die Umwelt - NanoCare“)

Folgende Qualifizierungsarbeiten liefen im Rahmen des Projekts:

Bachelorarbeit M. Gläser, FH Jena, „Nachweisbarkeit magnetischer Nanopartikel bei Durchflussmessungen in Strömungssystemen für Perfusionsversuche“

Masterarbeit M. Thiele, TU Ilmenau, „Aufbau und Optimierung einer kontinuierlichen mikrofluidischen Durchflusssynthese von Silberseedpartikeln zur Generierung anisotroper Silbernanoprismen für die Bioanalytik“

### **Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Untersuchungen zur Rolle der Umhüllung der Nanopartikel für deren Toxizität haben im letzten Jahr eine rasante Entwicklung angenommen. Es ist anzunehmen, dass das Hüllenmaterial, bzw. die Ladung eine wesentlich größere Rolle in der Toxizität spielt, als das Kernmaterial. Eine hohe Anzahl der Publikationen entstand auf diesem Gebiet, was weitere Untersuchungen und Projekte mit diesem Fokus berechtigen würde.

Deloison B, et al. SPIO-enhanced magnetic resonance imaging study of placental perfusion in a rat model of intrauterine growth restriction. *BJOG* 2012; 119: 626–633

Nicole M. Schaeublin et al., Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity, *Nanoscale*, 2011, **3**, 410-420

## **Veröffentlichungen**

geplant:

**Experiments on the detection of magnetic nanoparticles after perfusion of a placenta**

R. Müller, M. Gläser, C. Göhner, L. Seyfarth, E. Schleussner, A. Hofmann, W. Fritzsche

Neben den Beiträgen zu den Clustertreffen der BMBF-Fördermaßnahmen NanoCare und NanoNature gab es folgende Konferenzbeiträge (Auswahl):

A. Csaki, R. Müller, J. Wirth, F. Garwe, T. Schneider, O. Stranik, W. Fritzsche,  
Plasmonic nanoparticles for nanomedicine  
Second World Conference on Nanomedicine and Drug Delivery, 11.03.2011-13.03.2011,  
Kottayam, Kerala, India, Invited Conference Talk

A. Csaki, T. Schneider, N. Jahr, Ch. Leiterer, J. Wirth, O. Stranik, W. Fritzsche  
Molecular Plasmonics: Applications of plasmonic nanoparticles in life sciences  
Nano and Photonics, 14.03.2011-18.03.2011, Mauterndorf, Austria, invited Conference Talk

R. Müller, L. Seyfarth, M. Gläser, U. Enke, N. Brendel, E. Schleussner, A. Hofmann, W. Fritzsche  
First experiments on the detection of magnetic nanoparticles after perfusion of a placenta  
Nanomaterials for Biomedical Technologies, 06.03.2012-07.03.2012, Frankfurt/Main, Germany

M. Thiele: Continuous microfluidic-based high-throughput synthesis of silver seed particles and silver triangles for bioanalytical applications  
8th NanoBio-Europe conference, 18 - 20 June 2012/ Varese (Italien)

R. Müller, L. Seyfarth, U. Enke, M. Gläser, E. Schleussner, A. Hofmann, W. Fritzsche  
Detection of magnetic nanoparticles after perfusion of a placenta - First results  
Safety of Nanoscale Materials in Medicine - 1st workshop, 26.-27.06.2012, Jena, Germany

R. Müller, L. Seyfarth, M. Gläser, U. Enke, E. Schleussner, A. Hofmann, W. Fritzsche  
Investigations on quantification of magnetic nanoparticles after perfusion of a placenta  
12th German Ferrofluid-Workshop, Benediktbeuern 26. – 28.9.2012, Vortrag

A. Csáki: Molecular Plasmonics - biomolecules meets the colourful world of nanoparticles  
5th Szeged Internat. Workshop on Advances in Nanoscience 2012 (SIWAN5) 24-27.10.2012

R. Müller, C. Göhner, M. Gläser, E. Schleussner, A. Hofmann, W. Fritzsche  
Investigations on the transfer of magnetic nanoparticles at the blood-placenta barrier  
13th German Ferrofluid-Workshop, Benediktbeuern 24. – 27.9.2013, Poster

F. Garwe, J. Wirth, J. Toppari, O. Stranik, A. Csaki, W. Fritzsche  
Single plasmonic nanostructures for biosensing and excitation transfer in molecular wire  
INTERNATIONAL SYMPOSIUM Fundamentals of Laser Assisted Micro- & Nanotechnologies (FLAMN-13) June 24-28, 2013, St. Petersburg – Russia, Invited Conference Talk

#### Nanomed-Beiträge externer Autoren mit IPHT-Beteiligung

Placenta Perfusion workshop, Paris, Frankreich, 17.06. - 18.06.2011,  
Human placenta perfusion as an ex vivo model to test transfer and toxicity of nanoparticles  
U. Enke, L. Seyfarth, R. Bräuer, N. Brendel, M. Büttner, A. Csaki, R. Müller, F. Schlenk, Ch. Bergemann, D. Fischer, E. Schleussner

IFPA 2011, Placenta: Predicting Future Health, 14.- 17. September 2011, Geilo, Norway  
Placenta Perfusion - a suitable ex vivo model to characterise interaction of nanoparticles with human tissue?

L. Seyfarth, U. Enke, R. Bräuer, N. Brendel, M. Büttner, A. Csaki, F. Schlenk, C. Bergemann, D. Fischer, P. Seidel, E. Schleussner

J. Domey, R. Müller, A. Heidrich, H. P. Saluz, I. Hilger, Bariumsulfat-Goldnanopartikel als nanopartikuläres Kontrastmittel für die CT-Bildgebung, 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Physik, Jena 26.-29.9.12, Poster

Jena, 27.2.2014

Dr. Robert Müller  
Leibniz-Institut für Photonische Technologien

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung