

In-vitro-Studien zur Deposition von Siliziumdioxid-Partikeln auf Zellen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
von der Fakultät für Physik
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION
von

Dipl.-Phys. Thomas Georg Kowoll
aus Deutsch-Piekar (Polen)

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dez. 2017

Referentin: Prof. Dr. D. Gerthsen
Korreferent: Prof. Dr. U. Nienhaus

angefertigt am
Laboratorium für Elektronenmikroskopie (LEM)
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

Für Mum und Paps.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
Symbolverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
2 Stand der Forschung	5
2.1 Nanotoxikologie	5
2.2 Siliziumdioxid-Nanopartikel – Vorkommen, Herstellung und Risiken	6
2.3 Dosis und Transport von Partikeln in <i>in-vitro</i> -Experimenten	7
2.4 Modellierung von Sedimentation und Diffusion zur Bestimmung der effektiven Dosis	8
2.5 Verfahren zur Messung der effektiven Dosis	9
2.6 Rasterelektronenmikroskopie mit Rückstreuelektronen	11
3 Methodische und theoretische Grundlagen	13
3.1 Zellen – Aufbau und Varianten	13
3.2 Modellierung von Partikeltransport <i>in-vitro</i>	14
3.2.1 In vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry (ISDD) Modell	14
3.2.2 Distorted Grid Modell	16
3.3 Rasterelektronenmikroskopie	18
3.3.1 Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops	18
3.3.2 Wechselwirkung zwischen Elektronen und Probe	19
3.3.3 Abbildung mit Sekundär- und Rückstreuelektronen	24
3.3.4 Halbleiterdetektoren	32
3.4 Monte-Carlo-Simulation	34
3.5 Rastertransmissionselektronenmikroskopie	35
3.6 Focused-Ion-Beam-Systeme	36
3.7 Environmental Scanning Electron Microscopy	37
3.8 Energiedispersive Röntgenspektroskopie	38
4 Experimentelle Methoden und Analyseverfahren	41
4.1 Biologische Präparation	41
4.1.1 Vorbereitung der Proben	41
4.1.2 Präparation der Partikelsuspension und Partikelexposition	42
4.1.3 Entwässerung und Kritische-Punkt-Trocknung	43
4.1.4 Herstellung von Dünnschnitten für STEM-Untersuchungen – Einbetten in Epoxidharz und Ultramikrotomie	43
4.2 Elektronenmikroskopie	44
4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie	44

4.2.2	Rastertransmissionselektronenmikroskopie	48
4.2.3	Environmental Scanning Electron Microscopy	48
4.3	Einsatz von FIB/REM zur Zelltomografie	50
4.4	Datenauswertung	50
4.4.1	Quantifizierung von Partikel-Flächendichten	50
4.4.2	Messung des NP-Kontrastes auf ITO-Substraten	51
4.5	Computersimulationen / Modellierung	52
4.5.1	Monte-Carlo-Simulation – eNISTMonte	52
4.5.2	Berechnung der Deposition von SiO ₂ -Nanopartikeln <i>in-vitro</i> mit ISDD	55
4.5.3	Berechnung der Deposition von SiO ₂ -Nanopartikeln <i>in-vitro</i> mit dem DG-Modell	55
4.6	Sonstige verwendete Methoden	56
4.6.1	Größenbestimmung der SiO ₂ -Partikel mittels Rasterelektronenmikroskopie	56
4.6.2	Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des ζ-Potentials der SiO ₂ -Partikel mittels dynamischer Lichtstreuung	56
4.6.3	Physikalische Gasphasenabscheidung	57
5	In-vitro-Deposition von SiO₂-Nanopartikeln	59
5.1	Eigenschaften der SiO ₂ -Partikel	59
5.2	Quantifizierung der Deposition von SiO ₂ -Nanopartikeln	60
5.2.1	Flächendichten von SiO ₂ -Partikeln in Anwesenheit von A549-Zellen	61
5.2.2	Zellulärer Einfluss auf die Deposition – zellfreie Experimente	64
5.2.3	Diskussion	68
5.3	Simulation des Partikeltransportes <i>in-vitro</i>	71
5.3.1	Vergleich von berechneten und gemessenen effektiven Dosen	71
5.3.2	Diskussion	75
5.4	Auswirkungen des Weglassens von fötalem Rinderserum auf die Deposition von SiO ₂ -Nanopartikeln	77
5.4.1	Experimentelle Beobachtungen	77
5.4.2	Diskussion	80
5.5	Untersuchung möglicher Inkorporation von SiO ₂ -Nanopartikeln durch A549-Zellen	81
5.5.1	Focused-Ion-Beam-Tomografie von ganzen Zellen	81
5.5.2	Rastertransmissionselektronenmikroskopie von zellulären Dünnschnitten	87
5.5.3	Diskussion	90
5.6	Überprüfung der Eignung des ESEM-Modus zur Quantifizierung der effektiven Dosis	92
6	Rückstreuelektronenkontrast in Rasterelektronenmikroskopie-Bildern von SiO₂-Nanopartikeln auf komplexen Substraten	97
6.1	Eigenschaften von <i>ITO160</i> und <i>ITO22</i>	97
6.2	Kontrastinversionen im Rückstreuelektronenbild von SiO ₂ -Nanopartikeln auf Indium-Zinn-Oxid beschichteten Substraten	99
6.2.1	Arbeitsabstandsabhängigkeit	99
6.2.2	Energieabhängigkeit	100
6.2.3	Substratabhängigkeit	102
6.3	Vergleich von gemessenen und berechneten Kontrastwerten	102
6.4	Diskussion des Ursprungs der Kontrastinversionen	106
7	Zusammenfassung	111
	Literaturverzeichnis	115

Publikationsliste	129
Anhang	129
A.1 Zellkultivierung	129
A.1.1 Langzeitkultivierung und Auftauen von Zellen	129
A.1.2 Passagieren von Zelllinien und Bestimmung der Zellzahl	129
A.2 Fixierlösungen zum Einbetten von Zellen in EPON	130
A.2.1 Zusammensetzung Erstfixierung	130
A.2.2 Zusammensetzung Zweitfixierung	130
A.3 Zusammenfassung der beim DG-Modell verwendeten Parameter	131
A.4 DLS Partikel-Größenverteilungen	132
A.5 Ergebnisse weiterer Sedimentationsversuche	133
A.5.1 Interzelluläre und zelluläre Flächendichten nach vierstündiger Exposition	133
A.5.2 Zellfreie Experimente	134
A.5.3 Ergänzende Focused-Ion-Beam-Untersuchungen	135
A.5.4 Ergänzende STEM Aufnahmen von Dünnschnitten	135
A.6 Ergänzende Simulationen	137
A.7 Ergebnisse weiterer Kontrastmessungen	140
A.7.1 Arbeitsstandabhängigkeit	140
A.7.2 Energieabhängigkeit	142
Danksagung	145

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	<i>Arbitrary unit</i> - willkürliche Einheit
BF	<i>Bright-field</i> - Hellfeld
BSA	Bovine serum albumin - Rinderalbumin
BSE	<i>Backscattered electron</i> - Rückstreuelektron
CCM	<i>Cell culture medium</i> - Zellkulturmedium
CZ	Czyżewski
DF	<i>Dark-field</i> - Dunkelfeld
DG	Distorted Grid Modell
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDXS	<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> - Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EPON	Epoxidharz
ESEM	Environmental scanning electron microscope
ETD	Everhart-Thornley-Detektor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetal bovine serum - fötales Rinderserum
FIB	<i>Focused-ion-beam</i> - fokussierter Ionenstrahl
FEG	<i>Field emission gun</i> - Feldemissionskathode
HAADF	<i>High-angle angular dark-field</i> - Weitwinkeldunkelfeld
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry - Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ISDD	In-vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry Modell
ITO	<i>Indium-tin-oxide</i> - Indium-Zinn-Oxid
ITO22	ITO-beschichtetes Glaskohlenstoffsubstrat mit ITO-Schichtdicke von 22 nm
ITO160	ITO-beschichtetes Glassubstrat mit ITO-Schichtdicke von 160 nm
KPT	Kritische-Punkt-Trocknung
low-keV	<i>Low-energy</i> - Niederenergie
MC	Monte-Carlo
NP	Nanopartikel
PBS ^{-/-}	<i>Phosphate-buffered saline</i> - phosphatgepufferte Salzlösung, ohne CaCl ₂ , ohne MgCl ₂
PE	Primärelektron

PLA	P ressure- l imiting a perture - Blende zur Abtrennung zweier Bereiche unterschiedlichen Drucks
PVD	<i>P</i> hysical <i>v</i> apor <i>d</i> eposition - physikalische Gasphasenabscheidung
REM	R asterelektronen m ikroskopie
RT	R aum t emperatur
RNS	R ibonukleinsäure
ScR	Screened R utherford
SNR	S ignal-to- n oise r atio - Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SE	S ekundärelektron
SMP	S ub m ikropartikel
STED	S timulated e mission d epletion
STEM	<i>S</i> canning <i>t</i> ransmission <i>e</i> lectron <i>m</i> icroscopy - Rastertransmissionselektronenmikroskopie
TE	T ransmittiertes E lektron
TEM	T ransmissionselektronen m ikroskopie
VCM	V olumetric c entrifugation m ethod
WD	<i>W</i> orking <i>d</i> istance - Arbeitsabstand

Symbolverzeichnis

Griechische Symbole

α	Ionisationskoeffizient des im ESEM-Modus verwendeten Gases
δ	Sekundärelektronenausbeute
δ_0	Sekundärelektronenausbeute bei senkrechtem Einfallswinkel
ϵ_0	Elektrische Feldkonstante
ϵ_c	Effizienz eines Halbleiterdetektors, mit der Elektron-Loch-Paare gesammelt werden (engl. charge-collection efficiency)
ϵ_r	Relative Permittivität
ζ	Austrittswinkel von BSE relativ zur Flächennormalen
η	Rückstreukoeffizient
η_c	Rückstreukoeffizient eines Halbleiterdetektors
θ	Streuwinkel
θ_0	Charakteristischer Winkel der elastischen Streuung
θ_E	Charakteristischer Winkel der unelastischen Streuung
Θ_{Bragg}	Braggwinkel
λ	De-Broglie-Wellenlänge
λ_D	Debye-Abschirmlänge
Λ	Mittlere freie Weglänge
μ	Viskosität des Zellkulturmediums
σ	Wirkungsquerschnitt
σ_t	Totaler Wirkungsquerschnitt
$d\sigma/d\Omega$	Differentieller Wirkungsquerschnitt
$d\sigma_m/d\Omega$	Mott Wirkungsquerschnitt
$d\sigma_R/d\Omega$	Rutherford'scher Wirkungsquerschnitt
$d\sigma_{ScR}/d\Omega$	Screened Rutherford Wirkungsquerschnitt
$d\sigma_{unel}/d\Omega$	Unelastischer differentieller Wirkungsquerschnitt
ρ_{Medium}	Dichte Medium
ρ_P	Dichte Partikel
ϕ	Einfallswinkel des Primärstrahls relativ zur Flächennormalen
Φ_d	Interne Diffusionsspannung einer Diode
χ	Azimuthalwinkel
Ω	Raumwinkel

Lateinische Symbole

a	materialabhängige Konstante zur Berechnung der Eindringtiefe von Elektronen
a_H	Bohr'scher Radius
A	Atommasse
b	Stoßparameter
c	Partikelkonzentration
c_B	Partikelkonzentration im untersten Segment
c_{frei}	Konzentration freier Partikel im untersten Segment
c_{mol}	Molare Partikelkonzentration
$c_{i,j}$	Konzentration der Partikelspezies j in Kammer i
$c'_{i,j}$	Neue Konzentration der Partikelspezies j in Kammer i nach einem Diffusions- oder Sedimentationsschritt
$\Delta c_{i,j}^d$	Konzentrationsänderung der Partikelspezies j in Kammer i durch Diffusion
$\Delta c_{i,j}^s$	Konzentrationsänderung der Partikelspezies j in Kammer i durch Sedimentation
C	Kontrast eines Nanopartikels
\bar{C}	mittlerer Kontrast
d	Abstand zwischen Probe und Detektor im ESEM-Modus
d_P	Partikeldurchmesser
d_{DLS}	Hydrodynamischer Durchmesser der Partikel
d_{REM}	Trockendurchmesser der Partikel
D	Diffusionskonstante eines Partikels
e	Elementarladung
E	Energie eines Elektrons
ΔE	Energieverlust eines Elektrons bei einem Streuprozess
E_0	Primärelektronenenergie
ΔE_0	Halbwertsbreite der Energieverteilung von Primärelektronen
E_{BSE}	Rückstreuelektronenenergie
\bar{E}_i	Mittlere Anregungsenergie eines Elektron-Loch-Paares
E_m	Mittlere Verlustenergie beim kontinuierlichen Abbremsen eines Elektrons nach Bethe
E_P	BSE-Gesamtenergie ausgehend von einem Partikel bei MC-Simulationen
E_{Sub}	BSE-Gesamtenergie ausgehend vom Substrat bei MC-Simulationen
E_{th}	Schwellenenergie eines Halbleiterdetektors
E_{trans}	transmittierte Energie durch Detektorschutzschicht
f	Relative Bedeckung der Oberfläche eines Sorbenten
F_b	Bruchteil gebundener Partikel im untersten Segment des DG-Modells
F_A	Auftriebskraft
F_G	Gewichtskraft
F_R	Reibungskraft
g	Gravitationsbeschleunigung
G	Verstärkung eines Detektors

h	Plancksches Wirkungsquantum
I_P	Probenstrom
I	Ionenstärke
I_{cc}	Sammelstrom im Halbleiterdetektor
I_{NP}	Bildintensität des NPs
$I_{schwarz}$	Schwarzwert der verwendeten Detektoreinstellung
I_{Sub}	Bildintensität des Hintergrunds
J	Mittleres Ionisationspotential
J'	Energieabhängiges Ionisationspotential nach Joy und Luo
k_a	Adsorptionsrate
k_d	Desorptionsrate
k_B	Boltzmann-Konstante
K_D	Langmuirsche Gleichgewichtskonstante
m	Angeregter Zustand eines Atoms
m_e	Elektronenmasse
m_P	Partikelmasse
n	Anzahl Elektronen (Intensität) vom betrachteten Objekt ausgehend
n_0	Anzahl Elektronen (Intensität) vom Hintergrund ausgehend
N	Anzahl Atome pro Einheitsvolumen
N_A	Avogadrozahl
N_B	Konzentration von Donator- und Akzeptoratomen
N_A^-	Akzeptorkonzentration
N_D^+	Donatorkonzentration
N_e	Anzahl berechneter Elektronentrajektorien bei MC-Simulationen
p	Druck
q	Produkt aus Detektoreffizienz und Rückstreu- bzw. Sekundärelektroneneffizienz eines Halbleiterdetektors
Q	Zufallsvariable bei MC-Simulationen
r	Abstandsvariable
R	Universelle Gaskonstante
R_A	Atomarer Abschirmradius
R_e	Eindringtiefe von Elektronen
s	Wegstrecke
S	Bremsvermögen eines Materials nach Bethe
S_B	Bethe Reichweite
t	Zeitvariable
Δt	Zeitintervall
T	Temperatur
T_{Trans}	Transmissionswahrscheinlichkeit eines Elektrons durch die Schutzschicht eines Halbleiterdetektors
U	An eine Diode angelegte äußere Spannung
U_{bias}	Bremsspannung
v	Geschwindigkeit eines Elektrons

V	Sedimentationsgeschwindigkeit eines Partikels
V_P	Partikelvolumen
V_{We}	Abgeschirmtes Coulomb-Potential nach Wentzel
w	Verarmungszone einer Diode
x	Indiumkonzentration
z	Ortskoordinate
Z	Ordnungszahl
\bar{Z}	mittlere Ordnungszahl

Kapitel 1

Einleitung

In heutiger Zeit finden sich bereits in zahlreichen Produkten des täglichen Lebens Nanopartikel und auch in der Biomedizin erhofft man sich zukünftig großen Nutzen von ihrem Einsatz bei der kombinierten Diagnostik und Therapie von Krankheiten. Insbesondere amorphe Siliziumdioxid-Partikel sind bereits jetzt industriell weit verbreitet, da diesem Material, im Gegensatz zu seinem kristallinen Pendant, bisweilen keine relevante Toxizität zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte [1]. Grundsätzlich muss bei Nanomaterialien aber aufgrund ihrer besonders kleinen Dimensionen mit gänzlich anderen Effekten gerechnet werden, als man es von Materialien mit makroskopischen Dimensionen erwarten würde. Aus diesem Grund sind toxikologische Studien notwendig, um Gefahren für Mensch und Umwelt einschätzen zu können.

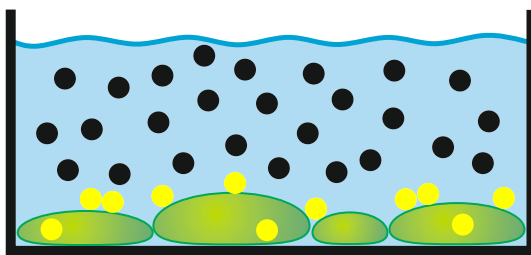


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung eines *in-vitro*-Experimentes mit Zellen (grün) am Boden eines Reaktionsgefäßes und Partikeln in Suspension. Gelbe Partikel auf und in Zellen repräsentieren die effektive Dosis.

Viele dieser Studien werden *in-vitro* (lat. „im Glas“) durchgeführt. Hierzu werden Zellen am Boden eines Reaktionsgefäßes kultiviert und anschließend für eine bestimmte Zeit einer Partikelsuspension definierter Konzentration ausgesetzt. In Abbildung 1.1 wird der Aufbau eines solchen *in-vitro*-Versuches illustriert. Am Ende des Versuches wird die biologische Wirkung mit der Eingabekonzentration in Relation gesetzt und so auf die Toxizität der verwendeten Partikel geschlossen. Abbildung 1.1 veranschaulicht, dass eine Wechselwirkung zwischen Zellen und Nanopartikeln nur möglich ist, wenn die Partikel die Zelloberflächen am Boden des Reaktionsgefäßes erreichen. Da aber in Suspensionen der Partikeltransport von Sedimentation und Diffusion bestimmt wird, erreichen nicht zwingend alle Partikel in der zur Verfügung stehenden Zeit die Zellen. Die Partikelkonzentration in der Suspension ist deshalb keine geeignete Größe, um die Exposition von Zellen durch Nanopartikel zu beschreiben. Insofern ist eine Quantifizierung der tatsächlich auf den Zellen deponierten und gegebenenfalls von den Zellen aufgenommenen Menge an Nanopartikeln notwendig. Diese Menge wird als *effektive Dosis* bezeichnet [2] und wird in Abbildung 1.1 durch gelbe Partikel illustriert. Erst durch die Korrelation der effektiven Dosis mit der beobachteten biologischen Wirkung lassen sich angemessene Aussagen über die Toxizität von Nanopartikeln treffen.

Das Sedimentieren von Partikeln in Flüssigkeiten, und damit die effektive Dosis, ist nach Mason und Weaver [3] abhängig von Diffusion und gravitationsgetriebener Sedimentation. Beide Transportprozesse werden ganz entscheidend von der Partikelgröße bestimmt. Darüber hinaus beeinflussen auch Temperatur, Viskosität und Dichte der Flüssigkeit sowie die Dichte der Partikel beide Prozesse. Einzelne Studien deuten an, dass bei *in-vitro*-Experimenten auch unterschiedliche Oberflächeneigenschaften und zelluläre Einflüsse eine wichtige Rolle spielen [4–6], was die Komplexität solcher biologischen Systeme verdeutlicht.

Quantitative Dosis-Wirkungskorrelationen erfordern präzise Berechnungen der effektiven Dosis. Einen ersten Ansatz hierzu lieferten Hinderliter et al. [7] mit dem *In vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry* Modell, kurz ISDD. Jedoch ist ISDD auf die simultane Berechnung nur einer Partikelgröße limitiert und vernachlässigt adhäsive Eigenschaften von Zelloberflächen. Eine noch recht neue Alternative bildet das *Distorted Grid* (DG) Modell von DeLoid et al. [8], welches sowohl Größenverteilungen von Partikeln als auch unterschiedlich stark adsorbierende Oberflächen einbezieht. Die Allgemeingültigkeit des DG-Modells muss jedoch erst noch experimentell verifiziert werden.

Zur Verifizierung der berechneten effektiven Dosis sind Experimente zwingend erforderlich. Dies ist jedoch nicht leicht zu bewerkstelligen, denn Verfahren wie die Massenspektrometrie oder Durchflusszytometrie können nicht zwischen Partikeln in, auf oder neben Zellen differenzieren und Standard-Fluoreszenzmikroskopie ist im Hinblick auf Nanomaterialien bezüglich der Auflösung am Limit. Eine Ausnahme bilden hier „super-resolution“ Techniken wie die stimulated emission depletion (STED) Mikroskopie, die jedoch auch gewissen Einschränkungen unterworfen ist, wie beispielsweise unzureichender statistischer Aussagekraft [9]. Rasterelektronenmikroskopie (REM) dagegen ermöglicht gute Ortsauflösung und flächendeckende, statistisch aussagekräftige Untersuchungen bei minimalen Strahlenschäden dank des Einsatzes von niedrigen Elektronenenergien (low-keV REM). REM kommt zwar in vielen nanotoxikologischen Studien zum Einsatz, meist aber nur zur qualitativen Bestätigung anderer Untersuchungsmethoden. Quantitative Analysen von Partikeldichten im Kontext der Nanotoxikologie werden bisher jedoch noch selten durchgeführt.

In dieser Arbeit werden daher *in-vitro*-Experimente mit low-keV REM hinsichtlich der effektiven Dosis analysiert. Hierzu wird ein Modellsystem, bestehend aus 100, 200 und 500 nm großen SiO₂-Partikeln und menschlichen Lungenepithelzellen der Zelllinie A549, verwendet und im Rasterelektronenmikroskop wird die Anzahlkonzentration der Partikel auf Zelloberflächen gemessen. Da es sich beim Verbund von Partikeln und Zellen auf Substraten um komplex strukturierte Objekte handelt, ist deren Abbildung mittels REM anspruchsvoll und erfordert eine intensive Optimierung des Bildkontrastes. Aus diesem Grund wird die Kontrastentstehung bei komplexen Strukturen im zweiten Teil dieser Arbeit eingehend untersucht (s.u.). Der Einsatz von Rastertransmissionselektronenmikroskopie sowie FIB/REM-Tomografie soll etwaige Partikelaufnahme der Zellen während der *in-vitro*-Versuche ausschließen. Die experimentellen Ergebnisse werden mit den beiden aktuellen Simulationsansätzen (ISDD und DG-Modell) verglichen, um deren Eignung zur Modellierung des Partikeltransports zu bestätigen. Auf lange Sicht sollen durch eine präzise Berechnung der effektiven Dosis komplexe und zeitaufwändige Messungen derselbigen vermieden werden, um die Arbeit von Toxikologen zu vereinfachen.

Folgende Ziele stehen im Fokus:

- Überprüfung der Eignung eines Rasterelektronenmikroskops zur Detektion und Quantifizierung von SiO₂-Partikeln unterschiedlicher Größen auf und neben Zellen nach *in-vitro*-Versuchen.
- Quantifizierung der effektiven Dosis bei toxikologisch/physiologisch relevanten Eingabekonzentrationen, insbesondere unter dem Gesichtspunkt unterschiedlicher adhäsiver Eigenschaften.

ten von Substraten und Zellen. Die Verwendung geringer Eingabekonzentrationen soll gewährleisten, dass ein Überladen der Zellen mit Partikeln vermieden wird.

- Vergleich von gemessenen mit berechneten effektiven Dosen. Aufgrund der Größenabhängigkeit von Sedimentation und Diffusion soll durch Verwendung nanoskaliger (100 nm) und submikroskaliger (200 nm, 500 nm) Partikel die Validität für unterschiedliche Größendimensionen untersucht werden.
- Identifizierung etwaiger zellulärer Einflüsse auf die Deposition von SiO₂-Partikeln in Abhängigkeit von unterschiedlichen Partikelgrößen.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit Rückstreuungselektronen (engl. backscattered electrons, BSE) REM-Kontrast. BSE sind hochenergetische Primärelektronen, die auf Basis von elastischer Rutherford Streuung von der bestrahlten Probe zurückgestreut werden. Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit des elastischen Wirkungsquerschnittes von der Ordnungszahl Z des Streupartners, tragen BSE materialspezifische Informationen. Dank dieser können sie zur Darstellung von Materialkontrast in BSE-REM-Aufnahmen verwendet werden, d.h. sie erlauben die Differenzierung von Materialien unterschiedlicher Ordnungszahl. BSE-Aufnahmen sind daher von besonderem Interesse für die Abbildung und Quantifizierung von SiO₂-Nanopartikeln (mittlere Ordnungszahl $\bar{Z} = 10$) auf Zellen (mittlere Ordnungszahl $\bar{Z} = 6$).

Prinzipiell erfordert die REM elektrisch leitfähige Proben, da es sonst zu Aufladungen kommt, die Bildstörungen verursachen. Da Zellen nicht elektrisch leitend sind, wird ein leitfähiges Substrat benötigt, um den nötigen Ladungsaustausch zu ermöglichen. Hierzu werden dünn mit Indium-Zinn-Oxid (engl. indium tin oxide, ITO) beschichtete Glasobjektträger verwendet. ITO hat neben der hohen elektrischen Leitfähigkeit den Vorteil, transparent für sichtbares Licht zu sein, weshalb es die Möglichkeit offen lässt, korrelative Licht- und Rasterelektronenmikroskopie zu betreiben [10]. Sedimentieren Nanopartikel auf solche komplexen Substrate, ist deren Abbildung mittels BSE nicht unkompliziert. Daher wird hier im Detail der BSE-REM-Kontrast von SiO₂-Nanopartikeln auf komplexen Substraten und dessen Abhängigkeit von Abbildungsparametern untersucht. Wie die Arbeit von Hirsch et al. [11] zum BSE-Kontrast von Gold-Nanopartikeln auf Silizium-Substraten zeigt, muss bei solchen Konstellationen mit unerwarteten Effekten gerechnet werden. Da dieser Fall in Form von Kontrastinversionen von SiO₂-Partikeln bei Experimenten zur Quantifizierung der Partikeldeposition auch in dieser Arbeit eintritt, wird dies zum Anlass genommen, umfassende Kontrastuntersuchungen mit 100 nm großen SiO₂-Partikeln auf zwei mit unterschiedlich dicken ITO-Schichten beschichteten Substraten aus Glas bzw. amorphem Kohlenstoff durchzuführen.

Ziel ist es, ein quantitatives Verständnis des BSE-Kontrastes in Abhängigkeit von E_0 und dem Arbeitsabstand zu erlangen. Neben Messungen im Rasterelektronenmikroskop werden hierzu zusätzlich Monte-Carlo (MC) Simulationen mit zwei unterschiedlichen Ansätzen für den Wirkungsquerschnitt verwendet (Screened-Rutherford und Mott). Dabei stellt die Korrektur von ganz spezifischen Eigenschaften ringförmiger Halbleiterdetektoren innerhalb der MC-Berechnungen eine besondere Herausforderung dar. Sowohl eine abnehmende Detektoreffizienz bei sehr niedrigen Elektronenenergien als auch das Funktionsprinzip des Halbleiterdetektors müssen berücksichtigt werden. Mittels der erworbenen Kenntnisse kann eine Empfehlung gegeben werden, wie bei komplexen Strukturen ein optimaler BSE-Kontrast erreicht werden kann.

Kapitel 2

Stand der Forschung

In diesem Kapitel wird der aktuelle Stand der Literatur zu den Themen dieser Arbeit zusammengefasst. Zunächst werden in Kapitel 2.1 Definition und Anwendungsgebiete der Nanotechnologie vorgestellt sowie die damit eng verknüpfte Nanotoxikologie. In Kapitel 2.2 folgt eine Übersicht über Siliziumdioxid-Nanopartikel, ihre Verwendung und bekannte Toxizität. In Abschnitt 2.3 wird der Begriff der Dosis in der Nanotoxikologie diskutiert und wie sie mit dem Transport von Partikeln in Sedimentationsexperimenten zusammenhängt. Kapitel 2.4 widmet sich der Modellierung und Kapitel 2.5 der experimentellen Messung der deponierten Dosis in solchen Experimenten. Im letzten Abschnitt 2.6 wird die Rasterelektronenmikroskopie mit Rückstreuelektronen und deren quantitative Verwendung behandelt.

2.1 Nanotoxikologie

Die Nanotechnologie ist ein Sammelbegriff verschiedenster Forschungsgebiete, denen allen die Größenordnung der verwendeten Materialien von unter 100 nm gemein ist. Nach Empfehlung der Europäischen Kommission ist der Begriff Nanomaterial als natürliches, beiläufiges oder gefertigtes Material definiert, welches zu mindestens 50 % aus Partikeln besteht, die in einer oder mehr Dimensionen in der Größenordnung 1–100 nm liegen [12]. Somit kann es sich um Nanoplättchen, Nanofasern oder Nanopartikeln (NP) handeln, aber auch um Agglomerate oder Aggregate derselbigen. Das Besondere ist, dass in dieser Größenordnung Materialien ganz andere Eigenschaften aufweisen können als man es von ihren größer skalierten Pendanten kennt, da Oberflächeneigenschaften eine deutlich größere Rolle spielen als Volumeneigenschaften.

Die Anwendungsgebiete von Nanomaterialien sind so vielfältig wie ihre chemischen Zusammensetzungen. Sie können aus organischen Polymeren, Metallen (z.B. Gold, Silber, Platin), Metalloxiden (z.B. Eisenoxid, Titandioxid, Siliziumdioxid) oder kohlenstoffbasierten Materialien (z.B. Fullerene oder Nanoröhrchen) bestehen und finden Anwendung in der Automobilbranche (Batterien, Elektronik, Reifen), bei Farben, Lacken und Druckertonern, in der Halbleitertechnik (Computerchips, Photovoltaik) oder in Pharmazeutika, Kosmetika und sogar in Nahrungsmitteln [13–16].

Darüber hinaus wird der Nanotechnologie auch in der Biomedizin eine enorme Bedeutung beigegeben. Die Theranostik (ein Kofferwort aus Therapie und Diagnostik) versucht eine auf jeden einzelnen Patienten individuell zugeschnittene Behandlung zu realisieren, beispielsweise in der Krebstherapie, wo konventionelle Methoden aufgrund der genomischen Inhomogenität von Tumoren oft nicht anschlagen. Große Hoffnung ruht hier auf Nanomaterialien, die einerseits als Träger von Medikamenten diese selektiv an ihr designiertes Ziel transportieren sollen (zur Therapie), gleichzeitig aber auch als spezifisches Kontrastmittel in bildgebenden Verfahren dienen (zur Diagnostik) [17,18].

Ein großer Vorteil dieses Ansatzes ist die potentielle Minimierung von Nebenwirkungen für den Patienten, da die Wirkstoffe direkt und nur den Krebszellen verabreicht werden [19].

Bereits Goethe hat beobachtet: „Wo viel Licht ist, ist starker Schatten“ [Goethe, 1773]. Entsprechend kommt auch die Nanotechnologie nicht umhin, bei allen potentiellen Möglichkeiten, gewisse Risiken für den Menschen zu bergen. Deren Untersuchung ist Gegenstand der Nanotoxikologie. Schon länger ist bekannt, dass der Mensch zahlreichen Umweltpartikeln ausgesetzt ist, die er häufig selbst produziert, z.B. durch Verbrennung fossiler Brennstoffe, sei es in der privaten Heizung, in Kraftfahrzeugen oder in der Industrie (Kohle, Öl, Benzin, Diesel) [20]. Diese und andere Luftverschmutzung mit feinen und ultrafeinen Partikeln sorgt nachweislich für steigende Zahlen kardiovaskulärer und respiratorischer Erkrankungen der Menschen, insbesondere in städtischen Gebieten [21,22]. Es ist naheliegend anzunehmen, dass künstliche Nanomaterialien mit ähnlichen Größen wie ultrafeine Partikel unter Umständen ähnliche toxische Effekte bewirken können [23,24]. Insofern ist eine gründliche Risikoabschätzung der Nanotechnologie unabdingbar. Maynard et al. [25] formulierten diesbezüglich bereits 2006 fünf „große Herausforderungen“ der Nanotoxikologie, die es zu bewältigen gilt, um in Zukunft einen sicheren Umgang mit dieser Technologie sicherstellen zu können. Hierzu zählen die Autoren (1) die Entwicklung von Werkzeugen zur Bemessung der Exposition mit Nanomaterialien, (2) die Entwicklung von Methoden zur Einschätzung ihrer Toxizität, (3) die Modellentwicklung für eine Vorhersage der Auswirkungen von Nanomaterialien auf Mensch und Umwelt und (4) die Entwicklung von Systemen zur Risikoabschätzung im Hinblick auf den Lebenszyklus von Nanomaterialien, beginnend bei der Herstellung über deren Verwendung bis hin zur Entsorgung. An fünfter Stelle wird der Aufbau strategischer Forschungsprogramme gefordert, um systematische und relevante Forschung betreiben zu können.

2.2 Siliziumdioxid-Nanopartikel – Vorkommen, Herstellung und Risiken

Siliziumdioxid (SiO_2), auch als Silika bezeichnet, kommt in der Natur in zwei Formen vor: kristallin und amorph. Als Quarz stellt es in seiner kristallinen Form den Hauptbestandteil der Erdkruste und der Sandvorkommen der Erde dar. Amorphes SiO_2 findet sich natürlicherweise als Hauptbestandteil diverser Mineralien (z.B. Opal) und in den Skeletten von Kieselalgen und Strahlentierchen (Diatomeen und Radiolarien). Kristallines Silika gilt als toxisch und wird als krebserregend eingestuft, wohingegen im Fall von amorphem SiO_2 von keiner Toxizität ausgegangen wird [1, 26, 27]. Inwiefern das tatsächlich auch auf Nanomaterialien aus amorphem Siliziumdioxid zutrifft, ist Gegenstand aktueller Debatten. Trotzdem werden amorphe Silika-Nanomaterialien bereits seit langem industriell verwendet, wobei sie als äußerst vielseitig einsetzbar gelten. So findet man sie sowohl als Rieselhilfsmittel in Nahrungsmitteln (Lebensmittelzusatzstoff E551), als auch in Pharmazeutika, Kosmetika, in der Papierindustrie, im Baugewerbe, als Schleifmittel, in Farben und Lacken, in Autoreifen, Schuhsohlen und anderen Elastomerprodukten [16, 28, 29]. In der Biomedizin besteht die Hoffnung amorphe Silika-Nanopartikel als Transportmittel von Medikamenten für die zielgerichtete Krebstherapie einsetzen zu können [30,31]. Daneben gibt es auch Bemühungen sie zur Markierung von Stammzellen [32] und von Lysosomen [33] zu verwenden.

Die am weitesten verbreitete Herstellungsmethode von amorphen Silika-Partikeln ist die nasschemische Stöbersynthese [34]. In diesem Sol-Gel-Prozess wird typischerweise Tetramethylorthosilikat ($\text{Si}(\text{OEt})_4$) in einer alkoholischen Lösung hydrolysiert, wodurch Ethanol und diverse Silanole (Si-OH , Siliziumanaloge zu Alkoholen) entstehen. Diese kondensieren unter Abgabe von Wasser oder Ethanol, sodass allmählich Siliziumdioxid-Partikel wachsen. Der Stöberprozess ist sehr gut ver-

standen, weshalb man bei der Synthese ein hohes Maß an Kontrolle über Partikelgröße, deren Größenverteilung (Monodispersität) und weitere physikalische Eigenschaften hat. Unter anderem ist es möglich in einer Variation des Prozesses poröse Nanopartikel herzustellen [35].

Bezüglich der Toxizität von amorphem Silika ist bereits seit den 1920er Jahren eine inflammatorische Wirkung bekannt. Damals wurde eine mögliche Behandlung von Arteriosklerose [36] oder pulmonaler Tuberkulose [37] mit amorphem Silika untersucht. Einige Zeit später konnte sogar nachgewiesen werden, dass amorphes Silika im Blut zur gesteigerten Hämolyse, d.h. Auflösung von roten Blutkörperchen, führt [38]. Auch neuere *in-vitro* und *in-vivo*-Studien, die mittlerweile den Fokus vor allem auf nanoskalige amorphe Silika rücken, berichten von Entzündungsreaktionen nach der Exposition mit SiO₂-Nanopartikeln [1,39,40] und bestätigen damit die früheren Arbeiten. Zahlreiche weitere *in-vitro*-Studien an unterschiedlichen menschlichen Krebszellen (Keratinocyten, Darmzellen, Lungenepithelzellen, Endothelzellen) deuten auf eine Größen- und Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität hin [41–47]. Darüber hinaus hängt die biologische Aktivität von Silika auch davon ab, ob in den Versuchen Serumproteine verwendet werden und in welchen Mengen [45,48,49]. Proteine werden anteilig dem Zellkulturmedium (engl. cell culture medium, CCM) bei der Kultivierung von Zellen hinzugefügt, da sie für das Kultivieren benötigte Wachstumsfaktoren enthalten. Im Zusammenspiel mit Partikelsuspensionen haften sie aber an die Partikel an und bilden eine sogenannte Korona, welche den Partikeln eine neue, *biologische Identität* verleiht [50,51]. Anders als die *synthetische Identität* (Größe, Form und Zusammensetzung der Partikel) ist die *biologische Identität*, die noch von zahlreichen weiteren Parametern abhängt, ausschlaggebend für die durch die Partikel bewirkten physiologische Eigenschaften wie Agglomerationsverhalten, Transport oder Toxizität. Mit seiner These, dass in den meisten Studien zur Toxizität von Nanopartikeln, der beobachtete Zelltod allein durch pure Überladung der Zellen mit Massen von Partikeln hervorgerufen wird und nicht durch toxische Effekte der Partikel, löste Wittmaack eine Kontroverse aus [52–54]. Unabhängig davon hängt die Giftigkeit sehr wahrscheinlich davon ab, wie stark Nanomaterialien von Zellen inkorporiert werden, weshalb dies ebenfalls Gegenstand vieler Studien ist. Dabei zeigt sich beispielsweise vornehmlich bei Epithelzellen eine deutliche Aufnahme der Siliziumdioxid-Nanopartikel [55–57]. Eine Studie von Gualtieri et al. [58] berichtet aber auch von nicht vorhandener Aufnahme von funktionalisierten Silika-Nanopartikeln in A549-Lungenepithelzellen und Lesniak et al. [59] zeigten, dass die Aufnahme von SiO₂-Partikeln sehr stark vom Vorhandensein einer Proteinkorona abhängig ist.

2.3 Dosis und Transport von Partikeln in *in-vitro*-Experimenten

Nahezu alle *in-vitro*-Studien zur Toxizität von Nanopartikeln haben ein gemeinsames Problem: die Definition der Dosis. Zum einen gibt es in der toxikologischen Forschung Uneinigkeit darüber, welche physikalische Größe mit etwaiger Toxizität korreliert [60]. Die drei gängigsten Größen sind die totale Anzahl, Masse und spezifische Oberfläche der verwendeten Partikel. Diese Unsicherheit geht sogar soweit, dass empfohlen wird, stets alle drei Größen zu messen [60]. Zum anderen ist umstritten, welche Metrik für die Dosis relevant ist: die *verabreichte Dosis*, d.h. die Gesamtheit der im Experiment befindlichen Partikel, oder die *effektive Dosis*, d.h. die Partikel, die tatsächlich in direkten Kontakt mit den Zellen kommen (auch zelluläre Dosis genannt). Erstere zu verwenden gilt als gängige Praxis, jedoch zeigen Teeguarden et al. [2], dass es begründeten Zweifel an deren Relevanz gibt, und schlagen entsprechend die effektive Dosis als Alternative vor. Betrachtet man beispielsweise in zwei analog gestalteten *in-vitro*-Experimenten gleiche Massenkonzentrationen zweier Partikel verschiedener Größe, entspräche dies nach allgemeinem Dafürhalten zwei identischen verabreichten Dosen. In Bezug auf die Partikelanzahl oder die spezifische Oberflä-

che unterscheiden sich die verabreichten Dosen aber um viele Größenordnungen, weshalb etwaige Korrelationen mit toxischen Effekten differenziert bewertet werden müssen. Darüber hinaus unterscheiden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die zellulären Dosen drastisch voneinander, da sie von Sedimentation und Diffusion bestimmt werden, die beide eine ausgeprägte Größenabhängigkeit aufweisen. Limbach et al. [61] zeigten mit einer einfachen Modellrechnung und dem Vergleich mit experimentellen Daten, dass der Transport von CeO_2 Nanopartikeln mit Größen von 20–50 nm in erster Linie diffusionsgetrieben ist, verglichen mit 250–500 nm großen Submikropartikeln (SMP), die sich in Suspensionen vor allem aufgrund von Sedimentation bewegen. Je größer Partikel sind, desto schneller sedimentieren sie. Andererseits diffundieren Partikel umso schneller, je kleiner sie sind. Je nach Größe der beiden betrachteten Partikel können sich daher die effektiven Dosen bei gleicher eingegebener Massenkonzentration sehr unterscheiden. Den Einfluss von Sedimentation auf die Dosis haben Cho et al. [62] in einem schönen Experiment gezeigt, in dem sie Zellen an einem Substrat haftend „kopfüber“ in eine Suspension von Gold Nanopartikeln getaucht haben. Der Vergleich mit dem normalen experimentellen Aufbau eines *in-vitro*-Versuches, in dem sich die Zellen auf dem Boden eines Reaktionsgefäßes befinden, erbrachte eine deutlich höhere Inkorporation von Partikeln größer 50 nm im Falle der auf dem Boden adhärenen Zellen. Bei kleineren Partikeln waren die Dosen jedoch vergleichbar, da in diesem Fall Partikeldiffusion dominiert und kaum Sedimentation stattfindet.

Der neue Ansatz von Teeguarden und Kollegen wird von der toxikologischen Gemeinschaft bisweilen zögerlich und auch kritisch aufgenommen. Unter anderem argumentieren Lison et al. [42], dass bei der Betrachtung der Partikelkinetik neben Sedimentation und Diffusion auch Konvektion berücksichtigt werden muss. Durch diese sei es sehr wohl möglich, dass ein Großteil der Partikel in Suspension die Zellen erreicht, weshalb sie die verabreichte Dosis weiterhin als die geeignete Metrik ansehen. Ungeachtet dessen wird in dieser Arbeit die These nach Teeguarden weiter verfolgt.

Wie bereits erwähnt ist der Transport von Partikeln durch Sedimentation und Diffusion abhängig von verschiedenen Materialparametern. Neben der Größenabhängigkeit spielen die Dichten von Partikel und Medium, dessen Temperatur sowie Viskosität eine wichtige Rolle [7]. Darüber hinaus beeinflusst etwaige Agglomeration von Partikeln beide Prozesse, insbesondere die Sedimentation, denn die größeren Agglomerate können eine höhere Sedimentationsrate aufweisen, sodass Sedimentation plötzlich auch für Nanopartikel mit Größen unter 50 nm an Relevanz gewinnt. Andererseits schließen Agglomerate während ihrer Bildung oft Medium ein, was deren effektive Dichte reduziert [63, 64]. Die Folge wäre eine Verringerung der Sedimentationsrate. Insbesondere im Vergleich zu kompakten Partikeln gleicher Größe ist die Sedimentation solcher Agglomerate deutlich verlangsamt. Indirekt hat auch die Proteinkorona Einfluss auf den Transport von Nanopartikeln, denn sie kann entscheidend das Agglomerationsverhalten der Partikel verändern [5, 65]. Ferner hat Wittmaack gezeigt, dass die effektive Dosis auch von der Höhe der Flüssigkeitssäule im Reaktionsgefäß abhängt [66]. Er bekräftigt außerdem die Notwendigkeit, die zelluläre Dosis zu bestimmen, um eine verlässliche Einschätzung der Toxizität von Nanopartikeln abgeben zu können.

2.4 Modellierung von Sedimentation und Diffusion zur Bestimmung der effektiven Dosis

Da eine Messung der effektiven Dosis nicht leicht zu realisieren ist, haben Hinderliter et al. [7] ein Programm zur Berechnung der deponierten Menge von Partikeln in *in-vitro*-Experimenten entwickelt. Grundlage des *In vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry* Modell, kurz ISDD, ist die

Mason Weaver Gleichung, welche unter vorgegebenen Randbedingungen numerisch gelöst wird. Man erhält als Ausgabe den Bruchteil deponierter Partikel, deren Gesamtzahl, -masse und gesamte spezifische Oberfläche. In Kombination mit der volumetric centrifugation method (VCM) zur präzisen Bestimmung der effektiven Dichte von Agglomeraten [63] liefert der integrierte Ansatz VCM-ISDD reproduzierbare Berechnungen der effektiven Dosis, die als Grundlage für Vergleiche von *in-vitro*-Experimenten unterschiedlicher Studien herangezogen werden können [67]. Gleichwohl gibt es dabei Einschränkungen. So kann nur eine Partikelgröße bzw. Agglomeratgröße auf einmal betrachtet werden und etwaige Auflösung von Partikeln wird vernachlässigt. Ferner wird mögliche Rückdiffusion vom Boden des Reaktionsgefäßes ins Medium unterbunden, da die Randbedingungen an dieser Stelle eine perfekt adsorbierende, „sticky“ Oberfläche implizieren. Das neueste verfügbare Modell zur Beschreibung des Partikeltransports *in-vitro* ist das *Distorted Grid* Modell, kurz DG-Modell, von DeLoid et al. [8]. Es basiert ebenfalls auf Sedimentation und Diffusion, verfolgt aber einen iterativen Ansatz statt die Mason Weaver Gleichung numerisch zu lösen. Anders als ISDD verfügt es über ein Modell zur Beschreibung von Partikelauflösung und variable Randbedingungen bezüglich Partikelhaftung am Boden des Reaktionsgefäßes. Es ist außerdem möglich, das Verhalten von Partikeln mit vorgegebenen Größenverteilungen simultan zu simulieren. Im direkten Vergleich mit deutlich komplexeren Berechnungen mittels dreidimensionaler Numerischer Strömungsmechanik, zeigte das eindimensionale DG-Modell eine gute Übereinstimmung [8].

2.5 Verfahren zur Messung der effektiven Dosis

Ein gängiges Verfahren zur Messung der effektiven Dosis ist die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. inductively-coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) [42,45,61,68]. Diese und ähnliche Techniken haben aber einige Nachteile. Zum einen sind sie destruktiv, da die Zellen vom Substrat abgelöst werden müssen, zum anderen bieten sie keinerlei orts aufgelöste Informationen, sondern liefern nur eine gemittelte Dosis. Zudem erlauben sie keine Differenzierung zwischen Partikeln auf, in oder neben Zellen.

Empfehlenswerter sind daher bildgebende Techniken, jedoch ist das Auflösungsvermögen von gewöhnlicher Lichtmikroskopie und Standard-Fluoreszenzmikroskopie beugungsbedingt auf etwa die halbe Wellenlänge, d.h. 200–250 nm, beschränkt. Die Fluoreszenzmikroskopie hat jedoch z.B. durch die Entwicklung der stimulated emission depletion (STED) Mikroskopie in den letzten Jahren immense Fortschritte gemacht [69,70]. Mittels stimulierter Emission können angeregte Fluorochrome im Randbereich des durch den Anregungslaser beleuchteten Gebietes abgeschaltet werden, sodass eine viel kleinere Fläche als ursprünglich angeregt fluoresziert, was mittlerweile eine Auflösung von bis zu erstaunlichen 2,4 nm ermöglicht [71]. Peuschel et al. [9] haben erst kürzlich als erste STED Mikroskopie zur Quantifizierung der zellulären Aufnahme von SiO₂-NP in A549-Zellen eingesetzt. Dank einer Auflösung von 61 ± 4 nm war es ihnen möglich, einzelne 85 nm große Partikel zu quantifizieren; bei 25 nm Partikeln war dies nicht mehr möglich. Dennoch gibt es auch in der STED Mikroskopie Einschränkungen, wie die allgemeine Abhängigkeit von Fluorochromen, die es nur erlaubt gezielt einige wenige spezifische Merkmale abzubilden. Ferner wirkt sich die Größe dieser Farbstoffe und wie dicht sie platziert werden können einschränkend auf die Auflösung aus. Außerdem tendieren sie dazu, schnell auszubleichen, was die Messungen fehleranfällig macht, insbesondere bei kleinen Objekten mit an sich nur schwacher Fluoreszenz. Ein weiteres Manko ist die sehr zeitintensive Aufnahme und Auswertung der Daten, sodass in einem vertretbaren zeitlichen Rahmen nur Ergebnisse von geringer statistischer Aussagekraft erzielbar sind.

Um gleichzeitig (nicht-) fluoreszierende Nanopartikel und die Ultrastruktur von Zellen abbilden zu können, wird die Elektronenmikroskopie eingesetzt. Rastertransmissionselektronenmikroskopie

(engl. scanning transmission electron microscopy, STEM) ermöglicht es die Ultrastruktur von Zellen in Dünnschnitten eingebetteter Proben detailliert abzubilden und so die genaue Lage inkorporierter Nanopartikel zu bestimmen [45, 72, 73]. Die Nachteile sind eine sehr aufwändige Probenpräparation und die eingeschränkte statistische Relevanz der gewonnenen Informationen, da nur Ausschnitte von Zellen betrachtet werden.

Rasterelektronenmikroskopie (REM) dagegen ermöglicht eine hohe Ortsauflösung und flächendeckende Untersuchungen, weshalb es durchaus geeignet ist effektive Dosen von Nanopartikeln zu bestimmen. Die ersten Versuche REM, für die Abbildung von Nanopartikeln im zellulären Kontext zu verwenden, reichen in der Zeit weit zurück. Als einer der Ersten nutzte Weller [74] Haemocyanin Moleküle zum *immuno labeling*, um bestimmte Bindungsstellen auf Zelloberflächen zu finden und zu markieren. Die Größe und Form dieser zylinderförmigen Moleküle von $35 \text{ nm} \times 50 \text{ nm}$ erlaubte es, sie mit Sekundärelektronen (SE) klar abzubilden, da SE-Abbildungen hohen Topografiekontrast aufweisen. SE entstehen oberflächennah und haben per Definition Energien von bis zu 50 eV. Rückstreuielektronen dagegen (engl. backscattered electrons, BSE) sind, wie der Name bereits andeutet, aus der Probe zurückgestreute Primärelektronen (PE), deren Energie von 50 eV bis zur PE-Energie reichen kann. Sie können aus deutlich tieferen Regionen der Probe austreten und tragen vor allem materialspezifische Informationen. Trejdosiewicz et al. [75] konnten sich diese Eigenschaft der BSE einige Jahre nach Weller zu Nutze machen, um mit Materialkontrast kolloidale Gold Partikel auf Zelloberflächen abzubilden. Die Abbildung von 45 nm großen Gold Nanopartikeln, die zum *immunogold labeling* auf Zellen verwendet werden, konnte Harven [76] kurze Zeit später nochmals verbessern, indem er SE- und BSE-Aufnahmen kombinierte. In jüngerer Vergangenheit haben beispielsweise Gupta und Curtis [77] REM genutzt, um metallische NP auf Zellen abzubilden, jedoch ohne eine quantitative Auswertung. Dabei kamen sowohl eine Färbung mit Osmiumtetroxid zur Kontrasterhöhung als auch eine dünne Beschichtung mit Gold zur Erhöhung der SE-Ausbeute und der elektrischen Leitfähigkeit der zellulären Proben zum Einsatz. Beide Verfahren können aber zu unerwünschten Nebeneffekten wie dem Verdecken von feinen Details der Zelloberfläche oder der Maskierung von Nanopartikeln führen [78, 79], weshalb ein Verzicht darauf wünschenswert ist. Dies wird möglich, indem man Zellen auf dünnen, metallischen Filmen kultiviert, welche bei der REM Abbildung für den nötigen Ladungsaustausch sorgen und damit Aufladung effektiv verhindern [80, 81]. Sogar eine Quantifizierung der zellulären Dosis ist so möglich [80]. Eine spezielle Variante dieses Verfahrens ist die Beschichtung von Glasobjektträgern mit Indium-Zinn-Oxid (engl. indium tin oxide, ITO), auf welchem Zellen kultiviert werden können [10]. Das ITO hat den Vorteil, dass es neben einer hohen elektrischen Leitfähigkeit und guter Biokompatibilität auch Transparenz für sichtbares Licht vorweisen kann, weshalb sich diese Substrate prinzipiell auch für korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie eignen [82]. Eine alternative Methode um Aufladungen der Probe im Rasterelektronenmikroskop zu vermeiden, ist eine bestimmte Menge Gas in der Probenkammer zu belassen, welches durch Stöße mit schnellen Elektronen ionisiert wird und so für einen Ladungsaustausch auf der Probe sorgt [83]. Die Kehrseite dieses Prinzips ist eine schlechtere Auflösung und ein schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Dennoch zeigen einige Gruppen interessante Anwendungen der „environmental scanning electron microscopy“ (ESEM) [84–88]. Sieht man von der Möglichkeit ab, aus REM-Abbildungen mit BSE-Tiefeninformationen zu gewinnen [81, 89], so erlaubt die REM primär die Abbildung von Oberflächen. Kombiniert man sie aber mit fokussierten Ionenstrahlen (engl. focused-ion-beams, FIB), lässt sich auch beispielsweise das Innere von Zellen abbilden [90–92]. Das Prinzip von FIB ähnelt dem der REM, jedoch werden nicht Elektronen, sondern Ionen aus einer Ionenquelle beschleunigt und zu einem Strahl gebündelt. Mit diesem lassen sich aufgrund der vergleichsweise großen Masse der Ionen Oberflächenatome der Probe herauslösen, was als Sputtern bezeichnet wird. Verbindet man diese Technik mit einem seitlich dazu angeordneten REM, so lässt sich Tomografie von Zellen betreiben. Dabei wird die Zelle mittels FIB schichtweise abgetragen und mit REM seitlich betrachtet (slice-and-view Prinzip). Auf

diese Weise ist sogar die dreidimensionale Rekonstruktionen von ganzen Zellen möglich [93].

2.6 Rasterelektronenmikroskopie mit Rückstreuelektronen

Während SE zur Abbildung der Oberflächentopografie genutzt werden, ermöglichen BSE dank ihrer ausgeprägten Ordnungszahlabhängigkeit die Darstellung von Materialkontrast. Das erlaubt es, Nanopartikel mit unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen zu unterscheiden. BSE-Abbildungen sind abhängig vom Rückstreukoeffizienten η , welcher als das Verhältnis austretender BSE zu auftreffenden PE definiert ist.

Reimer und Tollkamp [94] haben die Rückstreukoeffizienten verschiedener Materialien für Energien zwischen 1–30 keV gemessen und festgestellt, dass sie für Energien oberhalb von ungefähr 5 keV unabhängig von der PE-Energie E_0 sind. Eine umfangreiche Zusammenfassung früherer Arbeiten zu η verfasste Niedrig [95]. In seiner Arbeit betrachtet er den Rückstreukoeffizienten für dünne, freitragende Filme, massive Proben sowie dünne Filme auf massiven Proben und diskutiert dessen Abhängigkeit von Filmstärke, Ordnungszahl Z des Probenmaterials und E_0 . Hierzu werden theoretische Modelle mit experimentellen Daten verglichen. Eine aktuellere Zusammenfassung findet sich in [96].

Lange ist nur noch wenig im Bereich der Rückstreuelektronen geforscht worden, doch in den letzten Jahren ist dank der Verbesserung von Elektronenquellen und -optiken und getrieben durch den Vormarsch der Nanotechnologie wieder ein steigendes Interesse an REM zu verzeichnen. Speziell der Bereich niedriger Energien (low-keV REM) steht dabei im Fokus, da so Verlagerungsschäden an empfindlichen Proben reduziert werden können. Weitere Vorteile bilden ein höherer Materialkontrast und eine verbesserte Auflösung. Einen der Vorreiter in der low-keV REM stellt Cazaux dar, der beispielsweise gemessene und berechnete Rückstreukoeffizienten zahlreicher Elemente für $E_0 < 5$ keV zusammengestellt hat [97]. In einer späteren Arbeit unterbreitete er den Vorschlag eines völlig neuen Kontrastmechanismus abhängig von der Austrittsarbeit [98].

Trotz allem werden BSE-Abbildungen kaum quantitativ ausgewertet, indem Vergleiche zwischen experimentellen Daten und simulierten REM-Intensitäten durchgeführt werden. Morandi et al. [99] suchten beispielsweise mit Hilfe von Monte-Carlo (MC) Simulationen optimale BSE-Bedingungen, um die räumliche Verteilung von Antimon in Sb-dotiertem Silizium zu bestimmen. Sánchez et al. [100] bestimmten die mittlere Ordnungszahl von polierten metallischen und mineralischen Proben basierend auf der gemessenen BSE-Intensität. Seiter et al. [89] nutzten BSE-Abbildungen von Zelldünnschnitten mit inkorporierten SiO₂-NP zur Bestimmung der Informationstiefe von Rückstreuelektronen. Mit der verwendeten Methode konnten sie ferner sehr gut die Ultrastruktur der Zellen abbilden und dabei auf nachträgliches Kontrastieren (poststaining) verzichten. Schließlich verwendeten Müller und Gerthsen [101] BSE zur Quantifizierung der chemischen Zusammensetzung von elektronentransparenten Proben, was anhand der Bestimmung von Indiumkonzentrationen x in dünnen In_xGa_{1-x}As Schichten demonstriert wurde.

Unabhängig vom Materialkontrast enthalten BSE auch stets topografische Informationen. Prinzipiell lässt sich Topografiekontrast in BSE-Aufnahmen unterbinden, indem man Proben poliert. Dies ist jedoch nicht immer möglich, beispielsweise wenn sich NP auf der zu untersuchenden Probe befinden. Um BSE in solchen Fällen dennoch effektiv nutzen zu können, ist ein genaues Verständnis der Kontrastentstehung notwendig. Hirsch et al. [11] haben den BSE-Kontrast von 40 nm Gold Nanopartikeln auf Silizium Substraten gemessen und stellten eine ausgeprägte E_0 Abhängigkeit fest. Der Kontrast wird maximal, wenn die Eindringtiefe der Primärelektronen dem Durchmesser der Partikel entspricht. Der Vergleich mit MC-Simulationen bestätigte diese Beobachtung.

Kapitel 3

Methodische und theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel soll die zum Verständnis dieser Arbeit nötigen Grundkenntnisse vermitteln. In Kapitel 3.1 werden der grobe Aufbau von Zellen und deren verschiedene Typen beschrieben. Abschnitt 3.2 widmet sich den Details der beiden bekannten Ansätze zur Modellierung von Partikeldeposition. In Absatz 3.3 werden die Grundlagen der Rasterelektronenmikroskopie erläutert, sowie die Simulation beschleunigter Elektronen mittels Monte-Carlo-Simulationen erklärt. Zuletzt geben Kapitel 3.5 und 3.6 einen kurzen Überblick über die Funktionsweise und Anwendungsgebiete der ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Techniken Rastertransmissionselektronenmikroskopie und Tomografie mit fokussierten Ionenstrahlen.

3.1 Zellen – Aufbau und Varianten

Aufgrund ihres unterschiedlichen zellulären Aufbaus lassen sich alle Lebewesen grundsätzlich in zwei Kategorien aufteilen: Eukaryoten und Prokaryoten [102]. Die Zellen von Eukaryoten besitzen einen Zellkern, prokaryotische Zellen nicht. Zu letzteren zählen vor allem Bakterien. Weiterhin unterscheidet beide Zelltypen, dass Eukaryotenzellen im Cytoplasma Organellen haben, die von Membranen umhüllt sind. Prokaryotenzellen bestehen dagegen nur aus Cytoplasma. Eukaryotische Zellen lassen sich in pflanzliche, tierische und Pilzzellen spezifizieren [103]. Der Aufbau eukaryotischer Zellen wird im Folgenden genauer beschrieben.

Abbildung 3.1 zeigt schematisch die Bestandteile einer Eukaryotenzelle. Grundsubstanz einer Zelle ist das Cytosol (a), welches für einen neutralen pH-Wert und für den Transport von Material in der Zelle verantwortlich ist. Zusammen mit den verschiedenen Organellen, auf die im Folgenden noch näher eingegangen wird, bildet es das Cytoplasma, welches durch eine Plasmamembran umgeben ist, die die Zelle nach außen hin abgrenzt. Das zentrale Organell ist der von einer Doppelmembran umschlossene Zellkern (b), der das Erbgut, die Desoxyribonukleinsäure (DNS), enthält. Innerhalb des Zellkerns finden sich ein oder mehrere Zellkörperchen, die Nucleoli (c). Sie enthalten vornehmlich Ribonukleinsäure (RNS) und synthetisieren Ribosomen (d). An ihnen werden die in der RNA gespeicherten Informationen in Proteine umgewandelt. Mitochondrien sind die Kraftwerke der Zelle (e). Sie wandeln durch Oxidation die vom Organismus aufgenommen Nährstoffe in Energie um, welche den Zellen in Form von Adenosintriphosphat universell zur Verfügung steht. Auch die Mitochondrien werden von einer doppelten Membran vom restlichen Cytoplasma abgegrenzt. Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein weitverzweigtes System von membranumhüllten Kammern. Es wird in ein rauhes ER (f) und ein glattes ER (g) unterteilt, die unterschiedliche Aufgaben

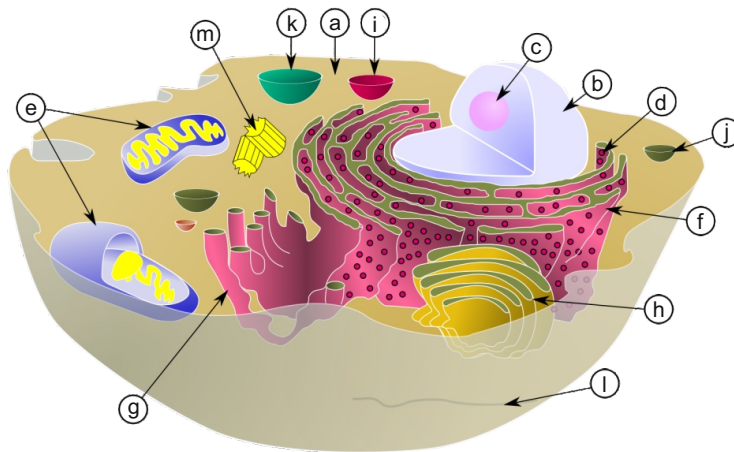


Abbildung 3.1. Schematische Darstellung der Bestandteile einer eukaryotischen Zelle [104]. a) Cytosol, b) Zellkern, c) Nukleolus, d) Ribosomen, e) Mitochondrien, f) raues ER, g) glattes ER, h) Golgi-Apparat, i) Lysosom, j) Vesikel, k) Vakuole, l) Cytoskelett, m) Zentriole.

haben. Das raue ER betreibt Proteinsynthese und Membranproduktion, das glatte ER synthetisiert Lipide und entgiftet die Zelle. Ein ähnliches Organell, welches aus durch eine Membran geformten Kammern besteht, ist der Golgi-Apparat (h). Die übereinander gestapelten Kammern nehmen die vom ER synthetisierten Moleküle auf, modifizieren sie und verteilen sie dann an verschiedene Orte innerhalb und außerhalb der Zelle. Lysosomen (i) sind ebenfalls von einer Membran umschlossene Organellen, die für die zellinterne Verdauung verantwortlich sind. Vesikel (j) sind kleine Membranblasen, die für den intra- und interzellulären Austausch von Stoffen sorgen. Sie schnüren sich von einer Membran ab – sei es die eines Organells oder die äußere Plasmamembran einer Zelle – und verbinden sich an anderer Stelle wieder mit der Membran eines anderen Organells oder einer anderen Zelle. Ähnlich gebaut sind die Vakuolen (k), welche unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Das Cytoskelett (l) besteht aus fadenförmigen Proteinfilamenten und definiert die Form und Struktur der Zelle. Darüber hinaus ermöglicht es die aktive Bewegung der Zelle. Je nach Durchmesser haben die Filamente leicht unterschiedliche Funktionen und andere Bezeichnungen. Die dicksten unter ihnen, die Mikrotubuli, spielen beispielsweise bei der Zellteilung eine wichtige Rolle. Die zylinderförmigen Anordnungen von Mikrotubuli werden Zentriolen genannt (m).

In dieser Arbeit werden menschliche Alveolarepithelzellen der A549-Zelllinie verwendet. Sie stammen von einem Lungentumor eines 58jährigen weißen Amerikaners [105].

3.2 Modellierung von Partikeltransport *in-vitro*

Zur Modellierung der Partikeldeposition wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Programme herangezogen, die im Folgenden kurz vorgestellt werden. Während dem ISDD-Modell ein numerisches Lösungsverfahren zu Grunde liegt, basiert das DG-Modell auf einem iterativen Ansatz.

3.2.1 In vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry (ISDD) Modell

ISDD war das erste verfügbare Modell, um einfach und schnell den Transport von Partikeln in *in-vitro*-Versuchen zu simulieren [7]. Es ist geschrieben in Matlab (The MathWorks, Inc., Na-

tick, USA) und basiert auf der *Mason-Weaver-Gleichung* [3], welche den Partikeltransport nicht wechselwirkender Teilchen durch Sedimentation und Diffusion unter dem Einfluss von Gravitation eindimensional beschreibt:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - V \frac{\partial c}{\partial z} \quad (3.1)$$

wobei c die Partikelkonzentration, t die Zeit und z eine Ortskoordinate ist. D ist die Diffusionskonstante der Partikel und V die Sedimentationsgeschwindigkeit. Der erste Term auf der rechten Seite der Mason-Weaver-Gleichung beschreibt den Teilchenfluss aufgrund eines Konzentrationsgradienten, der zweite Term den Teilchenfluss aufgrund der

Im Einzelnen wirken auf ein Nanopartikel in einem viskosen Medium drei Kräfte: die Gravitationskraft

$$F_G = m_P g \quad (3.2)$$

mit der Partikelmasse m_P und der Gravitationsbeschleunigung g , die Auftriebskraft

$$F_A = \rho_{Medium} V_P g \quad (3.3)$$

mit der Dichte vom Medium ρ_{Medium} und dem Partikelvolumen V_P und die Reibungskraft F_R . Da die Reynolds-Zahlen sphärischer Partikel mit Durchmessern kleiner $100 \mu\text{m}$ sehr viel kleiner als 1 sind [106], erfolgt die Bewegung der Partikel ohne Turbulenzen, d.h. sie werden laminar vom Fluid umströmt. Deshalb lässt sich die Reibungskraft nach dem Stokes'schen Gesetz als

$$F_R = 3\pi\mu d_P V \quad (3.4)$$

beschreiben, mit der Viskosität μ des Mediums, dem Partikeldurchmesser d_P und der Geschwindigkeit des Partikels V . Befinden sich die drei wirkenden Kräfte im Gleichgewicht:

$$F_G = F_R + F_A \quad (3.5)$$

erreicht das Partikel seine Endgeschwindigkeit, die Sedimentationsgeschwindigkeit. Aus der Gleichgewichtsgleichung 3.5 lässt sich folglich die Stokes'sche Gleichung für V ableiten:

$$V = \frac{(\rho_P - \rho_{Medium})gd_P^2}{18\mu} \quad (3.6)$$

wobei ρ_P die Materialdichte des Partikels ist.

Diffusion von Partikel tritt zum Ausgleich von Konzentrationsunterschieden auf und wird durch die Brownsche Bewegung der Partikel im Medium bewirkt. Die Brownsche Bewegung wiederum ist eine unregelmäßige, ruckartige Bewegung von Teilchen, die durch Stöße der umgebenden Moleküle aufgrund deren Wärmebewegung hervorgerufen wird. Aus Regionen hoher Konzentration bewegen sich so statistisch mehr Partikel in Regionen niedriger Konzentration, was zur vollständigen Durchmischung führt. Die Diffusionskonstante D hängt in Bereichen niedriger Reynolds-Zahlen nach der Stokes-Einstein-Gleichung [107] lediglich vom Partikeldurchmesser d_P , der Temperatur T und der Viskosität des Mediums μ ab:

$$D = \frac{RT}{3N_A\pi\mu d_P} \quad (3.7)$$

wobei R die Gaskonstante und N_A die Avogadrozahl sind.

In ISDD wird die Mason-Weaver-Gleichung 3.1 numerisch gelöst und so der sich am Boden des Reaktionsgefäßes befindliche deponierte Bruchteil der eingegebenen Gesamtmenge an Partikeln in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.

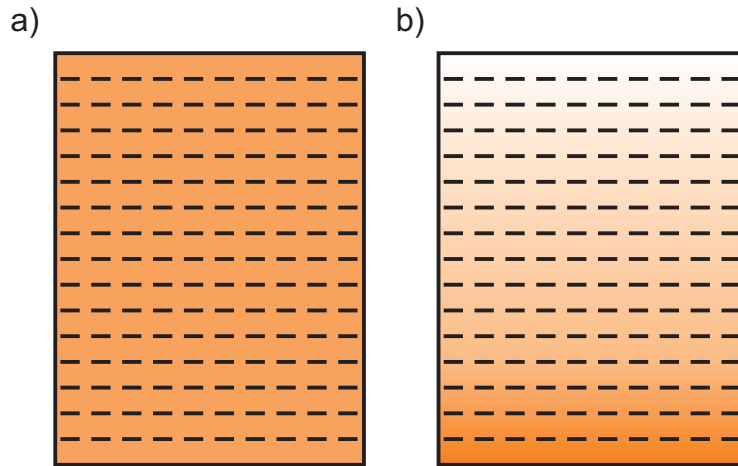


Abbildung 3.2. Schematische Darstellung der Aufteilung der Flüssigkeitssäule einer Suspension mit einer bestimmten Ausgangskonzentration in einzelne Segmente zum Zeitpunkt a) $t = 0$ und b) $t \gg 0$. Die Intensität der Farbe gibt die Konzentration wieder.

3.2.2 Distorted Grid Modell

Ein anderes Programm zur Berechnung der Sedimentation und Diffusion von Partikeln *in-vitro* ist das DG-Modell [8]. Die ebenfalls in Matlab geschriebene Software basiert – ähnlich wie ISDD – auf Diffusion (Gleichung 3.7) und Sedimentation (Gleichung 3.6), folgt aber einer anderen Herangehensweise. In einer eindimensionalen Betrachtung einer Partikelsuspension, in der zum Zeitpunkt $t = 0$ alle Partikel homogen verteilt sind, wird die Flüssigkeitssäule in Segmente aufgeteilt (s. Abbildung 3.2a). Für jedes individuelle Segment i wird die Konzentrationsänderung durch Diffusion $\Delta c_{i,j}^d$ und Sedimentation $\Delta c_{i,j}^s$ von Partikeln in das Segment und aus ihm heraus so wie in [8] berechnet, wobei j die einzelnen Spezies der vorgegebenen Partikel-Größenverteilung indiziert. Diese Änderungen werden der bisherigen Konzentration $c_{i,j}$ hinzugefügt:

$$c'_{i,j} = c_{i,j} + \Delta c_{i,j}^d \quad \text{bzw.} \quad (3.8)$$

$$c'_{i,j} = c_{i,j} + \Delta c_{i,j}^s \quad (3.9)$$

Diese Schritte werden iterativ für jedes Zeitintervall Δt wiederholt, bis die vom Anwender gewählte Gesamtzeit erreicht wurde, wobei Sedimentation und Diffusion alternierend berechnet werden. Am Ende der Simulation erhält man eine Partikelverteilung in der Suspension, wie sie beispielhaft in Abbildung 3.2b anhand des Farbverlaufs veranschaulicht ist. Die deponierte effektive Dosis entspricht schließlich allen Partikeln im untersten Segment.

Der für diese Arbeit essentielle Unterschied zu ISDD liegt in der Implementierung von variablen Randbedingungen am unteren Ende der Flüssigkeitssäule, genannt *stickiness*. Mit ihr lässt sich die Haftung der Partikel an der Oberfläche anpassen. Beschrieben wird dieser Faktor mittels der Langmuirschen Gleichgewichtskonstante K_D , welche wie folgt definiert ist:

$$K_D = \frac{1-f}{f} c_{mol} \quad (3.10)$$

wobei f die relative Bedeckung der Oberfläche des Sorbenten ist (Zelle oder Substrat) und c_{mol} die molare Konzentration der Partikel. Diese wird aus der Partikelkonzentration im untersten Segment c_B berechnet:

$$c_{mol} = \frac{c_B}{\rho_P \cdot \frac{1}{6} \pi d_P^3 \cdot N_A} \quad (3.11)$$

mit der Partikeldichte ρ_P , dem Partikeldurchmesser d_P und der Avogadro-Konstante N_A .

Bei vorgegebener K_D kann der Anteil gebundener Partikel F_b im untersten Segment wie in [8] berechnet werden, was die Anzahl freier Partikel, die in das darüber liegende Segment zurück diffundieren können, reduziert:

$$c_{frei} = c_B - F_b c_B \quad (3.12)$$

wobei c_B die Partikelkonzentration im untersten Segment ist. Für die Berechnung der Konzentrationsänderung durch Diffusion $\Delta c_{i,j}^d$ wird dann c_{frei} verwendet. Typische Werte für K_D liegen zwischen 10^{-8} und 10^{-9} mol/L für *sticky*, d.h. adsorbierende Oberflächen. Kleinere Werte repräsentieren dabei stärkere Adsorption und umgekehrt. Nahezu reflektierende, d.h. *non-sticky* Oberflächen werden dagegen durch einfache Nichtbeachtung von K_D realisiert. Dadurch werden grundsätzlich alle Partikel, die sich im untersten Segment befinden, als freie Partikel erachtet und können damit prinzipiell wieder zurück in das vorletzte Segment diffundieren.

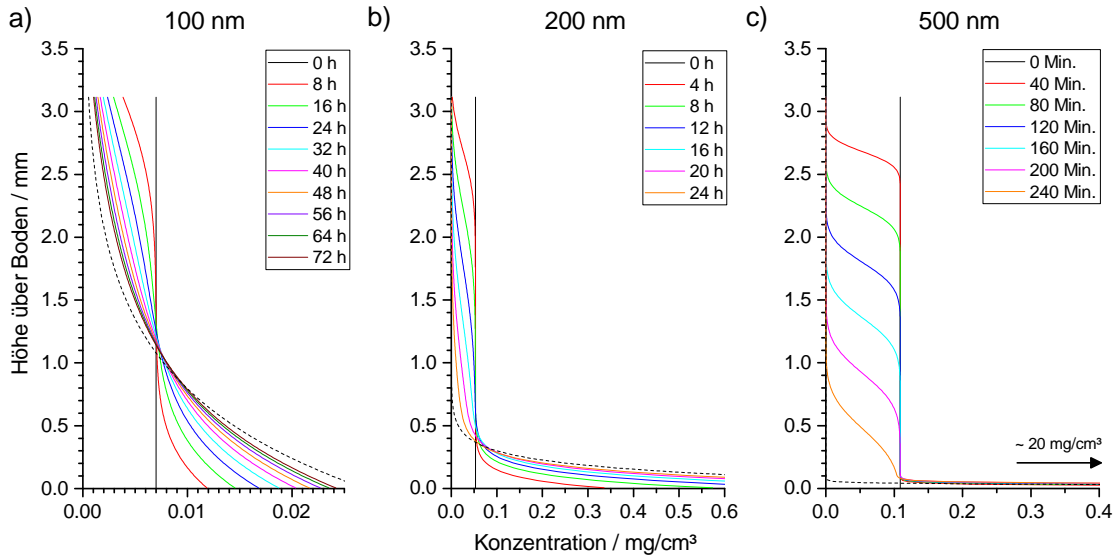


Abbildung 3.3. Mit dem DG Modell berechnete zeitabhängige Konzentrationsverläufe in der Flüssigkeitssäule für 100 nm (a), 200 nm (b) und 500 nm große Partikel (c). 0mm Höhe entspricht dem Boden der Säule. Schwarze, gestrichelte Linien sind stationäre Lösungen der Mason-Weaver-Gleichung (Gleichung 3.1).

Um den Einfluss der Sedimentation für die betrachteten Teilchengrößen in den in dieser Arbeit untersuchten Depositionszeiträumen abzuschätzen, sind in Abbildung 3.3 zeitabhängige Konzentrationsprofile von 100 nm, 200 nm und 500 nm großen Partikeln gezeigt, welche mit dem DG Modell unter *non-sticky* Randbedingungen berechnet wurden. Wie man an den unterschiedlichen Zeitangaben der einzelnen Kurven deutlich sehen kann, deponieren die Partikel unterschiedlich schnell. Im Fall der 100 nm Partikel in Abbildung 3.3a nähert sich das Konzentrationsprofil nach 72 h der exponentiellen Gleichgewichtsverteilung (gestrichelte Linie), gegeben durch die stationäre Lösung der Mason-Weaver-Gleichung (Gleichung 3.1), schon relativ nah an. Tatsächlich wird diese aber erst nach über 140 h erreicht. Daran sieht man, dass die Sedimentation bei Partikeln dieser Größenordnung sehr langsam abläuft. Im Gegenzug dazu sedimentieren 200 nm große Partikel deutlich schneller, weshalb die Deposition auch zügiger stattfindet (s. Abbildung 3.3b). Bereits nach 24 h ähnelt das Konzentrationsprofil der Gleichgewichtsverteilung stark, was schließlich nach ca. 48 h auch erreicht ist. Am schnellsten sedimentieren 500 nm große Partikel, was man auch deutlich an der zeitlichen Entwicklung des Konzentrationsprofils in Abbildung 3.3c sieht. Innerhalb von 4 h ist ein Großteil der suspendierten Partikel sedimentiert. Die stationäre Lösung ist nach bereits 8 h

erreicht. Zu diesem Zeitpunkt sind nahezu alle Partikel sedimentiert und befinden sich in den untersten Segmenten der Flüssigkeitssäule, sodass die Konzentration dort sehr groß wird, wie durch den schwarzen Pfeil in Abbildung 3.3c auch angedeutet wird. Schön zu sehen ist auch, wie in den ersten 4h durch Diffusion die Konzentrationskurve zunehmend langgezogen wird, was deutlich macht, dass auch Partikel dieser Größenordnung recht zügig diffundieren.

3.3 Rasterelektronenmikroskopie

3.3.1 Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops

Abbildung 3.4a zeigt beispielhaft die grundlegenden Bestandteile des in dieser Arbeit verwendeten Rasterelektronenmikroskops FEI Quanta650 ESEM sowie deren Anordnung. Im Folgenden wird der Aufbau grob erläutert, welcher zusätzlich in Abbildung 3.4b schematisch detaillierter dargestellt wird.

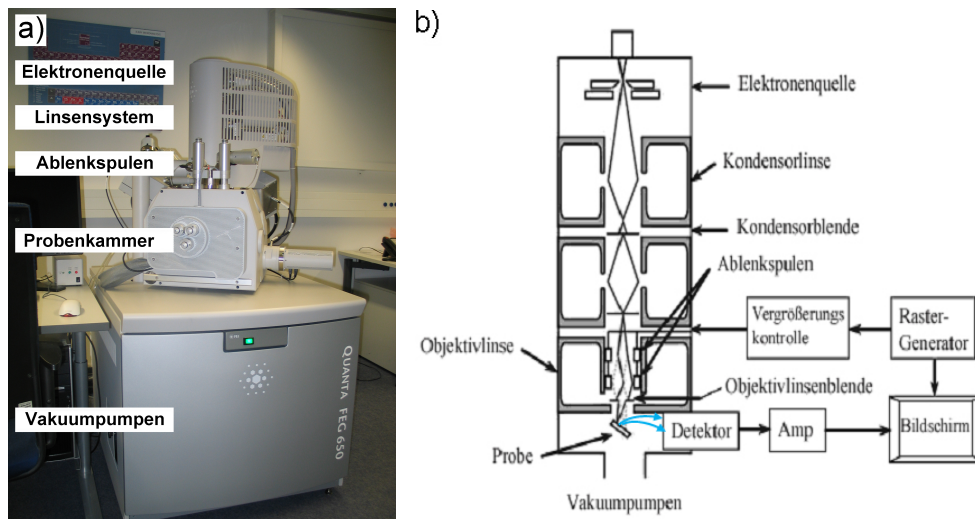


Abbildung 3.4. a) Fotografie eines FEI Quanta 650 ESEM mit markierten Positionen wesentlicher Bestandteile und b) Schematische Darstellung eines Rasterelektronenmikroskops nach [108].

Kernelement des Mikroskops ist die Elektronensäule bestehend aus Elektronenquelle, Linsensystem und Ablenkspulen. Ältere Geräte haben meist eine Glühkathode mit gebogenem Wolframdraht oder LaB_6 -Kristall als Elektronenquelle. Die Energieverteilung der austretenden Elektronen folgt einer Maxwell-Verteilung, deren Breite durch die Halbwertsbreite ΔE_0 gegeben ist. Bei einer Glühkathode ist diese relativ groß ($\Delta E_0 = 0,5 - 2 \text{ eV}$ für einen LaB_6 -Kristall), was eine hohe chromatische Aberration zur Folge hat. Moderne Mikroskope dagegen haben eine Feldemissionskathode (engl. field emission gun, FEG) als Elektronenquelle. Bei einer FEG werden Elektronen aus einer äußerst feinen Spitze mittels Anlegen eines sehr hohen elektrischen Feldes aus dem Material gelöst, wobei der quantenmechanische Tunneffekt zur Reduktion der Austrittsarbeit ausgenutzt wird. Diese kalte Feldemission ermöglicht einen Elektronenstrahl mit sehr geringer Energieverteilung der Elektronen ($\Delta E_0 = 0,2 - 0,3 \text{ eV}$), dessen Intensität jedoch sehr gering ist. Einen Kompromiss aus beiden Techniken bildet die Schottky-Feldemissionskathode. Hierbei handelt es sich um eine FEG, die zusätzlich leicht geheizt wird, um die Austrittsarbeit zu reduzieren und so die Ausbeute auf Kosten einer höheren Energieverteilung ($\Delta E_0 = 0,3 - 0,5 \text{ eV}$) zu erhöhen. Die freien Elektronen werden in der Elektronensäule zur Anode hin auf typischerweise $1 - 30 \text{ keV}$ beschleunigt und mit-

tels elektromagnetischer Kondensorenlinse zu einem Strahl gebündelt. Eine Objektivlinse fokussiert schließlich den Elektronenstrahl auf einen einzelnen Punkt der Probe in der Probenkammer. Der Elektronenstrahl wird mittels Ablenkspulen zeilenweise über die Probe gerastert. Die durch die Wechselwirkung mit dem Probenmaterial generierten Signale (s. Abschnitt 3.3.3) werden durch spezielle Detektoren in der Probenkammer registriert, verstärkt, in Grauwerte umgewandelt und schließlich auf einem Bildschirm dargestellt. Zwei dieser Detektortypen – der Everhardt-Thornley-Detektor und Halbleiterdetektoren – werden am Ende von Kapitel 3.3.3 und in Kapitel 3.3.4 vorgestellt.

Das zum Betrieb des Mikroskops benötigte Vakuum wird durch ein mehrstufiges System bestehend aus Vorpumpe, Turbopumpe und Ionengetterpumpen erzeugt. Zum Einbau von Proben wird die Probenkammer mit Stickstoff belüftet, während in der Elektronensäule das Vakuum aufrecht erhalten wird.

3.3.2 Wechselwirkung zwischen Elektronen und Probe

Hochenergetische Elektronen treten in Wechselwirkung mit den Kernen von Atomen und sind zudem fähig – meist durch Streuprozesse – gebundene Elektronen aus Atomen zu lösen. Dabei werden zahlreiche sekundäre Signale generiert, deren Detektion die Grundlage der Elektronenmikroskopie ausmacht. Abbildung 3.5 veranschaulicht die typischen Signale, die in der Elektronenmikroskopie zur Informationsgewinnung genutzt werden. Sekundärelektronen und Rückstreuelektronen finden primär bei der Bildgebung in der REM-Anwendung, während TEM und STEM transmittierte Elektronen nutzen, welche wiederum je nach Streuwinkel verschiedene Intensitäten aufweisen. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichend dünne, elektronentransparente Probe. Charakteristische Röntgenstrahlen und Auger-Elektronen werden zur analytischen Elektronenmikroskopie genutzt. Die zugrunde liegenden Streuprozesse, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, lassen sich in elastische und unelastische Streuprozesse unterteilen. Bei elastischer Streuung gilt Energie- und Impulserhaltung, während unelastische Streuung mit einem Energieverlust der Elektronen verbunden ist. Aufgrund der relativ niedrigen Energie der Elektronen im Rasterelektronenmikroskop und der damit verbundenen hohen Anzahl von Streuprozessen lassen sich diese Prozesse näherungsweise im Teilchenbild erklären: Streuung eines geladenen Teilchens an geladenen Streuzentren.

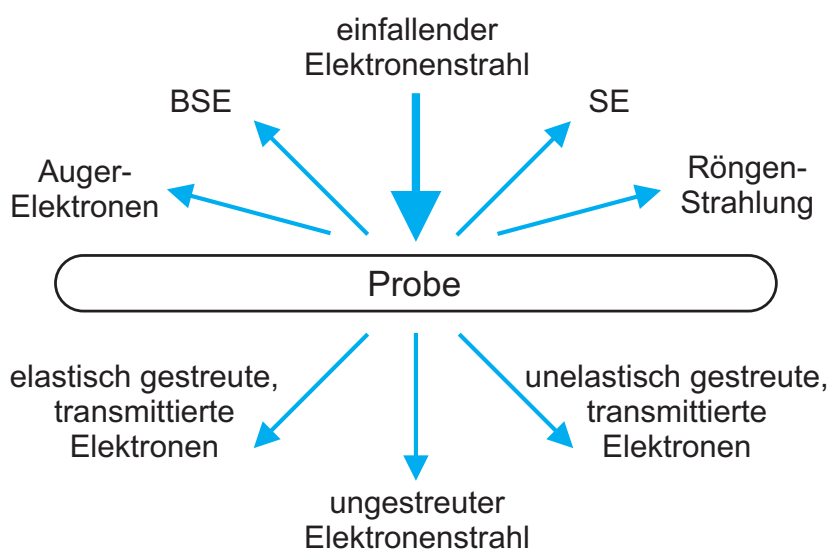


Abbildung 3.5. Zusammenfassung der wichtigsten, durch WW von hochenergetischen Elektronen mit Materie erzeugten Signale nach [109].

Elastische Streuung

Die nach ihrem Entdecker auch als Rutherford Streuung bezeichnete elastische Streuung zeichnet sich durch Energie- und Impulserhaltung aus und basiert auf der Wechselwirkung zweier geladener Streupartner gemäß dem Coulombschen Gesetz, wobei jegliche Wechselwirkung des gestreuten Teilchens mit der Elektronenhülle des Streuzentrums vernachlässigt wird. Der Wirkungsquerschnitt σ gibt die Gesamtwahrscheinlichkeit für das Eintreten von Streuprozessen an. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Teilchen mit einem Streuwinkel θ in den Raumwinkel $d\Omega$ gestreut wird, ist durch den differentiellen Wirkungsquerschnitt $\frac{d\sigma}{d\Omega}(\theta)$ gegeben.

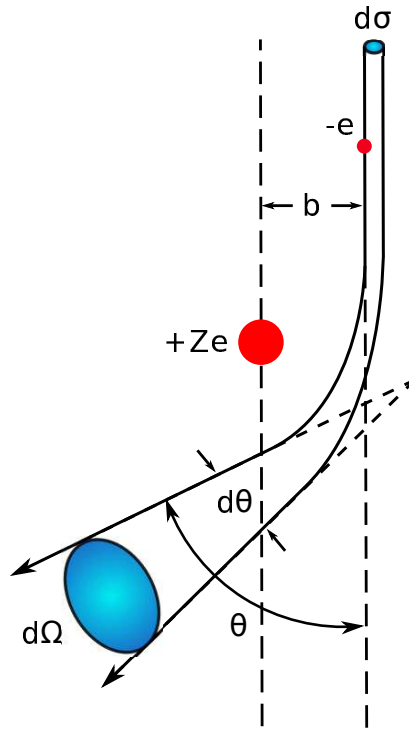


Abbildung 3.6. Schematische Illustration zur Berechnung des differentiellen Wirkungsquerschnittes nach Rutherford.

Abbildung 3.6 veranschaulicht die Definition sowie den Rutherford'schen Ansatz zur Berechnung des differentiellen Wirkungsquerschnittes. Ein Elektron mit Ladung $-e$ und Masse m_e , welches den Kern eines Atoms der Ladung $+Ze$ ($Z \hat{=}$ Ordnungszahl) mit der Geschwindigkeit v im Abstand b (Stoßparameter) passiert, erfährt im Coulomb-Feld des Kerns eine Ablenkung um den Streuwinkel θ . Parallel einfallende Elektronen, die durch eine Fläche $d\sigma$ fliegen, werden entsprechend in den Raumwinkel $d\Omega$ gestreut, da aufgrund der r^{-2} Abhängigkeit der Coulomb-Kraft der Winkel θ mit zunehmendem Stoßparameter b abnimmt. Das Verhältnis $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ in Abhängigkeit von θ bildet schließlich den differentiellen Wirkungsquerschnitt, welcher sich nach Rutherford wie folgt berechnet [110]:

$$\frac{d\sigma_R}{d\Omega} = \frac{e^4 Z^2}{4(4\pi\epsilon_0)^2 m_e^2 v^4} \frac{1}{\sin^4(\theta/2)} \quad (3.13)$$

Infolge des Vernachlässigens jeglicher Wechselwirkung mit der Elektronenhülle weist der Rutherford'sche Wirkungsquerschnitt eine Singularität für $\theta \rightarrow 0$ auf. Tatsächlich erfährt das langreichweitige Coulomb-Feld des Kerns durch die Hüllenelektronen eine Abschirmung, die für große Stoßparameter bzw. entsprechend kleine Streuwinkel θ relevant wird. Durch das Hinzufügen eines ex-

ponentiellen Faktors zum Coulomb-Potential kann der Abschirmung näherungsweise Rechnung getragen werden [111]:

$$V_{We}(r) = -\frac{e^2 Z}{4\pi\epsilon_0 r} e^{-r/R_A} \quad (3.14)$$

Hierbei bezeichnet $R_A = a_H Z^{-1/3}$ den atomaren Abschirmradius und a_H wiederum den Bohr'schen Radius. Die Berechnung des differentiellen Wirkungsquerschnittes ist jedoch klassisch nicht mehr möglich, sondern erfordert eine quantenmechanische Betrachtung. Mit Hilfe der De-Broglie-Wellenlänge $\lambda = h/mv$ und der Einführung des charakteristischen Winkels θ_0 , definiert durch $\sin(\theta_0/2) = \lambda/4\pi R_A$, berechnet sich der differentielle Wirkungsquerschnitt im abgeschirmten Fall wie folgt [96]:

$$\frac{d\sigma_{ScR}}{d\Omega} = \frac{e^4 Z^2}{4(4\pi\epsilon_0)^2 m_e^2 v^4} \frac{1}{(\sin^2(\theta/2) + \sin^2(\theta_0/2))^2} \quad (3.15)$$

Für kleine Winkel $\theta \ll \theta_0$ ist dieser allgemein auch als Screened-Rutherford (ScR) bezeichnete Wirkungsquerschnitt bei $\theta = 0$ endlich.

Eine genauere Betrachtung der Streuung von Elektronen erfordert die Beachtung relativistischer Effekte und der Spin-Bahn-Kopplung. Mott [112] berechnete den exakten differentiellen Wirkungsquerschnitt durch Lösen der Dirac-Gleichung, jedoch existiert keine analytische Gleichung für $d\sigma_M/d\Omega$. Dank computergestützter Verfahren lassen sich jedoch elementspezifische, elastische Mott-Wirkungsquerschnitte numerisch berechnen [113]. Betrachtet man das Verhältnis aus Mott- und Rutherford-Wirkungsquerschnitten verschiedener Elemente werden teilweise gravierende Unterschiede deutlich: während zum Beispiel bei Silizium ($Z = 14$) für $E_0 > 5$ keV beide ähnliche Ergebnisse liefern, sind Mott-Wirkungsquerschnitte bei $E_0 < 5$ keV um ein vielfaches größer [96]. Bei schwereren Elementen wie beispielsweise Germanium ($Z = 32$) verschiebt sich diese Grenze zu höheren Energien, sodass bereits unterhalb von 10 keV deutliche Abweichungen vorliegen.

Der ScR Wirkungsquerschnitt sowie die Mott-Wirkungsquerschnitte nach Czyżewski [113] spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Modellierung des BSE-Kontrastes von NP mittels Monte-Carlo-Simulationen (s. Kapitel 3.4).

Unelastische Streuung

Wie zuvor erwähnt kommt es bei der Wechselwirkung von schnellen Elektronen mit Materie nicht nur zur elastischen Streuung, sondern es finden auch zahlreiche unelastische Streuprozesse statt, bei denen die Primärelektronen einen Energiebetrag (ΔE) auf die Probe übertragen. Die wichtigsten dieser Prozesse werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Die Anregung von Gitterschwingungen im Festkörper – sogenannte Phononen – führt zu sehr geringen Energieverlusten ($\Delta E < 0,1$ eV) [109]. Plasmonen, d.h. kollektive Schwingungen der Elektronen im Valenz- bzw. Leitungsband eines Festkörpers, können ebenfalls beim Durchfliegen des Elektrogases angeregt werden. Mit ihnen geht ein typischer Energieverlust von $5 \text{ eV} \leq \Delta E \leq 50 \text{ eV}$ einher [96]. Während beide Prozesse nur zu sehr geringen Energieverlusten führen, sind die korrespondierenden Streuwinkel sehr unterschiedlich. Verglichen mit dem Bragg-Winkel elastischer Streuung von Elektronen mit einer Energie von 30 keV an einem Gitter mit einem typischen Gitterabstand von beispielsweise 3 \AA ($\Theta_{Bragg} \approx 12 \text{ mrad}$), erfolgt Phononenstreuung in wesentlich größere Streuwinkel. Plasmonenstreuung ist dagegen stark vorwärts gerichtet, weshalb die typischen Streuwinkel hier deutlich kleiner sind als der Bragg-Winkel. Ein weiterer Effekt ist die Erzeugung von Anregungszuständen im Festkörper, hervorgerufen durch die Streuung eines PE an einem inneren Hüllenelektron eines Atoms. Durch einen Energieübertrag kann ein stark gebundenes Elektron aus dem Grundzustand („0“) in einen angeregten Zustand („ m “) oder sogar ins Vakuum

(Ionisation des Atoms) übergehen. Der Energieverlust des PE ist dabei materialabhängig, was wiederum in der energiedispersiven Röntgenspektroskopie zur Materialanalyse ausgenutzt wird (s. Abschnitt 3.8). Für die Ionisation eines K-Schalen-Elektrons reicht die Spanne beispielsweise von 110 eV im Falle von Beryllium bis zu 80 keV bei Gold. Der differentielle Wirkungsquerschnitt für diese Anregung in den Zustand m kann mittels quantenmechanischen Ansatzes berechnet werden. Die Summe der Wirkungsquerschnitte aller möglichen Anregungen eines Elektrons ($0 \rightarrow m, m \neq 0$) ergibt den unelastischen differentiellen Wirkungsquerschnitt [96]:

$$\frac{d\sigma_{unel}}{d\Omega} = \sum_{m \neq 0} \frac{d\sigma_{0m}}{d\Omega} = \frac{4e^4 Z}{(4\pi\epsilon_0)^2 m_e^2 v^4} \frac{1 - \left(\frac{1}{1 + (\theta^2 + \theta_E^2)/\theta_0^2} \right)^2}{(\theta^2 + \theta_E^2)^2} \quad (3.16)$$

Von besonderer Bedeutung ist hierbei der charakteristische Winkel θ_E der unelastischen Streuung, welcher mit dem charakteristischen Winkel θ_0 der elastischen Streuung vergleichbar ist. Während θ_0 in der Größenordnung von einigen 10 mrad liegt, beträgt θ_E typischerweise nur einige 10^{-1} mrad [96]. Dies hat zur Folge, dass unelastische Streuung in viel kleinere Winkel als elastische Streuung erfolgt. Darüber hinaus zeigt das Verhältnis der elastischen und unelastischen Wirkungsquerschnitte, dass die Wahrscheinlichkeit für unelastische Streuung im Vergleich zur elastischen Streuung mit zunehmender Ordnungszahl abnimmt:

$$\frac{\sigma_{unel}}{\sigma_{el}} \simeq \frac{20}{Z} \quad (3.17)$$

Mehrfach- und Vielfachstreuung – die mittlere freie Weglänge

Einfachstreuung, wie sie bis hierher betrachtet wurde, lässt sich experimentell in der REM nicht realisieren, da die mittlere freie Weglänge bei niedrigen Elektronenenergien klein ist im Vergleich zu üblichen Probenabmessungen. Selbst sehr dünne Filme streuen deshalb die PE mehrmals. Bei mittleren Stoßzahlen < 25 spricht man von Mehrfachstreuung, bei größeren Werten von Vielfachstreuung, wobei der Übergang als fließend einzustufen ist. Beiderlei erfordern eine spezielle mathematische Behandlung, auf die hier aber nicht näher eingegangen wird. Lediglich das Konzept der zuvor erwähnten mittleren freien Weglänge Λ soll an dieser Stelle eingeführt werden [96]:

$$\Lambda = \frac{1}{N\sigma_t} \quad (3.18)$$

wobei $N = \rho N_A/A$ (N_A : Avogadro-Konstante, A : Atommasse) die Anzahl Atome pro Einheitsvolumen und $\sigma_t = \sigma_{el} + \sigma_{unel}$ der totale Wirkungsquerschnitt eines einzelnen Atoms ist. Bei einer PE-Energie E_0 von 30 keV beträgt die mittlere freie Weglänge in Kohlenstoff ($Z = 6$) 14 nm, während sie in Gold ($Z = 79$) nur 3,8 nm beträgt [96]. Reduziert man die PE-Energie auf $E_0 = 5$ keV beträgt Λ dagegen nur noch 2,3 nm (Kohlenstoff) bzw. 0,9 nm (Gold). Praktische Anwendung findet Λ u.a. bei der Berechnung von Elektronentrajektorien in Simulationen, wie z.B. bei den in dieser Arbeit verwendeten Monte-Carlo-Simulationen (s. Kapitel 3.4).

Kontinuierlicher Energieverlust

Aufgrund der zahlreichen komplexen Verlustmechanismen, wie sie in diesem Kapitel vorgestellt wurden, ist es oft praktischer einen allgemeinen Näherungsansatz für den gesamten Energieverlust von Elektronen zu verwenden. Hierfür hat sich die *Continuous-Slowing-Down Approximation* nach Bethe etabliert [114]. Unter der Annahme, dass der Energieübertrag bei einem Streuprozess stets

viel kleiner ist als die PE-Energie, kann ein kontinuierliches Abbremsen des Elektrons mit einer mittleren Verlustenergie dE_m pro Wegstrecke ds angenommen werden. Aus dieser Überlegung heraus lässt sich das Bremsvermögen S eines Materials mittels der Bethe-Formel berechnen:

$$S = \left| \frac{dE_m}{ds} \right| = \frac{2\pi e^4 N Z}{(4\pi\epsilon_0)^2 E} \int_{b_{min}}^{b_{max}} \frac{db}{b} \quad (3.19)$$

wobei b der Stoßparameter ist und N die Anzahl von Atomen bzw. NZ die Anzahl von Hüllenelektronen pro Einheitsvolumen repräsentiert. Es existieren verschiedene Lösungsansätze des Integrals der Bethe-Formel. Für nicht-relativistische Energien lässt sich folgende praktische Form herleiten [115]:

$$S = \left| \frac{dE_m}{ds} \right| = 7,8 \times 10^{10} \frac{Z\rho}{AE} \ln \left(1,166 \frac{E}{J} \right) \quad (3.20)$$

Neben der Energie E des Elektrons fließen die materialabhängigen Größen Atommasse A , Ordnungszahl Z und Materialdichte ρ sowie das mittlere Ionisationspotential J ein, welches durch eine semi-empirische Formel beschrieben werden kann [96]:

$$J = 11,5Z \quad \text{für } Z < 6 \quad \text{bzw.} \quad J = 9,76Z + 58,8Z^{-0,19} \quad \text{für } Z \geq 6 \quad (3.21)$$

Bei geringen PE-Energien muss die Bremskraft modifiziert werden, da Atomshalen mit Ionisationsenergien höher als E nicht zum Energieverlust beitragen. Eine mögliche Korrektur nach Joy und Luo [116] ersetzt das mittlere Ionisationspotential J mit einem energieabhängigen Wert J' :

$$J' = \frac{J}{1 + \frac{kJ}{E}} \quad (3.22)$$

Der Faktor k ist dabei nur schwach materialabhängig und variiert zwischen 0,77 und 0,85, sodass er, falls für ein spezifisches Material nicht bekannt, auch als konstant ($k = 0,85$) angenommen werden kann. Anwendung finden die *Continuous-Slowing-Down Approximation* sowie deren Modifikation nach Joy und Luo z.B. bei Monte-Carlo-Simulationen (s. Kapitel 3.4).

Reichweite und Eindringtiefe von Elektronen

Die Reichweite von PE entspricht der Strecke, die diese in einem Material zurücklegen können, bevor sie sämtliche Energie verloren haben. Allgemein lässt sich diese Wegstrecke als Integral des Bremsvermögens nach Gleichung 3.20 berechnen, weshalb sie auch als *Bethe Reichweite* S_B bezeichnet wird [117]:

$$S_B = \int_{E_0}^0 \frac{1}{dE_m/ds} dE \quad (3.23)$$

Dieses Integral ist jedoch nur numerisch lösbar. Ein alternativer Ansatz für die *Bethe Reichweite* wurde von Williamson et al. [118] formuliert:

$$S_B = \frac{58}{\rho} \frac{AJ^2}{Z} \left(\frac{E_0}{J} \right)^{1,7} \quad (3.24)$$

Da die Reichweite nicht direkt gemessen werden kann, sondern nur über die Transmission in dünnen Filmen, bleibt nur der Vergleich mit MC-Simulationen. Hier zeigt sich eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den nach Gleichung 3.24 berechneten Reichweiten [117].

Die Eindringtiefe R_e beschreibt dagegen, wie tief Elektronen in Richtung des Primärelektronenstrahls in eine Probe eindringen können, und unterscheidet sich damit per definitionem von der Reichweite. In Materialien von niedriger Ordnungszahl Z dominiert aber unelastische Plasmonenstreuung, sodass die PE vorwiegend nicht in große Winkel gestreut werden. In diesen Fällen entspricht die Eindringtiefe in etwa der *Bethe Reichweite* ($R_e \approx S_B$). In Materialien mit großem Z dagegen dominiert vor allem elastische Streuung in vergleichsweise große Winkel, weshalb die Eindringtiefe deutlich kleiner ist als die *Bethe Reichweite* ($R_e < S_B$).

Zur Abschätzung der Eindringtiefe wird ein simples Potenzgesetz verwendet [96]:

$$R_e = a \cdot E_0^n \quad (3.25)$$

wobei der Exponent n zwischen 1,3 und 1,7 variieren kann und a eine materialspezifische Konstante ist. Die Bestimmung dieser Parameter erfolgt ausnahmslos durch Extrapolation von Transmissionsmessungen in Abhängigkeit von der Probendicke oder PE-Energie.

3.3.3 Abbildung mit Sekundär- und Rückstreuelektronen

Abbildung 3.7 zeigt zusammenfassend die in der REM relevanten Signale und welchem Bereich der Probe diese entspringen, dem sogenannten Wechselwirkungsvolumen. Die Dimension dieser *Anregungsbirne* ist abhängig von der PE-Energie E_0 sowie der Ordnungszahl des Probenmaterials Z . Im obersten Teil werden vor allem SE generiert, die zur Oberflächenabbildung genutzt werden. Sie entstehen in erster Linie als Folge unelastischer Streuprozesse der Primärelektronen an Elektronen im Valenz- oder Leitungsband, weshalb sie typischerweise nur Energien bis 50 eV aufweisen. BSE sind Primärelektronen, die durch elastische Streuprozesse an die Oberfläche zurück gelangen und in den oberen Halbraum über der Probe austreten. Per definitionem zählen alle austretenden Elektronen mit einer Energie über 50 eV zu den BSE, wobei ein Großteil Energien nahe der PE-Energie E_0 aufweist. Aufgrund ihrer höheren Energie können sie auch aus tieferen Regionen an die Oberfläche zurückkehren und tragen vor allem materialspezifische Informationen. Im gesamten Wechselwirkungsvolumen dagegen entsteht Röntgenstrahlung, von der ein Teil (die charakteristische Röntgenstrahlung) zur Elementanalyse genutzt werden kann. Im Folgenden wird genauer auf Sekundär- und Rückstreuelektronen eingegangen. Die Entstehung und Nutzung der Röntgenstrahlung wird in Kapitel 3.8 eingehender behandelt.

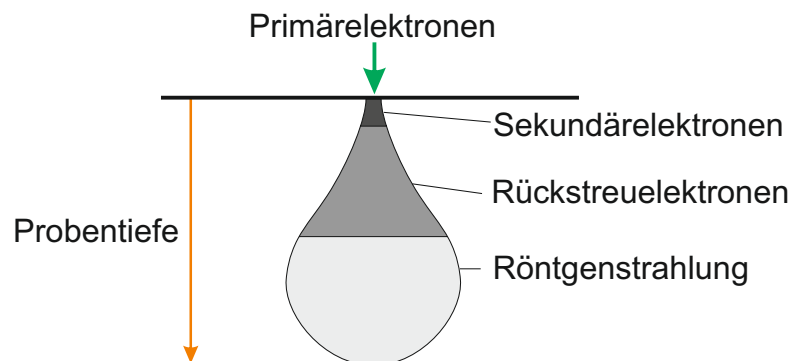


Abbildung 3.7. Skizze des Wechselwirkungsvolumens von Primärelektronen mit den Probenregionen, in denen SE, BSE und Röntgenstrahlen entstehen.

Sekundärelektronen

Aufgrund ihrer geringen Energie können Sekundärelektronen nur aus oberflächennahen Schichten austreten, sodass sie vorwiegend zur Oberflächenbetrachtung geeignet sind. Ferner ist der Austrittsort auf die unmittelbare Umgebung des Primärstrahls begrenzt. Jedoch können auch Rückstreuungselektronen SE auslösen, welche aber, bedingt durch die Diffusion der BSE im Material, aus einem viel größeren Bereich stammen. Diese SE werden als SE_2 bezeichnet und steuern zum Untergrundsignal von SE-Aufnahmen bei, während die von PE erzeugten SE die Hauptinformationen tragen und daher als SE_1 bezeichnet werden [119]. In Abbildung 3.8 ist dieser Zusammenhang grafisch dargestellt. Zur Vollständigkeit seien noch die SE_3 und SE_4 erwähnt. SE_3 werden von BSE beim Auftreffen auf Teile der Probenkammer wie den Polschuh herausgeschlagen, SE_4 von Primärelektronen bei der Kollision mit Blenden innerhalb der Elektronensäule. Die beiden letztgenannten Quellen spielen jedoch nur eine untergeordnete Rolle.

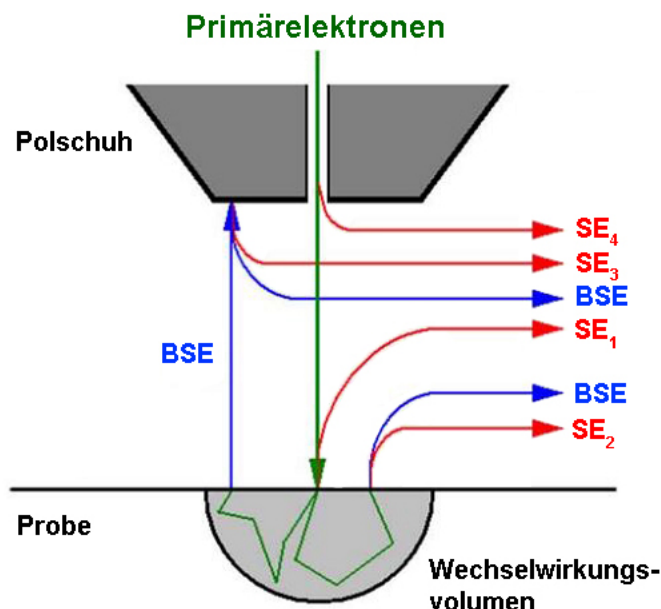


Abbildung 3.8. Illustration der vier verschiedenen SE-Quellen im Rasterelektronenmikroskop. Grafik frei nach [119].

Die Sekundärelektronenausbeute ist definiert als das Verhältnis der emittierten SE zu der Zahl auftreffender PE (δ_{PE} für SE_1), bzw. das Verhältnis ausgelöster SE zur Anzahl austretender BSE (δ_{BSE} für SE_2). Bildet man die Summe aus δ_{PE} und δ_{BSE} , erhält man die gesamte Sekundärelektronenausbeute δ [96]. Sie weist im Bereich leichter Elemente (bis $Z \approx 15$) eine geringe Materialabhängigkeit auf: mit abnehmender Ordnungszahl nimmt auch δ ab. Deshalb kann bei Proben solchen Materials eine Bedampfung mit beispielsweise Gold hilfreich sein um die Ausbeute zu erhöhen. Ferner nimmt δ im für REM üblichen PE-Energiebereich zwischen 1–30 keV mit zunehmender E_0 ab, wobei experimentell eine Abhängigkeit $\delta \propto E_0^{-0,8}$ festgestellt wurde [96]. Die aber für SE-Abbildungen fundamentale Eigenschaft der SE-Ausbeute ist deren Abhängigkeit von der Oberflächenneigung [119]:

$$\delta(\phi) = \delta_0 \frac{1}{\cos \phi} \quad (3.26)$$

mit dem Einfallswinkel ϕ des Primärstrahls relativ zur Flächennormale (s. Abbildung 3.9a) und der SE-Ausbeute bei senkrechtem Einfall der PE δ_0 . Je größer ϕ ist, d.h. je stärker die bestrahlte Fläche

zum Primärstrahl geneigt ist, desto größer wird δ . Ursächlich dafür ist zum einen die zunehmende Weglänge der PE im Bereich der SE-Austrittstiefe, zum anderen die verkürzte Weglänge der BSE an die Oberfläche. Beides führt zu einer erhöhten SE_1 - und SE_2 -Erzeugung. Der Sachverhalt wird in Abbildung 3.9b,c schematisch veranschaulicht und ist entscheidend für den Topografiekontrast von SE-Aufnahmen. Durch die $1/\cos\phi$ Abhängigkeit ähnelt das Verhalten dem Lambertschen Gesetz für Reflexion von sichtbarem Licht, was SE-Aufnahmen dem Betrachter wie gewöhnliche Fotografien erscheinen lässt und einen plastischen Eindruck erzeugt.

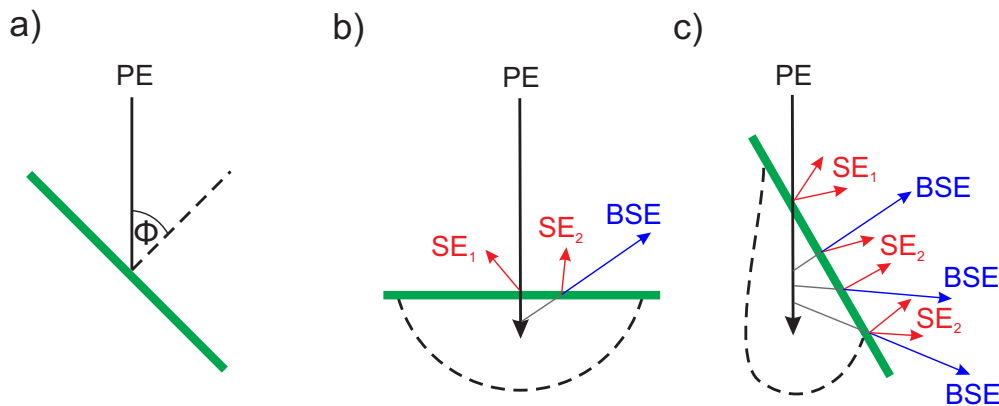


Abbildung 3.9. Schematische Darstellung der Einfallswinkelabhängigkeit der SE-Ausbeute δ . a) Definition des Einfallswinkels ϕ . b) Wechselwirkungsvolumen (gestrichelte schwarze Linie) und δ (illustriert durch rote Pfeile) bei senkrechtem Einfall im Vergleich zum c) streifenden Einfall. Grafik frei nach [119].

Dieser kann nochmals verstärkt werden durch leichte Abschattungseffekte, die aufgrund der Orientierung eines Everhart-Thornley-Detektors (ETD) auftreten können. Der ET-Detektor ist der Standard-Detektor für SE-Aufnahmen und seitlich zur Probe angeordnet. Er besteht aus einem Szintillator mit angeschlossenem Photomultiplier. Mittels eines Ansauggitters, an das eine Spannung von ca. +200 V angelegt wird, werden die emittierten SE von der Probe abgesaugt und auf den Szintillator gelenkt. Da der Detektor seitlich zur Probe positioniert ist, kann es trotz Absaugspannung zur unvollständigen Detektion und damit zu Abschattungen kommen, wenn die SE auf ihrem Weg von der Probe zum Detektor auf ein Hindernis stoßen. Abbildung 3.10 veranschaulicht die Funktionsweise eines ETD und die Entstehung des Topografiekontrastes anhand eines kugelförmigen Partikels. Am Rand des Partikels treten mehr Sekundärelektronen aus als mittig (s. Kanteneffekt weiter unten) und auf der dem Detektor abgewandten Seite werden die SE weniger stark vom elektrischen Feld angezogen.

Schließlich soll noch kurz der bei SE-Aufnahmen auftretende Kanteneffekt erwähnt werden, der zu einer stark erhöhten SE-Ausbeute und unter Umständen zu störenden Überstrahlungen im Bild führt. Dieser Effekt tritt bei durchstrahlbaren Objekten und an Objektkanten auf, da hier das theoretische Wechselwirkungsvolumen nicht vollständig im Material liegt. Infolgedessen können sowohl mehr BSE als auch transmittierte Elektronen (TE) die Probe verlassen, welche dann zusätzliche SE auslösen (s. Abbildung 3.11). Durch den starken streifenden Einfall ist δ nach Gleichung 3.26 zusätzlich erhöht.

Rückstreuelektronen

BSE sind an die Oberfläche elastisch zurückgestreute PE mit Energien über 50 eV. Wie bereits in Abbildungen 3.7 und 3.8 angedeutet wurde, ist der Austrittsort nicht auf den Auftreffpunkt des

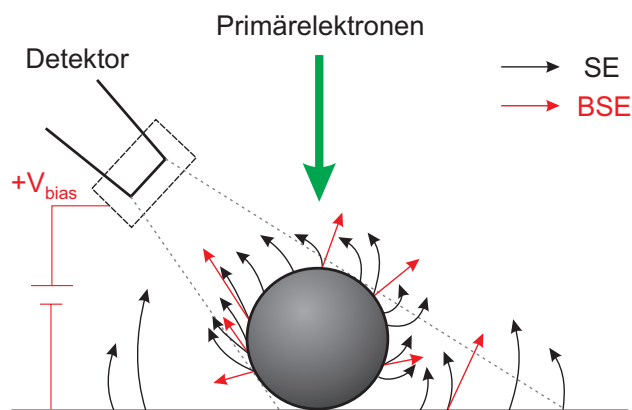


Abbildung 3.10. Illustration der Funktionsweise eines Everhardt-Thornley-Detektors und der Entstehung von Topografiekontrast. Grafik frei nach [119].

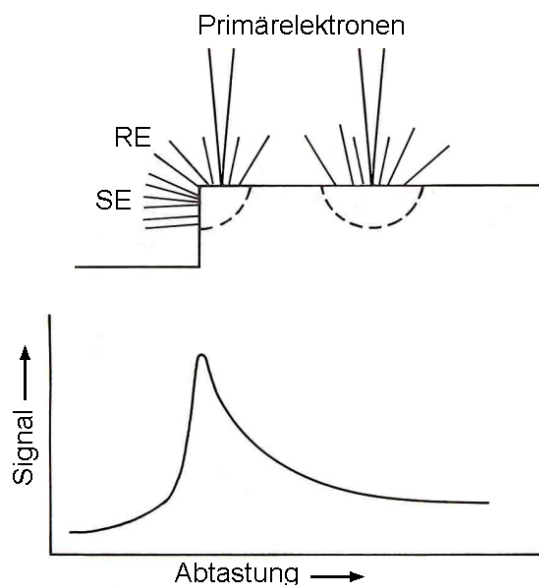


Abbildung 3.11. Schematische Darstellung des Kanteneffekts. Die verstärkte SE-Ausbeute am Rand des hervorstehenden Objektes sorgt für eine starke Signalüberhöhung an dieser Stelle im Vergleich zur flachen Oberfläche davor und dahinter. Grafik aus [119].

Primärstrahls beschränkt, sondern kann bedingt durch Elektronendiffusion davon auch deutlich entfernt liegen, was das laterale Auflösungsvermögen bei Rückstreuabbildungen reduziert.

Die BSE-Ausbeute η , auch Rückstreckoeffizient genannt, ist das Verhältnis aus austretenden BSE zu auftreffenden PE. Abbildung 3.12a zeigt experimentell bestimmte Werte von η in Abhängigkeit von der Ordnungszahl bei einer PE-Energie von $E_0 = 25,2 \text{ keV}$ und verschiedenen Einfallswinkeln (von 0° – senkrechter Einfall – bis 80° – streifender Einfall) [96]. Der Rückstreckoeffizient weist dabei eine ausgeprägte Ordnungszahlabhängigkeit auf, was es erlaubt mit BSE-Aufnahmen Materialkontrast zu erzeugen: je größer Z , desto mehr Elektronen werden zurückgestreut. Ferner ist η stark abhängig von ϕ , da große Einfallswinkel der PE ein Austreten als BSE begünstigen, wie im vorherigen Abschnitt zu Sekundärelektronen bereits beschrieben wurde. Aus zweierlei Gründen ist aber für optimalen Materialkontrast senkrechter Einfall ($\phi = 0^\circ$) nötig: zum einen ist der Gradient von $\eta(Z)$ bei senkrechtem Einfall am steilsten, was die Differenzierung zwischen Elementen ähnlicher Ordnungszahl ermöglicht (vgl. Abbildung 3.12a). Zum anderen erhöht sich bei großen

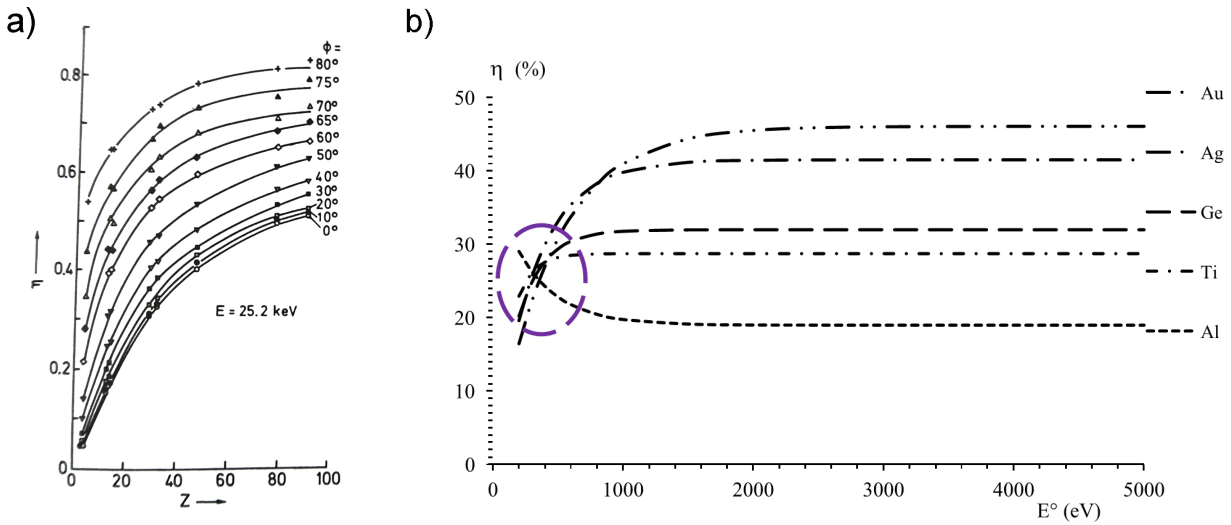


Abbildung 3.12. a) Z und ϕ Abhängigkeit von η bei $E_0 = 25,2 \text{ keV}$ [96]. b) E_0 Abhängigkeit von η für einige ausgewählte Elemente [97].

Einfallswinkeln das Wechselwirkungsvolumen lateral und damit verschlechtert sich die Auflösung in BSE-Abbildungen. Darüber hinaus ist eine polierte Oberfläche ratsam, um störende Topografieeffekte im Bild zu unterbinden. Schließlich gilt die BSE-Ausbeute für PE-Energien ab 2 keV als annähernd energieunabhängig. Für $E_0 < 2 \text{ keV}$ wird beobachtet, dass für kleine Ordnungszahlen ($Z < 20$) η mit abnehmender Energie zunimmt und für große Z (> 26) abnimmt. Cazaux [97] hat anhand von experimentellen Daten empirische Formeln für das Verhalten von η unterhalb von 2 keV aufgestellt. Abbildung 3.12b zeigt beispielhaft den Verlauf berechneter Werte für einige ausgewählte Elemente.

Es existieren keine exakten Theorien zur Beschreibung des Rückstreuungskoeffizienten, was auf die Komplexität der Elektronendiffusion zurückzuführen ist. Für massive Proben existieren zumindest einige empirische Formeln, welche die experimentellen Ergebnisse akzeptabel wiedergeben. Arnal et al. [120] beschreiben die Z - und ϕ -Abhängigkeit beispielsweise durch:

$$\eta(Z, \phi) = (1 + \cos \phi)^{-9/\sqrt{Z}} \quad (3.27)$$

was trotz der Einfachheit der Formel für homogene massive Proben und $E_0 > 5 \text{ keV}$ eine gute Approximation von Messergebnissen ist.

Abbildung 3.13 zeigt das Polardiagramm der Winkelverteilung von $d\eta/d\Omega$, also dem Rückstreuungskoeffizienten pro Raumwinkel, bei verschiedenen Einfallswinkeln. Bei senkrechtem Einfall ($\phi = 0^\circ$, Abbildung 3.13a) kann sie durch das Lambert'sche Gesetz approximiert werden [96]:

$$\frac{d\eta}{d\Omega} = \frac{\eta}{\pi} \cos \zeta \quad (3.28)$$

wobei ζ der Austrittswinkel der BSE relativ zur Flächennormale ist. Die theoretisch kreisrunde Form der Winkelverteilung ist jedoch in der Praxis deutlich abgeflacht oder gestreckt. Bei schrägem Einfall, beispielsweise $\phi = 60^\circ$ (Abbildung 3.13b), verschiebt sich das Maximum von $d\eta/d\Omega$ zu flacheren Winkeln und die Verteilung nimmt eine Form an, welche den Anschein von Reflexion der PE erweckt. Bei $\phi = 80^\circ$ (Abbildung 3.13c) verstärkt sich der Effekt nochmals deutlich. Tatsächlich erfahren die Elektronen bei schrägem Einfall in Richtung des Primärstrahls aber nur deutlich weniger Streuprozesse aufgrund der geringeren Austrittstiefe und treten daher unter verhältnismäßig kleineren Winkeln aus. In dem der Primärstrahl zugewandten Seite folgt die Verteilung dagegen

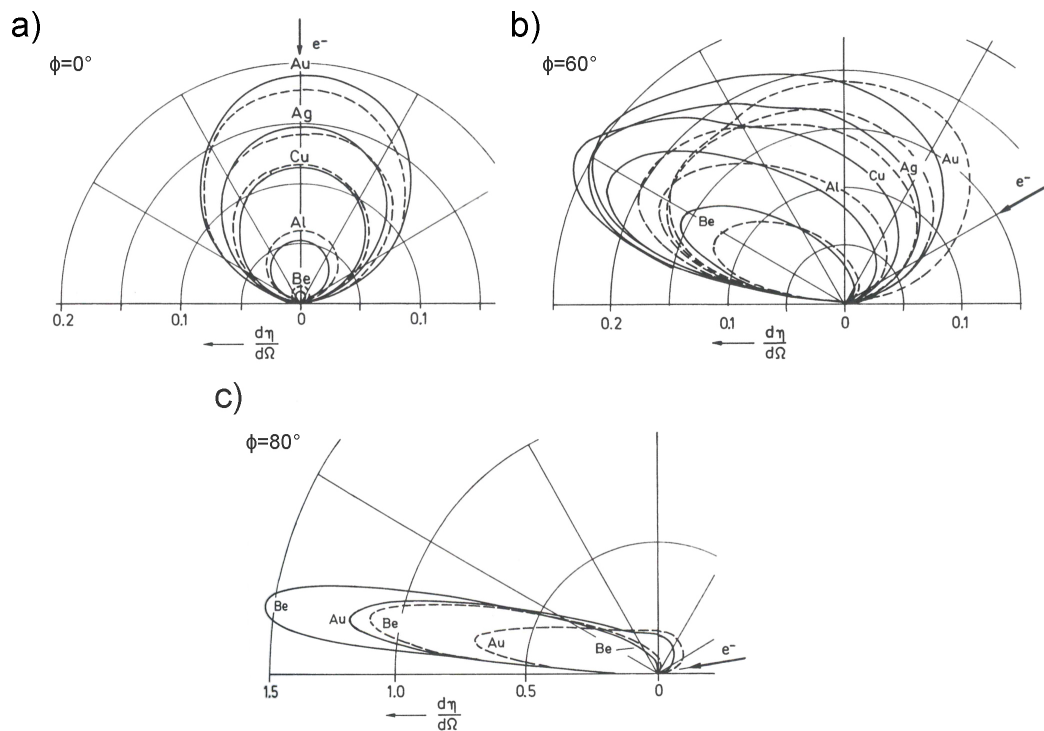


Abbildung 3.13. Winkelverteilung des Rückstreukoeffizienten pro Raumwinkel einiger Elemente bei a) senkrechtem Einfall ($\phi = 0^\circ$), b) schrägem Einfall ($\phi = 60^\circ$) und c) streifendem Einfall ($\phi = 80^\circ$) [96]. Durchgezogene Linien repräsentieren $E_0 = 100 \text{ keV}$, gestrichelte Linien $E_0 = 9,3 \text{ keV}$.

weiterhin dem Lambertschen Gesetz, da die in diese Richtung austretenden Elektronen wie bei senkrechtem Einfall durch das Material diffundiert sind.

BSE können wie SE mit einem ETD detektiert werden. Hierzu wird die Spannung am Kollektor umgepolt, sodass nur noch schnelle BSE das Gitter passieren können. Jedoch ist aufgrund der Detektorgeometrie der abgedeckte Raumwinkel sehr klein, was zu einem eher schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis führt. Ferner ist das Bild bei vorhandener Topografie von starker Schattenbildung geprägt. Besser geeignet sind Halbleiterdetektoren, die unterhalb des Polschuhs angebracht werden. Durch die deutlich größere Detektorfläche und den geringeren Abstand zur Probe kann ein viel größerer Raumwinkel erfasst werden und man erhält ein viel besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Eine detaillierte Behandlung der Funktionsweise von Halbleiterdetektoren erfolgt in Kapitel 3.3.4.

Sichtbarkeit von Objekten in der REM – Auflösungsvermögen und Kontrast

Um die Sichtbarkeit von Objekten vor einem gleichmäßigen Hintergrund zu beschreiben, wird im Allgemeinen auf den Kontrast C zurückgegriffen:

$$C = \frac{n - n_0}{n_0} \quad (3.29)$$

wobei n die Intensität (respektive die Anzahl Elektronen) des Objekts und n_0 die des Hintergrundsignals ist. In seiner vielzitierten Arbeit zur Qualität von Fernsehbildern aus den 1940er Jahren [121] definierte Rose die Sichtbarkeit eines Objekts über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis

(signal-to-noise ratio, SNR):

$$SNR = \frac{n - n_0}{\sqrt{n}} \quad (3.30)$$

wobei das Rauschen durch \sqrt{n} unter Annahme einer Poisson-Verteilung beschrieben und sowohl für das Objekt als auch den Hintergrund als etwa gleich stark angenommen wird. Er konstatierte ferner, dass das Signal, also die Differenz der Intensitäten von Objekt und Hintergrund, das Rauschen um den Faktor 5 übersteigen muss, um vom menschlichen Auge erkannt zu werden: $SNR > 5$. Aus dieser *Rose Kriterium* genannten Forderung lässt sich für die REM ein minimaler Probenstrom $I_{P,min}$ ableiten, welcher für die Abbildung eines Objektes mit einem bestimmten Kontrast notwendig ist. Der Probenstrom setzt sich wie folgt zusammen:

$$I_P = \frac{n \cdot e}{q \cdot t} \quad (3.31)$$

wobei n die Anzahl der detektierten Elektronen, e die Elementarladung, t die Beleuchtungszeit pro Pixel sind. Mit dem Faktor q , der das Produkt aus Detektoreffizienz und Rückstreu- bzw. Sekundärelektroneneffizienz ist, wird berücksichtigt, dass nicht jedes SE bzw. BSE vom Detektor erfasst wird (typischerweise zwischen 0,1 und 0,2).

Aus Gleichung 3.29 und 3.30 folgt zusammen mit dem *Rose Kriterium*, dass das Produkt aus Kontrast und Rauschen größer als fünf sein muss: $C \cdot \sqrt{n} > 5$. Setzt man hier Gleichung 3.31 ein und stellt nach I_P um, erhält man den minimalen Probenstrom $I_{P,min}$:

$$I_{P,min} > \frac{1}{C^2} \frac{25e}{qt} \quad (3.32)$$

Aus diesem Zusammenhang wird deutlich, dass mit dem Kontrast auch das Auflösungsvermögen in der REM korreliert ist, denn um diesen für C notwendigen minimalen Strahlstrom zu erhalten, erfordert es einen gewissen minimalen Strahldurchmesser, welcher wiederum das laterale Auflösungsvermögen limitiert. Der Strahldurchmesser und damit die Auflösung ist noch von Linsenfehlern und Eigenschaften der Elektronenquelle abhängig, auf die hier aber nicht näher eingegangen wird [96].

Schließlich ist insbesondere das Auflösungsvermögen in BSE-Abbildung abhängig vom Wechselwirkungsvolumen. Je größer dieses ist, desto größer ist der Bereich um den Elektronenstrahl, aus dem BSE austreten und detektiert werden können. Größe und Form der Anregungsbirne sind grundsätzlich abhängig von der PE-Energie, aber auch vom Probenmaterial. Durch die Wahl kleiner Elektronenenergien kann also die Auflösung in BSE-Aufnahmen verbessert werden.

Vor- und Nachteile niedriger Elektronenenergien

Es gibt verschiedene gute Gründe, auf niedrige Elektronenenergien zu setzen. Zum einen wird Verlagerungsschädigung minimiert, was empfindlichen Proben, insbesondere biologischer Natur, entgegen kommt. In diesem Kontext fällt auch besonders der hohe Kontrast bei Materialien mit geringer Ordnungszahl Z ins Gewicht, resultierend aus der $1/E^2$ Abhängigkeit der Wirkungsquerschnitte (vgl. Gleichung 3.15 und 3.16). Zum anderen ist das Wechselwirkungsvolumen kleiner, was zu einer besseren Auflösung führt und verhindert, dass kleine Strukturen einfach durchstrahlt werden.

Niedrige Energien und das damit verbundene geringe Wechselwirkungsvolumen können die Gesamtsituation bei der BSE-Kontrastformation aber auch deutlich verkomplizieren, beispielsweise wenn wie in dieser Arbeit komplexe Strukturen betrachtet werden. Dies wird in Abbildung 3.14

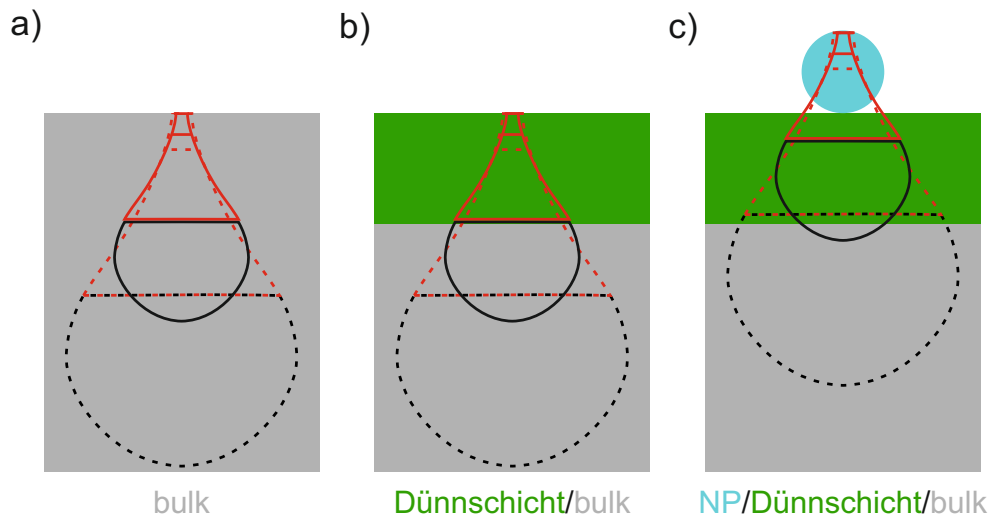


Abbildung 3.14. Schematische Darstellung des Wechselwirkungsvolumens bei (a) einem massiven Substrat (grau), (b) einem mit einer dünnen ITO-Schicht (grün) beschichteten massiven Substrat und (c) einem NP (blau), welches auf einem mit einer dünnen ITO-Schicht beschichteten massiven Substrat platziert ist. Das in durchgezogenen Linien dargestellte Wechselwirkungsvolumen repräsentiert eine deutlich kleinere PE-Energie verglichen mit dem gestrichelt dargestellten Wechselwirkungsvolumen. Horizontale Linien grenzen Bereiche ab, in denen SE (oberster Bereich), BSE (oberster und mittlerer Bereich, rot hervorgehoben) und Röntgenstrahlung (gesamtes Wechselwirkungsvolumen) entstehen.

schematisch veranschaulicht, wo zwei Wechselwirkungsvolumina von Elektronen kleinerer Energie E_1 (durchgezogene Linien) und größerer Energie E_2 (gestrichelte Linien) in unterschiedlichen Proben verglichen werden. In einer homogenen massiven Probe ist die Situation einfach. Unabhängig von der Energie ist das gesamte Wechselwirkungsvolumen im selben Material (Abbildung 3.14a). Befindet sich jedoch auf einer massiven Probe eine dünne Schicht eines anderen Materials mit anderer Ordnungszahl, so reicht der BSE-Teil der Anregungsbirne (rot hervorgehoben) bei E_2 deutlich in das Substratmaterial hinein (Abbildung 3.14b). Das erhaltene Signal wird eine Kombination aus beiden Materialien darstellen, was zu Problemen führen kann, beispielsweise wenn das Substrat eine deutlich höhere Ordnungszahl und Rückstreuoeffizienten aufweist als die Dünnschicht. Reduziert man die Energie jedoch, sodass BSE nur aus der Dünnschicht austreten können (E_1), wird dieses Problem vermieden. Die Situation wird nochmals komplexer, wenn auf die Dünnschicht ein Nanopartikel platziert wird (Abbildung 3.14c). Mit der großen Energie E_2 wird es durchstrahlt, sodass nur ein kleiner Teil des BSE erzeugenden Wechselwirkungsvolumens sich im Partikel befindet und die Rückstreuung von der Dünnschicht dominiert wird. Selbst bei E_1 mischt sich das BSE-Signal des Nanopartikels noch mit in der Dünnschicht erzeugten BSE, sodass es einer weiteren Reduktion der PE-Energie bedarf, um das Signal allein auf das NP zu beschränken. Etwaige Topografieeffekte wurden bei diesen Überlegungen vernachlässigt.

Niedrige PE-Energien haben aber auch Nachteile, die nicht vermieden werden können. Da die chromatische Aberration proportional zu $\Delta E_0/E_0$ ist (mit der Halbwertsbreite der Energieverteilung der PE ΔE_0), nimmt sie bei niedrigen Elektronenenergien deutlich zu. Und auch die Kontamination von Proben nimmt proportional zu $1/E_0$ zu. Darüber hinaus fallen Halbleiterdetektoren bei sehr niedrigen Energien als mögliche Detektoren weg, da Elektronen mit Energien unterhalb von 2–3 keV nicht mehr effektiv die Schutzschicht des Halbleiters passieren können. Das ist ferner auch der Energiebereich, in dem Rückstreuoeffizienten unorthodoxes Verhalten an den Tag legen: unterhalb von 2 keV nimmt η für kleine Z plötzlich zu, während es für große Z abnimmt (vgl. Abbildung 3.12),

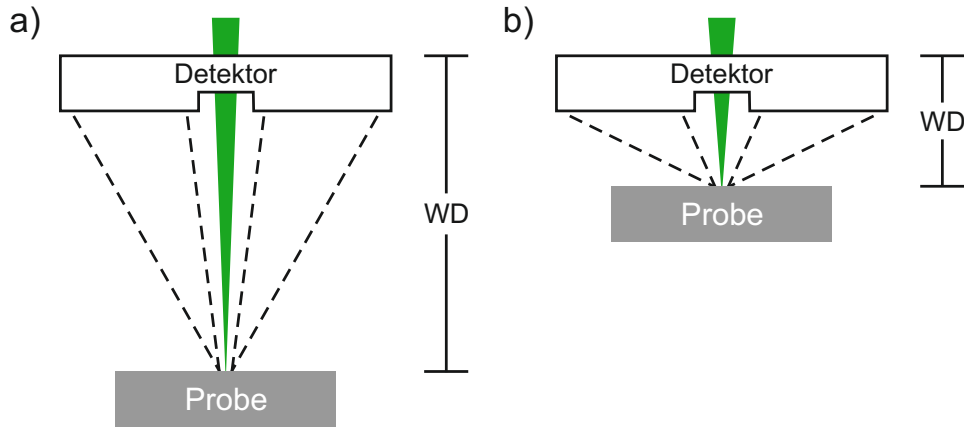


Abbildung 3.15. Schematische Darstellung der Arbeitsabstandabhängigkeit des detektierten Winkelbereiches bei einem ringförmigen, zentrisch unter dem Polschuh platzierten Halbleiterdetektor. (a) Bei großer WD werden stark gestreute BSE detektiert. (b) Bei kleiner WD gelangen schwächer gestreute BSE in den Detektor.

was das Konzept des Materialkontrastes gänzlich auf den Kopf stellt.

3.3.4 Halbleiterdetektoren

Halbleiterdetektoren werden im Elektronenmikroskop zur Detektion von BSE verwendet. Sie sind meist ringförmig und werden mittig unter dem Polschuh angebracht, sodass durch Variation des Arbeitsabstandes zwischen Polschuh und Probe der detektierte Winkelbereich verändert werden kann. Die Abhängigkeit des Detektionswinkels vom Arbeitsabstand (engl. working distance, WD) wird in Abbildung 3.15 veranschaulicht.

Ein BSE mit der Energie E_{BSE} erzeugt in Halbleitern E_{BSE}/\bar{E}_i Elektron-Loch-Paare, wobei \bar{E}_i die mittlere Anregungsenergie eines solchen Paares ist [96]. In Silizium beispielsweise beträgt $\bar{E}_i = 3,6 \text{ eV}$. Diese Elektron-Loch-Paare können in einem Detektor als interne Verstärkung des eintreffenden Signals genutzt werden, wenn man die Ladungsträger trennen kann bevor sie rekombinieren. Hierzu eignet sich die Verarmungszone einer Schottky-Diode oder eines p-n-Übergangs mit angelegter Spannung in Sperrrichtung. Die in der Verarmungszone erzeugten freien Ladungsträger werden vom elektrischen Feld abgesaugt und erzeugen einen Stromimpuls, der gemessen werden kann. Die jeweiligen Vor- und Nachteile von Schottky-Diode und p-n-Übergang werden weiter unten diskutiert.

Die beiden für Halbleiterdetektoren wichtigsten Kenngrößen sind die Verstärkung G (engl. gain) und die Breite der Verarmungszone w , welche indirekt die Effizienz ϵ_c beeinflusst, mit der die generierten freien Ladungsträger gesammelt werden (engl. charge-collection efficiency). w kann durch zweifache Integration der Poisson-Gleichung berechnet werden [96]:

$$w = \sqrt{\frac{2\epsilon_r\epsilon_0}{eN_B}(\Phi_d - U)} \quad (3.33)$$

wobei N_B für eine Schottky-Diode die Donatorkonzentration N_D^+ ist, während bei einem p-n-Übergang $1/N_B = 1/N_D^+ + 1/N_A^-$ gilt (N_A^- entspricht der Akzeptorenkonzentration). Φ_d ist die interne Diffusionsspannung des jeweiligen Übergangs und U ist die angelegte Spannung an die Diode. Bei Dotierungskonzentrationen von unter 10^{14} und einer angelegten Sperrspannung von $U = -10 \text{ V}$

können so Breiten über $10\ \mu\text{m}$ erzeugt werden, was in etwa der Eindringtiefe von $30\ \text{keV}$ Elektronen in Silizium entspricht.

Die Verstärkung G ergibt sich aus dem erzeugten Sammelstrom I_{cc} [96]:

$$I_{cc} = I_P \cdot G \cdot \epsilon_c = I_P (1 - \eta_c) \left(\frac{E_{BSE} - E_{th}}{\bar{E}_i} \right) \epsilon_c \quad (3.34)$$

wobei I_P den Strom einfallender Elektronen bezeichnet und η_c der Rückstreuoeffizient des Detektors ist. Durch die Rückstreuung aus dem Detektor werden weniger Elektron-Loch-Paare generiert, was zu einer Reduktion der Verstärkung führt. In Silizium beträgt diese in etwa 10% . E_{th} gibt den Energieverlust von eintreffenden Elektronen beim Passieren der metallischen Schutzschicht an, markiert also einen Schwellenwert für die Detektion. Für die quantitative Auswertung des BSE-Kontrastes und den Vergleich mit Monte-Carlo-Simulationen ist es wichtig zu wissen, dass der Sammelstrom im Detektor und damit die Signalstärke nicht allein von der Anzahl der BSE (I_P), sondern auch von deren Energie E_{BSE} abhängig ist.

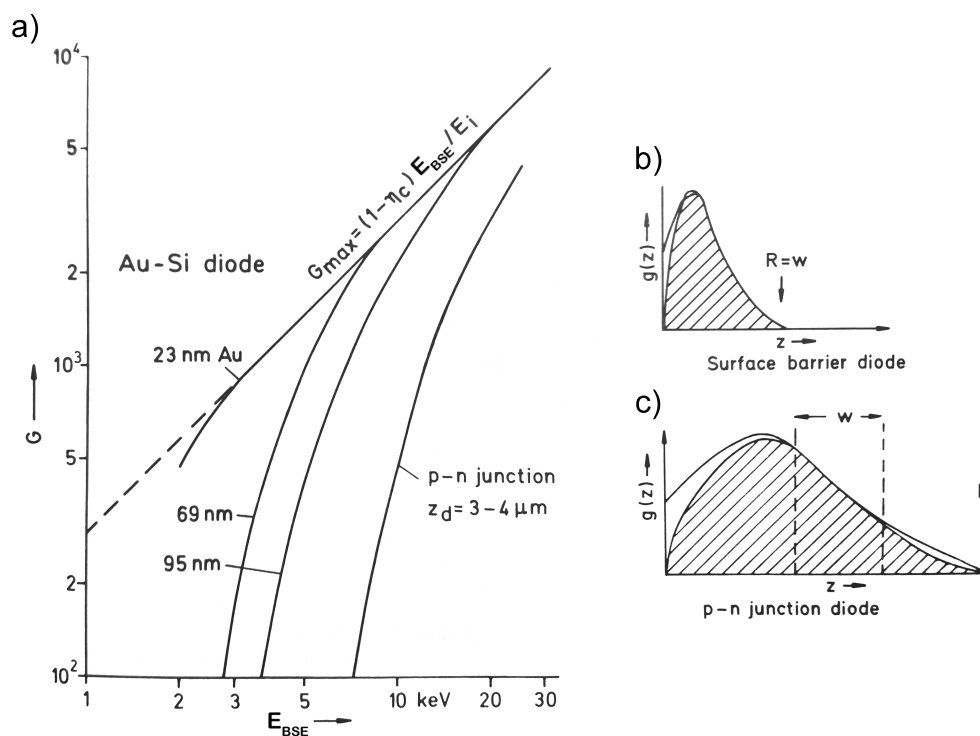


Abbildung 3.16. (a) Gemessene Verstärkung G in Abhängigkeit von der Elektronenenergie E_{BSE} einer Au-Si Schottky-Diode mit unterschiedlichen Dicken der Goldschicht, sowie eines p-n Überganges, der sich $3 - 4\ \mu\text{m}$ unterhalb der Oberfläche befindet [96]. (b,c) Qualitativer Verlauf der Tiefenverteilung $g(z)$ von erzeugten Elektron-Loch-Paaren bei (b) einer Schottky-Diode und (c) einem p-n Übergang [96]. Die schraffierten Flächen geben den detektierten Bruchteil wieder, der zum Sammelstrom I_{cc} beiträgt.

In Abbildung 3.16a wird der experimentell bestimmte Verlauf der Verstärkung einiger Detektoren als Funktion der Energie der auftreffenden Elektronen gezeigt. Hier wird einer der Vorteile von Schottky-Dioden deutlich. Je dünner die Schutzschicht des Halbleiters ist, desto kleiner ist E_{th} und desto empfindlicher ist der Detektor im Bereich niedriger Energien. Der p-n-Übergang dagegen befindet sich einige μm unterhalb der Oberfläche, weshalb er mit einem vergleichsweise hohen Schwellenwert verbunden ist. Im Gegenzug ist er deshalb deutlich unempfindlicher auf Beschädigungen.

Der zweite Vorteil der Schottky-Diode wird in Abbildungen 3.16b,c veranschaulicht, wo qualitative

Verläufe der Tiefenverteilung $g(z)$ von generierten Elektron-Loch Paaren in beiden Dioden gezeigt werden. Die schraffierten Flächen geben den detektierten Bruchteil wieder, der zum Sammelstrom I_{cc} im jeweiligen Detektor beiträgt. Solange die Eindringtiefe der Elektronen $R_e(E)$ kleiner als die Verarmungszone w ist, liegt $g(z)$ komplett innerhalb der Verarmungszone der Schottky-Diode (Abbildung 3.16b). Damit liegt ihre Effizienz ϵ_c für alle Energien bei nahezu Eins ($R(E) < w$ vorausgesetzt). Im Gegensatz dazu liegt die Verarmungszone beim p-n-Übergang tief im Material und umfasst deshalb, je nach Energie der eintreffenden Elektronen, nicht das Maximum von $g(z)$ (Abbildung 3.16c). In Folge dessen ist die Effizienz innerhalb von w zwar auch nahezu Eins, nimmt aber außerhalb mit zunehmendem Abstand von der Verarmungszone exponentiell ab, weshalb sich die Flächen in Abbildung 3.16c nicht mehr gänzlich decken.

3.4 Monte-Carlo-Simulation

MC-Simulationen ermöglichen es, Elektronentrajektorien stochastisch zu berechnen. Grundlage stellt das Gesetz der großen Zahlen dar, welches vereinfacht besagt, dass die relative Häufigkeit eines Zufallsergebnisses gegen die theoretische Wahrscheinlichkeit konvergiert. Für die Elektronenmikroskopie bedeutet dies, dass der statistische Mittelwert einer mittels MC-Simulationen berechneten Größe (beispielsweise des Rückstreuoeffizienten η) aufgrund der großen Anzahl an zufällig berechneten Elektronentrajektorien (Größenordnung $10^3 - 10^6$) gut mit Messungen übereinstimmt, auch wenn einzelne Elektronen den berechneten Pfaden nicht exakt folgen [96]. Die Unsicherheit von MC-Simulationen kann anhand der Anzahl berechneter Elektronentrajektorien N_e abgeschätzt werden. Da es sich um voneinander unabhängige, poissonverteilte Zufallsexperimente handelt, ist die Unsicherheit gegeben durch $\sqrt{N_e}/N_e$. Bei 10.000 simulierten Elektronen beträgt die Unsicherheit des Ergebnisses folglich 1.0 %. Erhöht man N_e auf 1.000.000, so reduziert sie sich auf gute 0,1 %, was jedoch auf Kosten einer erhöhten Dauer der Simulationen geht. Dank immer leistungsfähigerer Prozessoren benötigt man heutzutage für MC-Berechnungen, die vor einigen Jahren noch Wochen gedauert haben, aber nur noch wenige Tage oder gar Stunden.

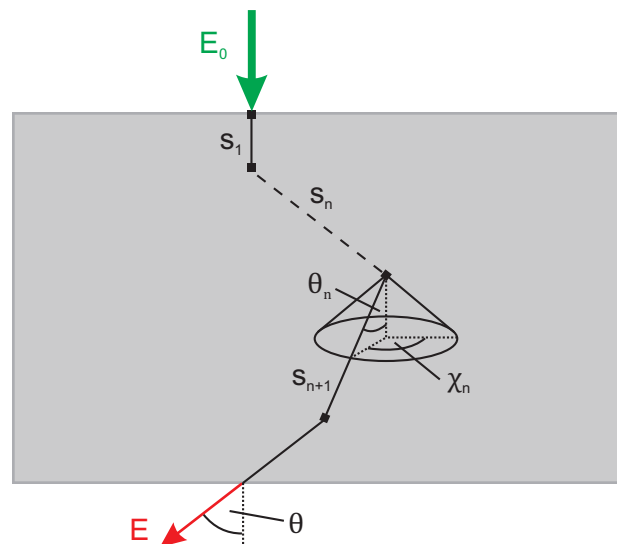


Abbildung 3.17. Schematische Darstellung des mit MC bestimmten Pfades eines durch eine dünne Schicht transmittierten Elektrons.

Der Schlüssel zu Monte-Carlo ist die Verwendung von Zufallszahlen. In Abbildung 3.17 wird ein möglicher Pfad eines Elektrons durch eine dünne Schicht dargestellt. Nach dem Eintritt ins Materi-

al mit der Energie E_0 wird basierend auf der mittleren freien Weglänge Λ (s. Gleichung 3.18) sowie einer Zufallszahl Q im Intervall $(0,1)$ das vom Elektron bis zum nächsten Streuprozess zurückgelegte Wegstück der Länge s_n berechnet. Um die Richtungsänderung bei den Streuprozessen zu beschreiben, werden auf ähnliche Weise die Streuwinkel θ_n sowie der Azimutalwinkel χ_n bestimmt. Bei θ_n spielt neben der Zufallszahl Q auch der verwendete differentielle Wirkungsquerschnitt $d\sigma/d\Omega$ eine Rolle. Ob es sich bei einem Streuprozess um einen elastischen oder unelastischen handelt und welcher entsprechende Wirkungsquerschnitt (Gleichung 3.15 oder 3.16) verwendet werden muss, wird ebenfalls mittels Zufallszahl festgelegt. Dies wird so oft wiederholt, bis das Elektron die Probe mit verringerter Energie E unter dem Austrittswinkel θ verlässt oder aufgrund des Energieverlustes stecken bleibt. Der Energieverlust wird dabei anhand der *Continuous-Slowing-Down Approximation* nach Bethe (s. Kapitel 3.3.2) berechnet und ist proportional zu Wegstrecke s . Selbstverständlich ist auch die Rückstreuung des PE und der Austritt als BSE möglich.

MC-Simulationen erlauben es Objekte komplexer Geometrien bestehend aus verschiedenen Materialien zu untersuchen, die auch inhomogen sein können. Geht eine Elektronentrajektorie innerhalb der Probe von einem Material in ein anderes über, wird der berechnete Pfad an dieser Stelle unterbrochen und ein Streuereignis eingefügt. Das Elektron führt seinen Weg dann im neuen Material unter Berücksichtigung der entsprechenden materialspezifischen Parameter weiter.

3.5 Rastertransmissionselektronenmikroskopie

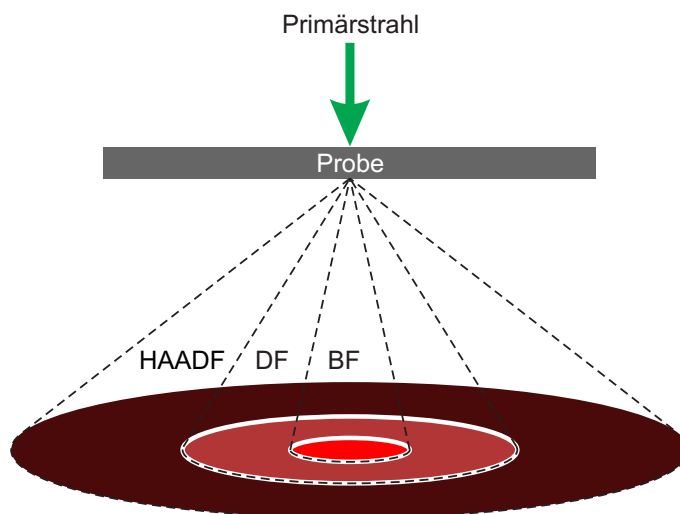


Abbildung 3.18. Illustration der verschiedenen im STEM detektierten Winkelbereiche (BF, DF, HAADF).

STEM ist eine Technik, bei der ein fokussierter Elektronenstrahl über eine elektronentransparente Probe gerastert wird. Anders als in der Transmissionselektronenmikroskopie wird für die Bildentstehung nach der Probe kein abbildendes Linsensystem benötigt. Stattdessen wird ein in mehrere, konzentrische Ringe unterteilter Halbleiterdetektor mittig auf der optischen Achse platziert. Durch die Aufteilung in Segmente können Elektronen detektiert werden, die in unterschiedliche Winkelbereiche gestreut werden, was in Abbildung 3.18 schematisch veranschaulicht wird. Mit dem innersten Detektorsegment werden nur sehr schwach oder gar nicht gestreute Elektronen detektiert, was als Hellfeld (engl. bright-field, BF) bezeichnet wird. Stärker gestreute Elektronen werden in dem weiter außen liegenden Dunkelfeld-Segment (engl. dark-field, DF) detektiert und sehr stark gestreute Elektronen im Weitwinkeldunkelfeld-Segment (engl. high-angle angular dark-

field, HAADF). Grundsätzlich zeigen alle drei Winkelbereiche eine Kombination aus Massendickenkontrast, d.h. Kontrast in Abhängigkeit von der Materialdichte und Dicke des durchstrahlten Materials, und Z -Kontrast, d.h. eine Abhängigkeit von der Ordnungszahl Z . Im BF und DF wird dies bei kristallinen Proben zusätzlich von Beugungskontrast durch Bragg-Beugung am Kristallgitter überlagert. Aufgrund der großen Abnahmewinkel ist dies bei HAADF-Bildern nicht der Fall. Sie sind dafür besonders chemisch sensitiv, d.h. zeigen besonders ausgeprägten Z -Kontrast, da die Streuung in große Winkel von elastischer Streuung dominiert wird und deren Wirkungsquerschnitt nach Gleichung 3.15 proportional zu Z^2 ist.

In der Regel werden STEM-Untersuchungen wie in der TEM bei hohen PE-Energien von 80 – 300 keV durchgeführt. Dank des zunehmenden Einsatzes von FEGs als Elektronenquelle in Rasterelektronenmikroskopen und der damit verbundenen höheren Qualität des Elektronenstrahls, kann STEM – einen entsprechenden Detektor vorausgesetzt – auch im für REM üblichen Niederenergiebereich (≤ 30 keV) betrieben werden. In diesen Fällen spricht man auch von low-keV STEM.

3.6 Focused-Ion-Beam-Systeme

Systeme mit fokussierten Ionenstrahlen (engl. focused-ion-beams, FIB) haben eine sehr ähnliche Arbeitsweise wie Rasterelektronenmikroskope [122]. Als Quelle einer FIB-Säule wird in einer Ionenquelle Gallium mit Heizspulen erwärmt, sodass es in flüssiger Form vorliegt. Durch Anlegen einer hohen Spannung an eine sehr spitze Wolframnadel wird das die Nadel benetzende Gallium durch Feldverdampfung ionisiert. Die Ga^+ -Ionen werden in der Säule auf bis zu 30 keV beschleunigt und mittels eines Linsensystems auf die Probe fokussiert. Dabei erfordert die hohe Masse der Ionen die Verwendung von elektrostatischen Linsen, da elektromagnetische Linsen, wie sie im Rasterelektronenmikroskop verwendet werden, extrem hohe Magnetfelder voraussetzen würden. In der Probe treten verschiedene Wechselwirkungen auf. Neben der Erzeugung von SE ist die wichtigste die Sputtererosion, d.h. das Abtragen von Material hervorgerufen durch das Herauslösen von Oberflächenatomen. Dies erfolgt entweder durch den direkten Energieübertrag beim Auftreffen der Ga^+ -Ionen oder durch Stoßkaskaden, bei denen die Energieübertragung von Atom zu Atom erfolgt, bis die Oberfläche wieder erreicht ist. Sollte der Energieübertrag an ein Oberflächenatom größer sein als seine Bindungsenergie, so wird es herausgelöst. Negative Aspekte fokussierter Ionenstrahlen sind die unvermeidbare Implantation von Ga^+ -Ionen ins Material sowie die Erzeugung verschiedener Gitterdefekte, sowie eine Amorphisierung der Probe.

Es hat sich bewährt, ein FIB-System mit einem klassischen Rasterelektronenmikroskop zu kombinieren. Bei diesen sog. *Dual-Beam*-Systemen sind REM- und FIB-Säule zueinander verkippt, was es erlaubt, Proben mittels FIB zu bearbeiten und gleichzeitig mit dem Elektronenstrahl den Prozess in-situ zu überwachen (s. Abbildung 3.19). Diese und weitere Eigenschaften, wie z.B. die Möglichkeit der ionenstrahlinduzierten Abscheidung von Metallen, macht solche Systeme zu einem mächtigen Werkzeug mit vielfältigen Einsatzmöglichkeiten. Insbesondere in der Probenpräparation werden sie eingesetzt, um gezielt TEM Lamellen aus spezifischen Probenstellen zu entnehmen. In dieser Arbeit werden biologische Zellen schrittweise streifend mit einem fokussierten Ga^+ -Ionenstrahl abgetragen, um einen Einblick ins Zellinnere zu erhalten.

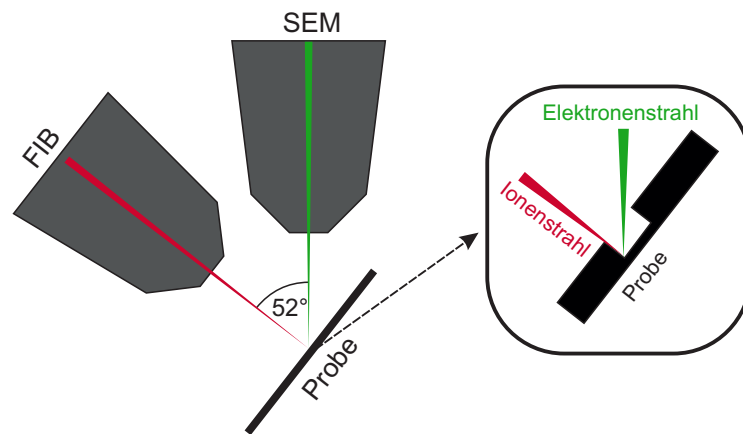


Abbildung 3.19. Anschauliche Darstellung der Anordnung von FIB- und REM-Säulen im kombinierten FIB/REM-System FEI Strata 400. Die Vergrößerung zeigt das parallele Arbeiten mit dem Ionenstrahl zum Sputtern und dem Elektronenstrahl zur Erzeugung von REM-Abbildungen einer Probe. Grafik frei nach [122].

3.7 Environmental Scanning Electron Microscopy

Die ESEM ermöglicht es, REM unter vergleichsweise hohen Drücken zu betreiben (bis zu 4000 Pa), was viele neue Anwendungsmöglichkeiten erlaubt. So können zum Beispiel wasserhaltige Proben untersucht werden, da ab Drücken von über 600 Pa in der Kammer und durch gleichzeitige Kühlung auf Temperaturen knapp über 0°C das Wasser in seiner flüssigen Phase stabil in der Probe gehalten werden kann. Ferner können nicht-leitende Proben betrachtet werden, da ionisierte Gasatome für einen Ladungsaustausch an der Oberfläche der Probe sorgen und diese somit nicht mit einer leitfähigen Schicht bedampft werden müssen.

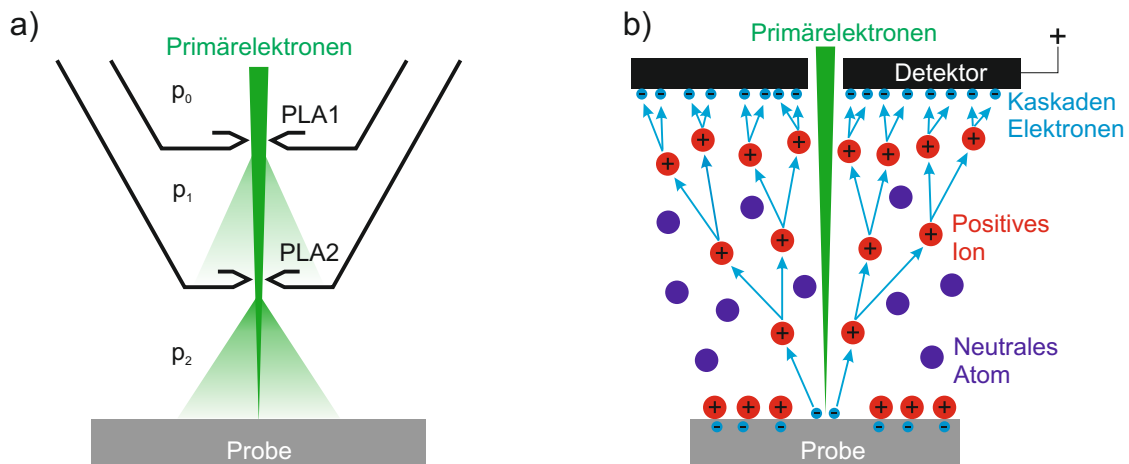


Abbildung 3.20. a) Schematische Darstellung des Aufbaus eines ESEM-Polschuhs mit Blenden (PLA1, PLA2) zur Abgrenzung von Bereichen unterschiedlicher Drücke (p_0, p_1, p_2) und der resultierenden rockförmigen Strahlaufweitung aufgrund von Elektronenstreuung. b) Illustration der Signalerzeugung von SE und BSE im ESEM-Modus durch Stoßkaskaden an Gasatomen in Probenkammer.

Die erhöhten Drücke in der Probenkammer werden durch ein differentielles Pumpsystem realisiert. Abbildung 3.20a zeigt schematisch den Aufbau des unteren Bereichs eines dazu benötigten Polschuhs. Mit Blenden (engl. pressure-limiting aperture, PLA) werden dabei Bereiche unterschiedlichen Drucks voneinander getrennt, sodass in der Elektronensäule das nötige Hochvakuum (p_0)

erhalten bleibt, während in den darunter liegenden Bereichen mit höheren Drücken (p_1, p_2, \dots) die PE zunehmend gestreut werden. Die Anzahl der Blenden und damit der Bereiche kann je nach Mikroskop variieren. Die Streuprozesse von Elektronen mit Gasmolekülen führen zu einer Rockförmigen Strahlaufweitung (s. Abbildung 3.20a) und damit zu einer Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Trotz allem bleibt der Hauptteil des Elektronenstrahls fokussiert, sofern der Arbeitsabstand zwischen Probe und Polschuh genügend klein ist.

Die Signalentstehung bei der ESEM funktioniert anders als unter Hochvakuum und wird in Abbildung 3.20b veranschaulicht. Austretende SE oder BSE werden durch Anlegen einer positiven Spannung an den am Polschuh befestigten Detektor zu diesem hin beschleunigt und stoßen dabei mit den Gasatomen im Zwischenraum zusammen, wo sie, genug Energie vorausgesetzt, die Atome ionisieren. Die so entstehenden Stoßkaskaden von Elektronen sorgen für eine Verstärkung des Signals:

$$G \propto \exp(\alpha d) \quad (3.35)$$

wobei α der Ionisationskoeffizient des verwendeten Gases ist und d der Abstand zwischen Probe und Detektor. Es können im ESEM-Modus verschiedene Gase verwendet werden, beispielsweise Wasserdampf, Luft, Stickstoff oder Argon. Die entstehenden ionisierten positiven Gasatome sorgen auf der Probenoberfläche für einen Ladungsausgleich möglicher negativer Oberflächenladungen. Neben SE- und BSE-Detektion ist auch STEM-Betrieb im ESEM-Modus möglich, vorausgesetzt die zu untersuchende Probe ist dünn genug.

3.8 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl. energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDXS) ermöglicht das Messen der Energie charakteristischer Röntgenstrahlung mit dem Ziel der Elementanalyse. Wie in Kapitel 3.3.2 erwähnt, können hochenergetische Elektronen durch unelastische Streuung Elektronen von inneren Schalen eines Atoms ionisieren. Zur energetischen Stabilisierung des so angeregten Atoms fällt ein weiter außen liegendes Hüllenelektron auf das freigewordene Niveau und gibt die Energiedifferenz in Form eines Röntgenquants ab. Da die Energieniveaus eines jeden Atoms scharf definiert sind, haben die austretenden Röntgenquanten eine für den Übergang und das Element charakteristische Energie, welche mittels Silizium-Drift-Detektoren gemessen werden kann. Aufgrund des Pauli-Prinzips sind nur ausgewählte Übergänge erlaubt, welche bestimmte Auswahlregeln einhalten müssen. Die nach den inneren Schalen (K-, L-, M-Schale) benannten Übergänge ($K_\alpha, K_\beta, L_\alpha, K_\beta, M_\alpha, \dots$) bilden das charakteristische Spektrum eines Elements.

Im Fall, dass Primärelektronen die gesamte Elektronenhülle eines Atoms passieren, können sie mit dem Kern des Atoms unelastisch wechselwirken. Im Coulomb-Feld des Nucleus erfahren sie eine Impulsänderung, in deren Folge wiederum ein Röntgenquant emittiert werden kann. Da auf diese Art der Energieverlust der PE beliebig groß sein kann, entsteht so ein kontinuierliches Spektrum von Röntgenstrahlung, das aufgrund der *abbremsenden* Wirkung, welche die Primärelektronen erfahren, als *Bremstrahlung* bezeichnet wird. Sie bildet bei EDXS-Spektren einen kontinuierlichen Untergrund, wie in Abbildung 3.21 dargestellt ist. Bei Energien $< \approx 2 \text{ keV}$ ist dabei eine starke Abnahme der Intensität zu beobachten, welche auf Absorption der Bremsstrahlung in der Probe und eine geringe Detektoreffizienz zurückzuführen ist. Entgegen der schematischen Darstellung in Abbildung 3.21, haben die charakteristischen Linien in Wirklichkeit die Form einer Lorentz-Verteilung, bedingt durch die natürliche Linienbreite und deren Verbreiterung durch die Messgenauigkeit des Detektors.

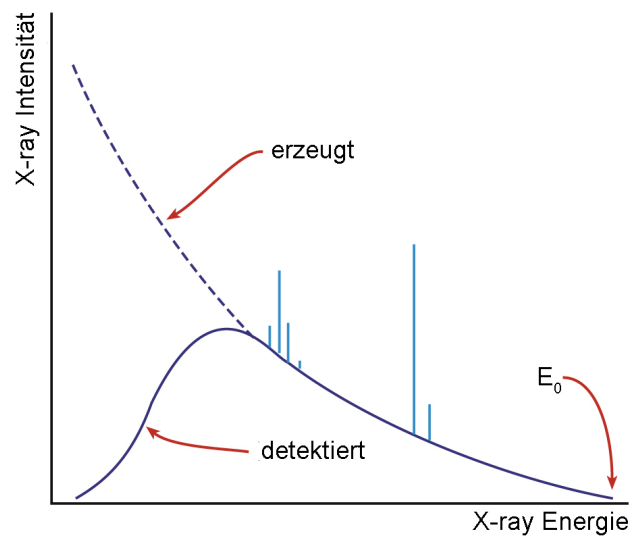


Abbildung 3.21. Schematisches EDXS-Spektrum. Senkrechte Linien illustrieren charakteristische Röntgenlinien eines Elements, während die durchgezogene bzw. gestrichelte Kurve das Spektrum der Bremsstrahlung, wie es erzeugt bzw. praktisch gemessen wird, darstellen. Grafik frei nach [109].

Kapitel 4

Experimentelle Methoden und Analyseverfahren

Dieses Kapitel dient der detaillierten Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Geräte. Abschnitt 4.1 befasst sich eingehend mit der Probenpräparation für die Elektronenmikroskopie, welcher wiederum Kapitel 4.2 gewidmet ist. Hier werden die verschiedenen angewandten Techniken der Datenerfassung bei REM- und STEM-Untersuchungen und alle essentiellen Einstellungen erläutert. Gleiches gilt für Kapitel 4.3, welches die Tomografie-Untersuchungen mittels FIB behandelt. Es folgen Erläuterungen zur Datenauswertung der verschiedenen Messungen in Kapitel 4.4. In Abschnitt 4.5 werden die Anwendung von Simulationen, sowie die verwendeten Parameter beschrieben, gefolgt von einer zusammenfassenden Beschreibung aller weiterer verwendeter Methoden (Abschnitt 4.6).

4.1 Biologische Präparation

In dieser Arbeit wurden Alveolarepithelzellen der Zelllinie A549 verwendet, welche von der American Type Culture Collection (ATCC Rockville, USA) erworben wurden. Die zur Partikelexposition verwendeten nahezu monodispersen, amorphen Siliziumdioxid-Partikel (SiO_2 -Partikel) wurden von der Firma Postnova Analytics (Landsberg am Lech, Deutschland) in drei Größen bezogen: 100 nm SiO_2 -NP, 200 nm und 500 nm SiO_2 -SMP. Die genauere Charakterisierung der Partikel wird im Kapitel 4.6 beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung der Zellkultivierung findet sich im Anhang A.1.

4.1.1 Vorbereitung der Proben

Für Depositionsversuche in *in-vitro*-Experimenten wurden $7,7 \times 10^5$ A549-Zellen in *6-well* Kulturplatten (Corning, USA) in Zellkulturmedium (engl. cell culture medium, CCM), ergänzt mit 10% fötalem Rinderserum (engl. fetal bovine serum, FBS), ausgesät und über Nacht bei 37°C ruhen gelassen. Multi-well Kulturplatten bestehen aus Polystyrol und beinhalten ihrer Bezeichnung entsprechend mehrere, kreisrunde Becken, die an Brunnen erinnern (engl. *well*) und in denen Zellen kultiviert werden. Als Substrate innerhalb der Kulturplatten kamen, je nach Verwendungszweck, entweder mit 160 nm ITO-beschichtete Glas-Objektträger (PGO, Iserlohn), mit einer etwa 22 nm dicken ITO-Schicht versehene Substrate aus amorphem Glaskohlenstoff, oder spezielle Membraneinsätze (Transwell®-Einsätze) für *6-wells* zum Einsatz. Die ITO-Substrate werden im Folgenden entsprechend ihrer Dicke als *ITO160* oder *ITO22* bezeichnet. Vor Verwendung mussten sie in Methanol gereinigt und mit Stickstoff getrocknet werden. Die Glaskohlenstoff-Substrate waren speziell

für BSE-Kontrast Untersuchungen intern hergestellte Substrate. Details zum Herstellungsprozess können Kapitel 4.6.3 entnommen werden. Die Präparation erfolgte ansonsten identisch wie die der 160 nm ITO-Substrate. Membraneinsätze dagegen wurden zur Herstellung von Dünnschnitten für low-keV STEM-Untersuchungen benötigt (s. Abschnitt 4.2.2). Im nächsten Schritt folgte die Partikelexposition.

Zellfreie Experimente – Vorbeschichtung mit (konditioniertem) Zellkulturmedium

Zellfreie Experimente zur Untersuchung des Einflusses von Substratbeschichtungen auf die Partikeldeposition wurden analog zum oben beschriebenen Verfahren mit *ITO160*-Substraten durchgeführt. Bei der Präparation entfiel lediglich die Aussaat der Zellen, sodass die Proben über Nacht eine Beschichtung mit Inhaltsstoffen des Zellkulturmediums erhielten. Hier kam neben dem regulären CCM ein speziell konditioniertes CCM zum Einsatz. Der Begriff der Konditionierung beschreibt die Modifikation der extrazellulären Umgebung durch Zellen, beispielsweise durch die Absonderungen von zelleigenen Substanzen. Folglich enthält das konditionierte CCM vielerlei sezernierte Proteine, Wachstumsfaktoren, aber auch inflammatorische Mediatoren. Es wurde aus dem Überstand einer 72 h-Kultivierung von A549-Zellen gewonnen, indem das Medium entnommen und bei 300 g für 5 min zentrifugiert wurde. Im Anschluss an die Vorbeschichtung erfolgte auch hier die Partikelexposition.

4.1.2 Präparation der Partikelsuspension und Partikelexposition

Zur Partikelexposition mussten die Standard-Suspensionen mit einer Konzentration von 50 mg/mL zunächst verdünnt werden. Im ersten Schritt wurde die Standard-Suspension mit einem Vortexmischer für 10 Sek. durchgemischt und anschließend durch Hinzufügen von deionisiertem Wasser eine Verdünnung von 1 mg/mL erzeugt. Nach erneutem 10 Sek. Vortexen wurden die gewünschten Eingabekonzentrationen zwischen 7 und 109 µg/mL durch Verdünnung in CCM erstellt und anschließend nochmals 10 Sek. durchgemischt. Die Wahl der Konzentration wurde je nach Partikel so getroffen, dass die resultierende Flächendichte weder besonders hoch, noch besonders niedrig ist. Sehr hohe Flächendichten aufgrund eines dichten Partikelteppichs auf der Probe würden eine quantitative Auswertung unmöglich machen und zu niedrige Flächendichten würden keine ausreichend gute Statistik liefern.

Die Exposition der tags zuvor präparierten Proben mit bzw. ohne Zellen (s.o.) begann mit dem Austausch des Zellkulturmediums durch 3 mL der präparierten Partikelsuspension. Nach Verstreichen der gewünschten Expositionsdauer wurde die Suspension abgesaugt und es folgte eine zehnminütige Fixierung mit 3 mL 4% Paraformaldehyd-Lösung zur Konservierung von zellulären Strukturen. Schließlich wurden die Proben noch dreifach mit phosphatgepufferter Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline, PBS^{-/-}, ohne CaCl₂, ohne MgCl₂) gewaschen, in der sie bis zur Trocknung verblieben. PBS^{-/-} ist eine Pufferlösung, die in der Biochemie verwendet wird, um den pH-Wert konstant zu halten. Bei Hinzugabe einer geringen Menge einer starken Säure oder Base ändert sich ihr pH-Wert kaum.

Alle Präparationsschritte bis zu diesem Punkt wurden am ITG, Campus Nord des KIT von Dr. Susanne Fritsch-Decker durchgeführt.

4.1.3 Entwässerung und Kritische-Punkt-Trocknung

Das Hochvakuum im Rasterelektronenmikroskop macht es erforderlich, die Zellen zu trocknen, da das in ihnen enthaltene Wasser ansonsten verdampfen und zelluläre Strukturen beschädigt werden würden. Das hierzu verwendete Verfahren der überkritischen Trocknung, oder auch Kritische-Punkt-Trocknung (KPT) genannt, erfordert jedoch eine vorherige Entwässerung der Proben. Hierzu wurden sie in eine Reihe von Bädern mit steigendem Ethanolgehalt platziert: 50, 70, 95, 100 %, je 2 mal für 10 Minuten. Aufgrund der verschiedenen Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Zellen erfolgte so ein diffusionsgetriebener Austausch des Wassers mit Ethanol. Bis zur KPT verblieben die Proben daraufhin in 100 % Ethanol.

Die KPT macht sich den überkritischen Zustand eines Stoffes zu eigen, um eine Verdampfung, d.h. einen Phasenübergang von flüssig zu gasförmig, zu umgehen. Wird dieser Bereich bei einem Stoff erreicht, existiert kein Unterschied mehr zwischen beiden Phasen, und eine schonende Trocknung ist möglich. Da der kritische Punkt von Wasser bei 374 °C und 221 bar liegt, ist es ein denkbar ungünstiges Medium für diesen Prozess. Der kritische Punkt von CO₂ dagegen liegt bei etwa 31 °C und 74 bar, jedoch vermischt es sich nicht mit Wasser, weshalb der oben beschriebene Zwischenschritt der Entwässerung mit Ethanol nötig ist. Nachdem die Proben in einem Druckbehälter platziert wurden, wurde bei 8 °C das Ethanol in den Zellen wie bei der Entwässerung schrittweise mit flüssigem CO₂ ausgetauscht. Daraufhin wurde die Kammer auf 40 °C erhitzt, was folglich auch den Druck ansteigen lässt. Sobald der überkritische Bereich erreicht war, wurde ein Druckventil geöffnet und gasförmiges CO₂ entwich aus der Kammer. Wenn der Druck unterhalb des kritischen Drucks lag, wurde auch die Heizung abgeschaltet. Nach Erreichen der Raumtemperatur (RT) und des Atmosphärendrucks waren die Proben fertig getrocknet und konnten mittels REM untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde ein *CPD 030 Critical Point Dryer* (BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein) zur überkritischen Trocknung verwendet.

Aufgrund der beschriebenen Präparationsschritte ist es vorstellbar, dass deponierte Partikel während der Präparation verloren gehen. Um solche Verluste auszuschließen wurden in einem Test mehrere Proben doppelt prozessiert, d.h. nach einer ersten Prozessierung und Bestimmung der deponierten Partikelmengen mittels REM, wurden die gleichen Proben erneut entwässert, getrocknet und quantifiziert. Der Vergleich der Ergebnisse zeigte keine nennenswerten Unterschiede.

4.1.4 Herstellung von Dünnschnitten für STEM-Untersuchungen – Einbetten in Epoxidharz und Ultramikrotomie

Zur Präparation von STEM-Dünnschnitten müssen die Proben eingebettet werden, was eine spezielle Präparationsroutine erfordert. In die üblichen *6-well* Kulturplatten wurden Transwell®-Membraneinsätze platziert, sodass die Membran eine Grenze zwischen einer oberen und einer unteren Kammer bildete. In die untere Kammer wurden 2,5 mL CCM gegeben, und auf die Membran in der oberen Kammer wurden $3,7 \times 10^5$ A549-Zellen in 1,5 mL CCM ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen des kompletten Mediums in der oberen Kammer wurden 1,5 mL der Partikelsuspension mit der gewünschten Eingabekonzentration hinzugefügt und für die gewünschte Expositionsdauer ruhen gelassen. Nach Absaugen des Mediums, sowohl im Einsatz (obere Kammer) als auch im *well* (untere Kammer), wurden die Zellen mit 1 mL 0,1 M Pipes-Lösung gespült. Pipes ist wie PBS^{-/-} eine Pufferlösung. Um zu verhindern, dass die Membran austrocknet, wurden nach dem Absaugen der zum Spülen verwendeten Lösung wieder 1 mL 0,1 M Pipes-Lösung auf die Membran gegeben und das Insert in eine Petrischale überführt. Mit einem

Biopsy-Punch wurden schließlich Proben aus der Membran ausgestochen und in 1 mL große Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, welche mit einer Lösung zu Erstfixierung der Zellen gefüllt waren. Das vollständige Rezept für deren Herstellung kann Anhang A.2.1 entnommen werden. Die Erstfixierung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach zweifacher zehnmütiger Wäsche der Proben mit 0,1 M Pipes erfolgte die Zweitfixierung mit einer Osmiumtetroxid enthaltenden Lösung (Zusammensetzung s. Anhang A.2.2). Nach 1 h auf Eis wurden die Membranen erneut zweimal für je 15 min mit 0,1 M Pipes-Lösung gewaschen, was im Anschluss mit destilliertem Wasser wiederholt wurde. Schließlich folgte über Nacht eine Blockfärbung mit einer 2 % Uranylacetat-Lösung, gelöst in 25 % Ethanol / 75 % Wasser.

Für die eigentliche Einbettung mussten die Proben zunächst schrittweise entwässert werden, was in Ethanolbädern mit steigendem Ethanolgehalt (50, 70, 95, 100 %, je 2 mal für 10 Minuten) vollzogen wurde. Dann wurde das Ethanol durch Propylenoxid ausgetauscht, indem die Membranen zweimal für je 5 Minuten in 100 % Propylenoxid gegeben wurden. Dieser Zwischenschritt ermöglichte erst den Austausch mit dem zum Einbetten verwendeten Epoxidharz (EPON). Auch dies erfolgte in EPON/Propylenoxid-Bädern mit steigendem EPON-Gehalt (30, 70, 100 %), jedoch über deutlich längere Zeiträume (1 h, über Nacht, 6 h). Hiernach wurden die Proben in Flacheinbettungsformen, in denen sich bereits etwas angetrocknetes EPON befand, gelegt und mit EPON übergossen. Zur finalen Polymerisierung mussten die Proben für 3 Tage bei 60 °C im Trockenschrank gelagert werden.

Um Dünnschnitte zu präparieren, wurden die ausgehärteten Proben zunächst pyramidenförmig zugeschnitten, sodass an der Spitze in einer ca. $1 \times 1 \text{ mm}^2$ großen Fläche die eingebettete Membran zu sehen war. Die so präparierten Proben wurden in ein Ultramikrotom gespannt und der Pyramidenstumpf wurde mit einem Glasmesser planparallel zugeschnitten. Dann wurde dieses Messer gegen ein Diamantmesser mit Wasserbad ausgetauscht, um die finalen Dünnschnitte mit 100 nm, 200 nm und 300 nm Dicke zu schneiden. Dabei rutschten die Dünnschnitte entlang des Messer auf die Wasseroberfläche und konnten von da mit einem speziellen Greifwerkzeug auf TEM-Kupfernetzchen (100er mesh) übertragen werden, wo sie an Luft trockneten und schließlich im Elektronenmikroskop untersucht werden konnten.

In dieser Arbeit wurde ein *Leica EM UC6* Ultramikrotom verwendet, welches vom ITG, Campus Nord des KIT freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellkultivierung, Partikelexposition, Fixierung und Einbettung wurden am ITG von Silvia Andraschko durchgeführt.

4.2 Elektronenmikroskopie

4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Alle REM-Untersuchungen wurden an einem *FEI Quanta 650 ESEM* (FEI, USA) durchgeführt. Das Mikroskop ist ausgestattet mit einer Schottky-Feldemissionskathode, einem Everhart-Thornley-Detektor für SE-Aufnahmen und einem ringförmigen Silizium-BSE-Detektor, basierend auf einer Schottky-Diode, mit einer aktiven Detektorfläche von ungefähr 200 mm^2 , welcher zentral unterhalb des Polschuhs platziert ist. Die Proben wurden auf einen Aluminiumhalter von 32 mm Durchmesser platziert und mit Leitsilber fixiert, was den zusätzlichen Effekt der Erdung der Probe hat.

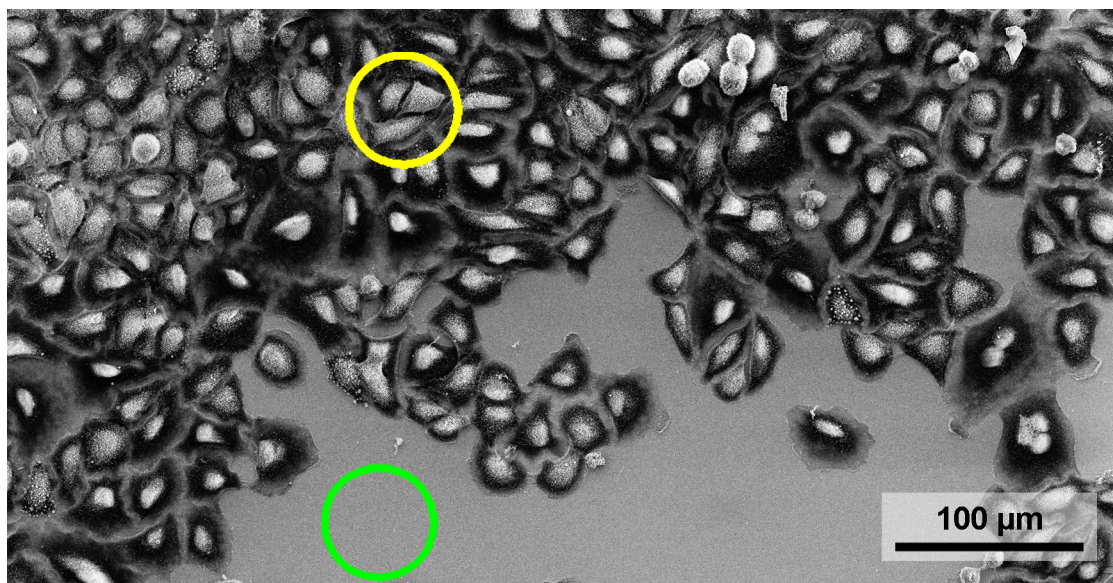


Abbildung 4.1. SE-REM-Übersichtsaufnahme einer Probenstelle auf ITO160. Im oberen Abschnitt ist ein dichter Teppich von Zellen zu sehen, während im unteren Teil freies ITO-Substrat zu erkennen ist. Die farbigen Kreise zeigen beispielhaft zwei Flächen von Interesse für Depositionsuntersuchungen: interzellulärer Bereich (grün) und zelluläre Oberflächen (gelb).

Abbildung von Nanopartikeln

Zur Untersuchung der Partikeldeposition wurden grundsätzlich Aufnahmen zweier verschiedener Bereiche erstellt, die in Abbildung 4.1 illustriert sind. Zum einen handelt es sich dabei um zellfreie Flächen des ITO-Substrats (grüner Kreis), welche im Folgenden als *interzelluläre* Bereiche bezeichnet werden. Zum anderen wurden Aufnahmen der Zelloberflächen (gelber Kreis) erstellt, welche als *zelluläre* Bereiche bezeichnet werden. Bei interzellulären Bildern wurde darauf geachtet, keine Aufnahmen in unmittelbarer Nähe von Zellen vorzunehmen, da die natürliche Bewegung der Zellen während der Exposition mit NP die Flächendichten dort verfälschen kann.

Interzelluläre Aufnahmen wurden mit dem SE-Detektor bei 5 keV PE-Energie erstellt. Aufgrund der starken Topografie der Zelloberfläche waren die gesuchten Partikel, insbesondere die 100 nm kleinen NP, im SE-Kontrast auf Zelloberflächen aber kaum zu erkennen. Abbildung 4.2a zeigt eine solche SE-Aufnahme einer Zelloberfläche mit deutlicher Aufladung des Zellkerns. Die vorhandenen 100 nm Nanopartikel sind nur sehr schwer zu detektieren. Deshalb wurde hier auf BSE-Bilder zurückgegriffen, die mit einem zentral unter dem Polschuh angebrachten ringförmigen Halbleitendetektor erstellt wurden. Die Probenbühne blieb dabei stets waagrecht. BSE-Aufnahmen ermöglichen es, den Materialkontrast zwischen SiO_2 ($\bar{Z} = 10$) und dem Zellmaterial (primär Kohlenstoff, $\bar{Z} \approx 6$) auszunutzen. In Abbildung 4.2b wird eine BSE-Aufnahme von der gleichen Probenstelle wie in Abbildung 4.2a gezeigt. In erster Linie fällt auf, dass die Aufladung des Zellkerns bei BSE-Abbildungen nicht stört, da die hochenergetischen BSE vom elektrischen Feld der Aufladung weniger beeinflusst werden als SE. Dank des Materialkontrastes heben sich die Silika-NP hier leicht vom zellulären Hintergrund ab. Da der Kontrast jedoch gering ausfällt, musste er durch Anlegen einer Bremsspannung U_{bias} an die Probenbühne verstärkt werden. Durch diese wird die Landeenergie, mit der die Primärelektronen auf die Probe treffen, reduziert und gleichzeitig werden austretende SE und BSE zum BSE-Detektor hin beschleunigt. Bei 200 nm und 500 nm großen Submikropartikeln wurde mit einer Landeenergie von $E_0 = 3 \text{ keV}$ bei der maximal möglichen Gegenspannung von $U_{bias} = -4 \text{ kV}$ gearbeitet (Ausgangsenergie der PE 7 keV), während bei nur 100 nm großen

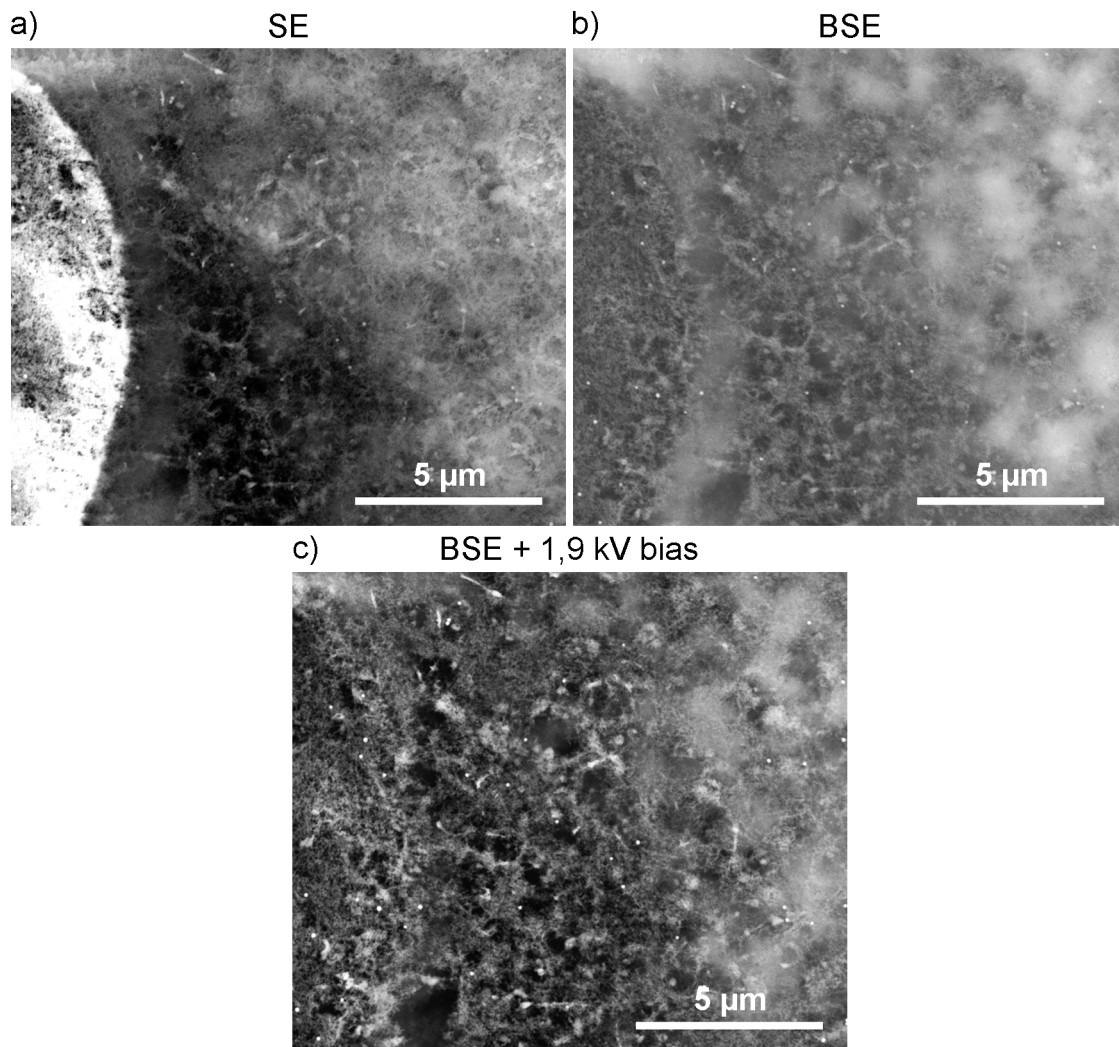


Abbildung 4.2. Vergleich von (a) SE-Abbildung, (b) regulärer BSE-Abbildung und (c) BSE-Abbildung mit angelegter Bremsspannung von 1,9 kV. Dargestellt ist eine Zelloberfläche mit einzelnen 100 nm SiO_2 -Nanopartikeln. Alle 3 Bilder wurden mit einer Landeenergie von 5 keV erstellt und zeigen den gleichen Bildausschnitt. Im linken Teil ist der Zellkern lokalisiert, zu erkennen an der starken Aufladung in (a).

NP eine reduzierte Spannung von $U_{bias} = -1,9\text{ kV}$ und eine Landeenergie von 5 keV verwendet wurden (Ausgangsenergie der PE $6,9\text{ keV}$). Durch die kleinere Bremsspannung wurde vermieden, einen Großteil der ebenfalls zum Halbleiterdetektor beschleunigten SE zu detektieren, da sie in der Schutzschicht des Halbleiters absorbiert werden (eine detailliertere Behandlung der Detektoreffizienz findet sich in Abschnitt 4.5.1). Diese Beschränkung ist nötig, um zelluläre Strukturen in der Größenordnung der NP nicht fälschlicherweise als solche zu identifizieren. Bei den größeren SMP ergibt sich diese Problematik nicht, weshalb hier die maximale Bremsspannung verwendet werden kann. In Abbildung 4.2c wird die gleiche Probenstelle wie in Abbildung 4.2b gezeigt, diesmal jedoch mit einer angelegten Bremsspannung von 1,9 kV. Im Vergleich zur Abbildung ohne Bremsspannung hat sich der BSE-Kontrast der SiO_2 -NP deutlich erhöht und sie sind gut zu detektieren.

Bei BSE-Abbildungen wird ein weiterer Effekt ausgenutzt, um die Detektierbarkeit von Nanopartikeln zu erhöhen. Durch Verringerung des Arbeitsabstandes (engl. working distance, WD) gewinnt in BSE-Abbildungen Topografiekontrast an Stärke. Durch das gemischte Signal aus Materialkon-

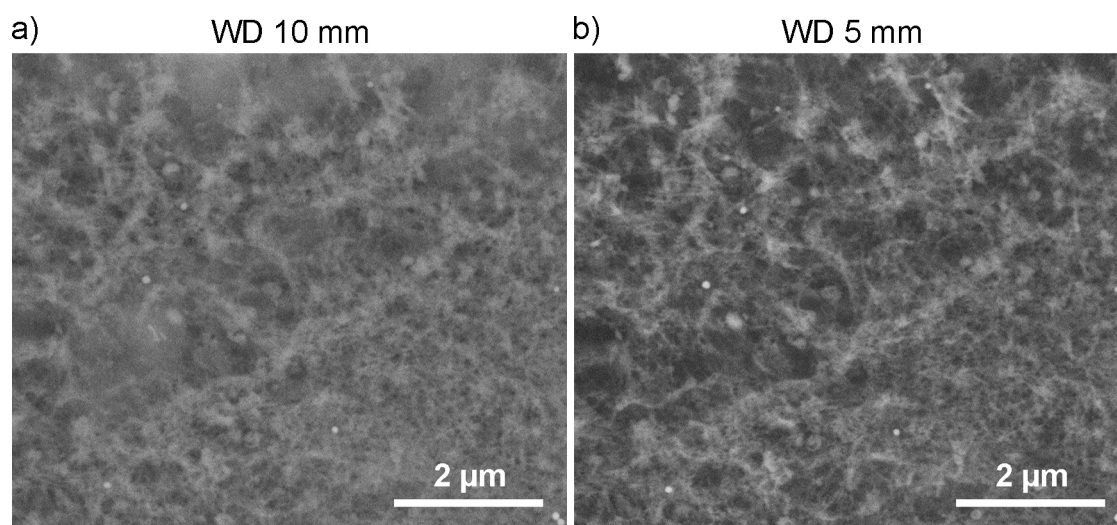


Abbildung 4.3. Vergleich von 5 keV BSE-Abbildungen mit (a) 10 mm WD und (b) 5 mm WD von einer Zelloberfläche mit 100 nm SiO_2 -NP.

trast und zusätzlichem Topografiekontrast wird die Sichtbarkeit der NP auf den Zellen nochmals verbessert. Abbildung 4.3 veranschaulicht den Effekt anhand zweier BSE-Abbildung einer Zelloberfläche mit 100 nm SiO_2 -NP bei $WD = 10$ mm (Abbildung 4.3a) und $WD = 5$ mm (Abbildung 4.3b). Daher wurden alle BSE-Aufnahmen zur Quantifizierung der Deposition auf Zellen mit einem Arbeitsabstand von 5 mm erstellt. Die Arbeitsabstandsabhängigkeit des BSE-Kontrastes wird im Rahmen der Kontrastuntersuchungen in Kapitel 6 umfassend behandelt.

Um eine ausreichend gute Statistik zu gewährleisten, wurden Bilderserien von 50 bis 100 Bildern pro Probe und Bereich (zellulär/interzellulär) aufgenommen und bezüglich der Flächendichten ausgewertet (s. Abschnitt 4.4.1). Dabei wurde Wert darauf gelegt, möglichst viel Substratoberfläche abzudecken, um den Einfluss lokaler Inhomogenitäten zu minimieren. Die Vergrößerung wurde stets so gewählt, dass die Bildausschnitte so groß wie möglich waren und gleichzeitig die Partikel noch ausreichend gut sichtbar blieben.

Rückstreuелеktronenkontrast von Nanopartikeln

Unabhängig von den Depositionsexperimenten wurde der BSE-Kontrast von SiO_2 -NP auf ITO-beschichteten Substraten untersucht. Dazu wurden BSE-Aufnahmen interzellulärer Bereiche von Proben mit 100 nm großen NP erstellt. Dabei blieb die Probenbühne stets in waagerechter Position, wurde also nicht gekippt. Zu Vergleichszwecken wurden ebenfalls SE-Aufnahmen mit dem Everhart-Thornley-Detektor gemacht. Von beiden Substraten (*ITO22* und *ITO160*) wurden je 3 energieabhängige Bilderserien bei konstanten Arbeitsabständen von 4 mm, 6 mm und 10 mm aufgenommen. Dabei wurde E_0 zwischen 3 keV und 17 keV variiert. Ferner wurden je 2 WD-abhängige Serien von BSE-Aufnahmen bei konstanten PE-Energien von 5 keV und 10 keV erstellt, bei denen die WD zwischen 4 mm und 12 mm variiert wurde. Um einen verfälschenden Einfluss von Elektronenstrahl-induzierter Kontamination auf den Kontrast zu minimieren, wurden nach der Justage jeweils Bilder an benachbarten Probenstellen aufgenommen. Es wurde ferner darauf geachtet, dass die Kontrast- und Helligkeitseinstellungen des Mikroskops über eine komplette Bilderserie konstant gehalten wurden, ohne dass Bildintensitäten über- oder untersteuert dargestellt wurden. Abweichend davon musste der Kontrast bei $E_0 < 5$ keV vereinzelt erhöht werden, um ein akzeptables Signal zu erhalten. Eine nähere Untersuchung der Auswirkungen von Kontrast- und Helligkeits-

regler auf den BSE-Kontrast im Bild bei $E_0 = 5 \text{ keV}$ und $WD = 4 \text{ mm}$ ergab, dass lediglich eine Änderung der Helligkeit den BSE-Kontrast im Bild merklich verändert, während Variationen der Kontrasteinstellungen nur minimalen Einfluss auf den BSE-Kontrast haben. Schließlich musste für alle in den Bilderserien verwendeten Detektoreinstellungen das Hintergrundsignal, der sog. Schwarzwert, ermittelt werden. Dies erfolgte durch einfaches Wegblenden des Elektronenstrahls während der Aufnahme eines Bildes. Sämtliche Aufnahmen wurden als 16 bit Graustufen-Bilder mit einer Pixelgröße von 1,46 nm und einer Beleuchtungszeit von $10 \mu\text{s}$ pro Pixel erstellt.

4.2.2 Rastertransmissionselektronenmikroskopie

Niederenergie-Rastertransmissionselektronenmikroskopie

Um die Ultrastruktur von Zellen sowie mögliche inkorporierte Partikel abzubilden, wurden mittels low-keV STEM-Dünnschnitte von eingebetteten Zellen untersucht. Durchgeführt wurden die Untersuchungen am FIB/REM-System *FEI Strata 400S* (FEI, USA), welches über einen STEM-Detektor verfügt. Nach der Identifizierung geeigneter, unbeschädigter Dünnschnitte wurden bei $E_0 = 30 \text{ keV}$ HAADF-Aufnahmen möglichst ganzer Zellen sowie Detailaufnahmen erstellt. Nach Möglichkeit wurde dabei versucht, einzelne Zellen auf unterschiedlichen Dünnschnitten wiederzufinden, was jedoch nur vereinzelt gelang. Der HAADF-STEM-Modus wurde gewählt, da er guten Materialkontrast liefert.

Hochenergie-Rastertransmissionselektronenmikroskopie

Für präzise MC-Berechnungen des BSE-Kontrastes von NP ist eine genaue Kenntnis der Materialparameter erforderlich. Daher wurden klassische Hochenergie-STEM-Untersuchungen bei $E_0 = 200 \text{ keV}$ in Kombination mit EDXS-Analysen angewandt, um die Dicke und die Zusammensetzung der hier verwendeten ITO-Schichten zu bestimmen. Zum Einsatz kam dabei ein *FEI Osiris ChemiSTEM* (FEI, USA), ausgestattet mit vier Bruker-Silizium-Drift-Detektoren. Die dafür benötigten, lediglich knapp 60 nm dicken Querschnittsproben, auch TEM-Lamellen genannt, wurden mittels FIB-Lift-out-Verfahren hergestellt [123]. Von beiden ITO-Schichten wurden mehrere HAADF-Aufnahmen sowie EDXS-Mappings erstellt und ausgewertet. Die Dicke wurde in ImageJ [124] gemessen und quantitative EDXS-Auswertungen wurden mit Hilfe der Bruker-Software ESPRIT durchgeführt. Die Messungen wurden von Dr. Ing. Heike Störmer (LEM) durchgeführt.

4.2.3 Environmental Scanning Electron Microscopy

Wie im Kapitel 3.7 erläutert wurde, können im ESEM-Modus aufgrund des Restgasdruckes in der Probenkammer feuchte Proben wie beispielsweise Zellen untersucht werden, ohne dass diese aufgrund des Vakuums austrocknen und dabei ihre empfindliche Strukturen zerstört werden. Wie im Folgenden beschrieben wird, sind bei der Präparation der Proben keine Entwässerung und KPT notwendig, was die Gefahr von Präparationsartefakten reduziert. Bei der Abbildung von Zellen wird ferner eine Aufladung dieser verhindert, da die ionisierten Gasatome für einen effektiven Ladungsaustausch auf der Zelloberfläche sorgen. Andererseits führt die unvermeidliche Streuung der PE an den Gasatomen zu einer Verschlechterung der Auflösung und des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, weshalb überprüft werden musste, ob ESEM zu Zwecken der Quantifizierung von effektiven Dosen auf Zellen geeignet ist.

Verglichen mit regulären REM-Versuchen erfordern ESEM-Experimente eine abgewandelte Präparationsroutine, weshalb diese im Folgenden genauer beschrieben wird. Als Substrat kamen PELCO® Siliziumnitrid-TEM-Membranen (Ted Pella, Inc., USA) mit neun $1 \times 1 \text{ mm}^2$ großen Fenstern zum Einsatz. Der freitragende Siliziumnitrid-Film hatte eine Dicke von 200 nm. Die Membranen wurden in *96-well* Kulturplatten gegeben und für 5 min in 80 % Ethanol inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes und Abdampfen des restlichen Ethanols wurden in 1 mL CCM, ergänzt mit 10% FBS, $0,25 \times 10^5$ A549-Zellen ausgesät und bei 37°C über Nacht ruhen gelassen. Die anschließende Partikelexposition mit der gewünschten Partikelkonzentration und Fixierung erfolgte in Analogie zum regulären REM-Versuch (vgl. Abschnitt 4.1.2), jedoch mit reduzierten Volumina (je 1 statt 3 mL) und Glutaraldehyd statt PFA als Fixationsmittel. Entwässerung und KPT entfielen. Die Präparation bis hierhin wurde von Dr. Susanne Fritsch-Decker am ITG, Campus Nord des KIT, durchgeführt.

Nach Entnahme einer gekühlt und in $\text{PBS}^{-/-}$ gelagerten Membran musste diese vier mal für einige Sekunden in deionisiertes Wasser getaucht werden, um $\text{PBS}^{-/-}$ Überreste zu entfernen, bevor sie im Mikroskop auf einer speziellen kühlbaren Probenbühne mit integriertem STEM-Detektor platziert wurde. Die Membran wurde anschließend mit $3 \mu\text{L}$ deionisiertem Wasser benetzt, um ein spontanes Austrocknen der Probe beim folgenden Abpumpen der Kammer zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden auch drei weitere $3 \mu\text{L}$ große Tropfen deionisierten Wassers auf den Probenhalter in der Nähe der Probe platziert. Bei einer Bühnentemperatur von 3°C wurde die Probenkammer schließlich fünfmal auf 800 Pa abgepumpt und wieder mit Wasserdampf auf 1500 Pa geflutet, sodass am Ende des Prozesses in der Kammer eine Wasserdampfatmosphäre mit einem Druck von 800 Pa vorlag. An diesem Punkt wurde mit der REM/STEM-Untersuchung bei 30 keV PE-Energie begonnen.

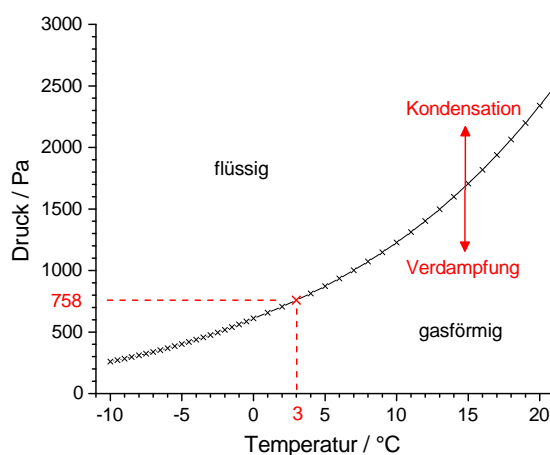


Abbildung 4.4. Phasendiagramm von Wasser zwischen -10°C und 20°C . Der Gleichgewichtsdruck bei 3°C ist 758 Pa (rote, gestrichelte Linien).

Üblicherweise ist bei 3°C und 800 Pa der Wasserfilm auf der Probe noch zu dick, um Details zu erkennen, da man sich noch oberhalb der Phasengrenze zwischen flüssiger und gasförmiger Phase von Wasser befindet. In Abbildung 4.4 wird ein Ausschnitt des Phasendiagramms von Wasser gezeigt. Der ideale Gleichgewichtsdruck zwischen Kondensation und Verdampfung liegt bei 3°C demnach bei 758 Pa, jedoch ist bauartbedingt die tatsächliche Temperatur der Probe selbst in der Regel etwas höher als die am Kühlelement eingestellte Temperatur. Daher ist eine schrittweise Reduzierung des Druckes mit Wartezeiten von mehreren Minuten zwischen den einzelnen Schritten empfehlenswert.

4.3 Einsatz von FIB/REM zur Zelltomografie

Da die low-keV STEM auf Dünnschnitte angewiesen ist, kann sie immer nur kleine Auszüge einer Zelle abbilden. Um ein Gesamtbild des Inneren von Zellen zu erhalten und so eine fundiertere Einschätzung der Partikelaufnahme treffen zu können, wird ein Verfahren wie die FIB slice-and-view Technik benötigt. Hierbei wird die Zelle systematisch mit einem streifend einfallenden Ionenstrahl schichtweise abgetragen, während mit dem Elektronenstrahl REM-Abbildungen erstellt werden. Hierzu mussten reguläre REM-Proben zuvor mit einer dünnen Kohlenstoffschicht bedampft werden, um die Leitfähigkeit zu optimieren (s. Abschnitt 4.6.3). Die ITO-Schicht unterhalb der Zellen reichte hier nicht, um die Ladungsträger abzutransportieren und damit Aufladung zu vermeiden. Die Tomografie wurde an einer *FEI Strata 400S* (FEI, USA) durchgeführt. Nach der Auswahl einer geeigneten Zelle mittels REM wurde die Probe um 52° gekippt, sodass der Ionenstrahl senkrecht auf die Probe traf, und in der Höhe angepasst, sodass beide Strahlen auf den selben Punkt fokussiert wurden. Die unter diesen Bedingungen erzeugten SE-Bilder lassen den Beobachter aus besagtem Winkel auf die Probe schauen.

Zunächst wurde der aus der aus Sicht des Betrachters vordere Teil der Zelle großflächig weggesputtert, um einen freien Blick auf die Zelle zu erhalten. Da die Zellen den mit 30 kV beschleunigten Ga^+ -Ionen kaum Widerstand entgegensetzten, reichte dafür ein Ionenstrom von lediglich 90 pA aus. Dann wurde im iSPI™ Verfahren von FEI sukzessiv mit dem Ga^+ -Ionenstrahl eine Schicht nach der anderen entfernt und nach jedem Schritt eine SE-REM-Aufnahme mit einer PE-Energie von 10 keV erstellt. Dabei musste die Schichtdicke geeignet gewählt werden. Um nicht versehentlich ganze Partikel auf einmal undetektiert zu entfernen, wurde stets eine Schichtdicke gewählt, die $1/4$ bzw. $1/5$ des jeweiligen Partikeldurchmessers betrug, sodass Partikel höchstens angeschnitten wurden und in mehreren aufeinanderfolgenden Bildern erschienen.

4.4 Datenauswertung

4.4.1 Quantifizierung von Partikel-Flächendichten

Die Auswertung der SE-Aufnahmen zur Bestimmung der Partikel-Flächendichten wurde mit Hilfe einer semi-automatischen Zählsoftware, geschrieben in Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, USA), vollzogen. Entwickelt wurde das Programm am Institut für Biomedizinische Technik des KIT durch Michael Simon und Gunnar Seemann. Es verfügt über eine grafische Oberfläche, diverse Methoden zur Subtraktion des Hintergrundes und zur Unschärfereduktion sowie zwei verschiedene Zählalgorithmen: der erste basiert auf Template-basierter Kreuzkorrelation und der zweite ist ein Connected-Component-Labeling Algorithmus. Für weitere Details bezüglich der Algorithmen sei auf die Masterarbeit von Michael Simon verwiesen [125].

Abbildung 4.5 zeigt beispielhaft das Ergebnis der automatischen Analyse einer REM-Aufnahme eines interzellulären Bereiches. Detektierte Partikel werden im analysierten Bild durch farbliche Kreise hervorgehoben, was eine visuelle Überprüfung der Ergebnisse erlaubt. Grün steht dabei für eine dem Programm nach sichere Detektion, rot für eine unsichere Erkennung. Falsch positive erkannte Elemente oder nicht identifizierte Partikel können manuell durch Mausklicks entfernt oder hinzugefügt werden. Die Software berechnet automatisch die Flächendichte basierend auf der Anzahl detektierter Partikel und der Größe des Bildes, ermittelt aus der Pixelgröße und deren Anzahl (enthalten in den Metadaten der REM-Aufnahmen). Nach der Quantifizierung aller Bilder einer Serie wurde der arithmetische Mittelwert und die statistische Standardabweichung berechnet.

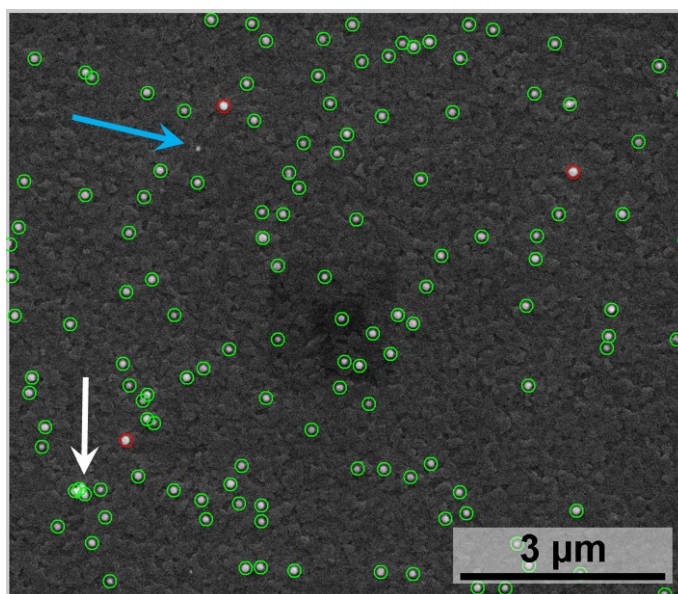


Abbildung 4.5. Beispiel eines automatisch ausgewerteten SE-REM-Bildes eines interzellulären Bereiches mit 100 nm SiO_2 -Partikeln (weiße Punkte) vor ITO-Hintergrund (grau). Die automatisch gezählten Partikel werden durch grüne (sichere Detektion) und rote (unsichere Detektion) Kreise markiert. Blauer Pfeil deutet auf ein nicht identifiziertes NP, weißer Pfeil zeigt ein kleines Agglomerat an.

4.4.2 Messung des NP-Kontrastes auf ITO-Substraten

Der Kontrast eines Nanopartikels C ist gegeben durch:

$$C = \frac{I_{NP} - I_{Sub}}{I_{Sub} - I_{schwarz}} \quad (4.1)$$

wobei I_{NP} die Bildintensität des NPs, I_{Sub} die des Hintergrundes und $I_{schwarz}$ der Schwarzwert der verwendeten Detektoreinstellung ist. Zur Bestimmung der benötigten Werte wurden die Bilder mit ImageJ analysiert. Hierzu mussten zunächst Ausreißer, das heißt Pixel mit unverhältnismäßig hohem oder niedrigem Grauwert, entfernt werden, da ansonsten die Fehler bei der Bestimmung der mittleren Intensitäten sehr groß ausfallen. ImageJ verfügt über einen entsprechenden Filter „Remove Outliers“, welcher jedes Pixel mit dem Median der umgebenden Pixel vergleicht. Ist die Abweichung größer als ein festgelegter Schwellenwert, so wird der Grauwert des Pixel mit dem Median der umgebenden Pixel ersetzt. Die hier verwendeten Parameter wurden wie folgt gesetzt: pixels = 7, threshold = 2000.

Anschließend wurde ein Kreis von ca. 40 bis 50 nm ausgewählt, mittig auf abgebildete NP platziert und der mittlere Grauwert I_{NP} jedes einzelnen NP gemessen. I_{Sub} wurde durch die Mittelung von 10 möglichst großen, partikelfreien Flächen bestimmt und $I_{schwarz}$ durch die Bestimmung des mittleren Grauwerts eines Bildes mit ausgeblendetem Elektronenstrahl. Mit den so bestimmten Werten konnte der Kontrast jedes Partikels C_i nach Formel 4.1 berechnet werden und schließlich auch der mittlere Kontrast \bar{C} durch Mittelung aller C_i . Pro Bild wurden die Kontraste von 20 NP bestimmt und gemittelt und die Standardabweichung ermittelt.

4.5 Computersimulationen / Modellierung

4.5.1 Monte-Carlo-Simulation – eNISTMonte

Alle Monte-Carlo-Simulationen des BSE-Kontrastes von NP wurden mit einer modifizierten Version von NISTMonte [126], genannt *eNISTMonte*, durchgeführt. Die Modifizierungen wurden eingefügt, um den Einfluss des Halbleiterdetektors auf die gemessene BSE-Intensität zu beschreiben. Entscheidend ist, dass Halbleiterdetektoren nicht einzelne Elektronen zählen, sondern die Anzahl im Detektor erzeugter Elektron-Loch-Paare, weshalb die gemessene Intensität im Bild proportional zur BSE-Energie ist (s. Kapitel 3.3.4). Da BSE unterschiedliche Energien haben und damit unterschiedlich viele Elektron-Loch-Paare erzeugen, müssen in MC-Simulationen auch die Austrittsenergien ausgegeben werden, um die gemessenen Intensitäten reproduzieren zu können. Wie in Abschnitt 3.4 bereits erwähnt, ist in MC-Simulationen die Berechnung des Energieverlustes in Form der *Continuous-Slowing-Down Approximation* gängige Praxis. In NISTMonte wird die Variante nach Joy und Luo [116] verwendet (s. Kapitel 3.3.2). Jedoch werden die Energiewerte üblicherweise nicht weiter verwertet.

In eNISTMonte dagegen werden alle BSE nach ihren Streuwinkeln in Winkelsegmente sortiert und die akkumulierte Elektronenenergie pro Segment registriert. Nun kann, je nach dem vom Detektor abgedeckten Winkelbereich, die Summe der Energien in den entsprechenden Winkelsegmenten gebildet werden. Da die Anzahl der im Detektor erzeugten Elektron-Loch-Paare und damit der gemessene Grauwert proportional zu der gesamten Energie der BSE ist, kann der Partikelkontrast wie folgt berechnet werden:

$$C = \frac{E_P - E_{Sub}}{E_{Sub}} \quad (4.2)$$

wobei E_P die berechnete BSE-Gesamtenergie ausgehend von einem Partikel ist, welches auf dem Substrat platziert wird, und E_{Sub} die BSE-Gesamtenergie vom Substrat allein ist.

Eine weitere Modifizierung behandelt die Effizienz, mit der Elektronen die Schutzschicht eines Halbleiterdetektors basierend auf einer Schottky-Diode durchdringen können. Dabei handelt es sich nicht um die charge-collection efficiency ϵ_c , welche prinzipiell angibt, wie effektiv der Detektor im Aufsaugen der im Halbleiter erzeugten Elektron-Loch-Paare ist (vgl. Kapitel 3.3.4). Aufgrund der metallischen Beschichtung zum Schutz der Detektoroberfläche sinkt die Transmissionseffizienz mit abnehmender BSE-Energie, da die Elektronen in dieser Schutzschicht zusätzliche unelastische Streuung und damit einen zusätzlichen Energieverlust erfahren, bevor sie das eigentliche Detektormaterial erreichen. BSE mit geringer Energie werden sogar mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit in der Schutzschicht gänzlich absorbiert. Im Gegensatz zur theoretischen Betrachtung der Halbleiterdetektoren, bei der der Schwellenwert E_{th} eine abrupte Detektionsgrenze darstellt, unterhalb derer kein Elektron den Halbleiter erreichen kann (vgl. Abbildung 3.16a), wurde hier der Ansatz einer linear abnehmenden Transmissionswahrscheinlichkeit der Elektronen $T_{Trans} = \frac{E_{BSE}}{E_{th}}$ für BSE-Energien E_{BSE} unterhalb des Schwellenwertes E_{th} verfolgt. Für $E_{BSE} \geq E_{th}$ ist die Transmission dagegen konstant 100%.

Abbildung 4.6 zeigt schematisch den Verlauf der beschriebenen Detektorcharakteristik in Abhängigkeit von E_{BSE} . Dabei wurde basierend auf Messungen eine Schwellenenergie E_{th} von 3 keV angenommen. Diese Charakteristik kann verwendet werden, um eine Energiekorrektur der in eNISTMonte berechneten BSE-Energien vorzunehmen. Durch Integration der Kurve in Abbildung 4.6 von 0 bis E_{BSE} erhält man die tatsächlich transmittierte Energie E_{Trans} , wobei man die Fälle

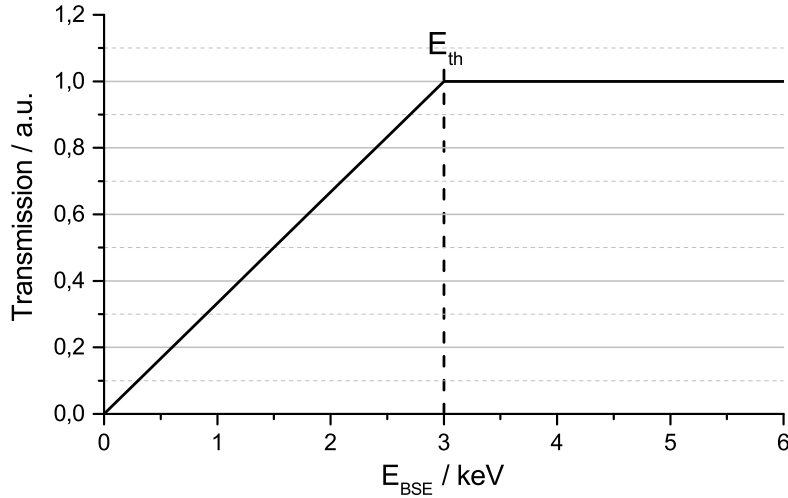


Abbildung 4.6. Grafische Darstellung der durch die Schutzschicht transmittierten Elektronen bei einem Halbleiterdetektor. E_{th} gibt BSE-Energie an, ab der Elektronen mit 100 % Wahrscheinlichkeit in den Detektor gelangen.

$E_{BSE} < E_{th}$ (Gleichung 4.3a) und $E_{BSE} \geq E_{th}$ (Gleichung 4.3b) unterscheiden muss:

$$E_{trans} = \int_0^{E_{BSE}} \frac{E}{E_{th}} dE = \frac{E_{BSE}^2}{2E_{th}} \quad \text{für } E_{BSE} < E_{th} \quad (4.3a)$$

$$E_{trans} = \int_0^{E_{th}} \frac{E}{E_{th}} dE + \int_{E_{th}}^{E_{BSE}} dE = E_{BSE} - \frac{1}{2}E_{th} \quad \text{für } E_{BSE} \geq E_{th} \quad (4.3b)$$

Bei der Aufsummierung der Energien in den Winkelsegmenten musste eine weitere Korrektur berücksichtigt werden. Aufgrund der Positionierung des BSE-Detektors zentral unterhalb des Polschuhs, ist der für die Summation benötigte Winkelbereich abhängig von dem eingestellten Arbeitsabstand (engl. working distance, WD). Die am Mikroskop eingestellte WD ist jedoch gegeben durch die Distanz zwischen Probe und Polschuh. Um den korrekten minimalen und maximalen Detektionswinkel zu erhalten, muss bei der Berechnung die Dicke des Detektors von 2,15 mm vom nominellen Arbeitsabstand subtrahiert werden. Der innere Durchmesser des verwendeten Detektors beträgt 2,96 mm, der äußere 8,53 mm, was eine effektive Fläche von etwa 200 mm² entspricht. Bei der kleinsten in dieser Arbeit verwendeten WD von 4 mm ergibt das einen detektierbaren Winkelbereich von 1,78 rad - 2,13 rad. Ein Arbeitsabstand von nominell 12 mm entspricht einem Winkelbereich von 2,43 rad - 2,85 rad. Der Streuwinkel θ ist relativ zur Einfallsrichtung der PE definiert, d.h. $\theta = 0$ rad entspricht Vorwärtstreueung, während $\theta = \pi$ rad für Rückstreueung senkrecht zur nicht gekippten Oberfläche steht.

Um die Kontraste von Partikeln auf ITO-Substraten zu simulieren, mussten in eNISTMonte zwei verschiedene geometrische Modelle konstruiert werden. Zur Bestimmung von E_{Sub} wurden massive Substrate aus amorphem SiO₂ (Glas) bzw. amorphem Glaskohlenstoff mit einer 160 nm bzw. 22 nm dicken ITO-Schicht versehen. Für E_P wurde auf diese Substrate zusätzlich ein SiO₂-NP von 90 nm Durchmesser (entspricht dem mittlerer Trockendurchmesser der nominell 100 nm großen Partikel, vgl. Kapitel 5.1) platziert, welches mittig vom simulierten Elektronenstrahl getroffen wurde. Abbildung 4.7 zeigt den Aufbau eines solchen MC-Experimentes mit Nanopartikel und die berechneten Trajektorien von 100 Elektronen.

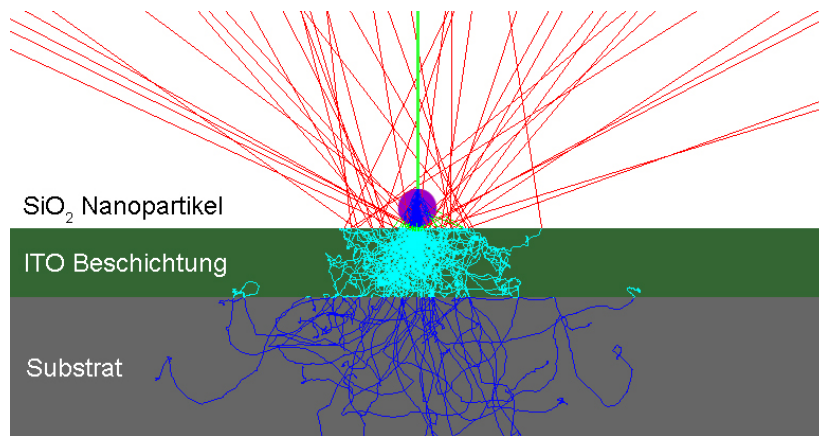


Abbildung 4.7. Schematische Darstellung einer MC-Simulation. Sie zeigt ein 90 nm NP, platziert auf einem mit 160 nm ITO-beschichtetem Glassubstrat. Grüne Strahlen repräsentieren Primärelektronen bzw. transmittierte Elektronen, blaue und hellblaue Linien geben Pfade von Elektronen im Material wieder, und rote Linien entsprechen Rückstreuелеktronen.

Tabelle 4.1. Zusammenfassung der in MC-Simulationen verwendeten Materialparameter.

	Silika (NP)	ITO (160 nm)	ITO (22 nm)	Glas (Substrat)	Kohlenstoff (Substrat)
Stöchiometrie	SiO ₂	In ₁₀ SnO ₁₁	In ₇ SnO ₁₂	SiO ₂	C
mittlere Ordnungszahl \bar{Z}	10	28,5	24,5	10	6
mittlere Atommasse	20	65,6	55,7	20	12
Dichte (g/cm ³)	2,2	7,1	5	2,2	1,3

Die verwendeten Materialparameter sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die gelistete SiO₂-Dichte von 2,2 g/cm³ entspricht gängigen Literaturangaben für kolloidale, amorphe Silika-Partikel [7, 127]. Darüber hinaus wurden folgende Parameter in den MC-Simulationen verwendet:

- je 10⁶ simulierte Elektronen
- Gaußförmiger Primärelektronenstrahl mit Halbwertsbreite von 1 nm
- PE-Energien von 2 keV bis 17 keV
- Screened-Rutherford (ScR) [128] und Czyżewski (Cz) Mott [113] Wirkungsquerschnitte

Zur Fehlerabschätzung der berechneten Kontraste wurden ergänzende Simulationen durchgeführt, in denen je nur ein Parameter auf Basis der dem Parameter zugrundeliegenden Unsicherheit variiert wurde. Zum Beispiel wurde die Unsicherheit der SiO₂-Dichte mit $\pm 0,2$ g/cm³ abgeschätzt, weshalb Simulationen mit sowohl erhöhter als auch verringerter Dichte durchgeführt wurden. Durch Subtraktion der sich so ergebenden Kontrastwerte vom mittleren berechneten Kontrast konnte der Einzelfehler des Kontrastes in Bezug auf die Unsicherheit der SiO₂-Dichte bestimmt werden. Der gesamte Fehler des simulierten Kontrastes wurde folglich mittels Gauß'scher Fehlerfortpflanzung aller Einzelfehler berechnet. Die Variation der übrigen Parameter betrug $\pm 0,5$ g/cm³ (ITO-Dichte),

± 8 nm (NP-Durchmesser), und ± 5 nm (ITO-Schichtdicke). Aufgrund der hohen Anzahl von simulierten Elektronen lag der statistische Fehler bei 0,1 % (poissonverteilt), weshalb er vernachlässigt werden konnte.

4.5.2 Berechnung der Deposition von SiO₂-Nanopartikeln *in-vitro* mit ISDD

Die in dieser Arbeit verwendete Version von ISDD ist eine Weiterentwicklung namens ISDD+ von Michael Simon [125] (Version 3.0). Sie beinhaltet einige Optimierungen, eine verbesserte Ausgabe sowie eine grafische Oberfläche. Unter anderem besteht die Möglichkeit bis zu fünf verschiedene Strukturen (einzelne Partikel verschiedener Größe oder Agglomerate) gleichzeitig zu simulieren, jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit stets monodisperse, nicht agglomerierende Partikel angenommen. Ferner wurde eine simple Implementierung der Proteinkorona vorgenommen. Allerdings hat diese aufgrund ihrer geringen Dicke keinen nennenswerten Einfluss auf die simulierte Deposition von Partikeln > 70 nm, weshalb sie vernachlässigt wird.

ISDD+ erfordert die Eingabe einiger experimenteller Parameter über die grafische Oberfläche, wie u.a. die Eingabekonzentration, die Expositionszeit und den hydrodynamischen Partikeldurchmesser. Dieser gibt die effektive Größe von Partikeln in einer Suspension an und ist meist deutlich größer als der Trockendurchmesser (vgl. Kapitel 5.1). Befindet sich ein geladenes Teilchen in einem Medium, lagern sich auf seiner Oberfläche Ionen des Mediums fest an, die sogenannte Helmholtz-Schicht. Darüber hinaus lagern sich weitere Ionen diffus gebunden an die feste Schicht an. Bei der Bewegung im Suspensionsmedium muss das Partikel diese Hülle mitführen. Es erscheint also größer als es wirklich ist, was folglich den Diffusions- und Sedimentationsprozess beeinflusst.

In Tabelle 4.2 sind die verwendeten Parameter zusammengefasst. Hier wurde abweichend von MC-Simulationen als SiO₂-Dichte die Herstellerangabe von 2,0 g/cm³ verwendet, aber ein Test ergab, dass es keine relevanten Auswirkungen auf die Ergebnisse hat. Als hydrodynamischer Durchmesser werden Zahlenwerte verwendet, die auf in H₂O durchgeführten DLS Messungen basieren (s. Kapitel 5.1). Als Resultat eines Simulationslaufs erhält man neben dem Bruchteil deponierter Partikel (in %) auch deren absolute Anzahl und die resultierende Flächendichte (in 1/μm²).

Tabelle 4.2. Zusammenfassung verwendeter Eingabeparameter für ISDD.

Parameter	Wert	Einheit
Partikeldichte	2,0	g/cm ³
Hydrodynamische Durchmesser	122 / 198 / 501	nm
Eingabekonzentration	variabel	μg/mL
<i>well</i> -Fläche	9,62113	cm ²
Temperatur	37,0	°C
Volumen Medium	3,0	mL
Dauer Exposition	1,0 / 4,0	h
Viskosität Medium	0,00074	Pa s
Dichte Medium	1,0	g/cm ³

4.5.3 Berechnung der Deposition von SiO₂-Nanopartikeln *in-vitro* mit dem DG-Modell

Da das DG-Modell über keine grafische Oberfläche verfügt, müssen hier sämtliche relevanten Parameter direkt im Programmcode übergeben werden. Eine tabellarische Auflistung aller benötigten

Werte findet sich im Anhang A.3. Neben einigen zusätzlichen Parametern werden großteils die gleichen wie bei ISDD (vgl. Tabelle 4.2) verwendet (ggf. in einer anderen Einheit). Einzig die *well*-Fläche und das Volumen des Mediums wird durch die Höhe des Mediums im *well* ersetzt. Es ist ferner möglich, Größenverteilungen in Form von Arrays zu übergeben, jedoch wurde in dieser Arbeit auch beim DG-Modell von monodispersen, nicht agglomerierenden Partikeln ausgegangen. Bei aktivierter *stickiness* (entsprechender Parameter = 1 gesetzt) wurde ein K_D Wert von 10^{-9} mol/L verwendet; entsprechende Simulationen werden im Folgenden als *sticky* bezeichnet. Berechnungen mit *non-sticky* Randbedingungen wurden dagegen mit deaktivierter *stickiness* (Parameter = 0) durchgeführt und werden entsprechend benannt.

Die Ergebnisse eines Durchlaufs werden in einer Excel-Datei mit mehreren Tabellen gespeichert. In jeder werden die einzelnen Ausgabegrößen (u.a. Masse, Partikelanzahl, Partikeloberfläche, bezogen jeweils auf Einheitsvolumen oder Einheitsfläche) orts- und zeitaufgelöst tabellarisiert. Eine weitere Tabelle fasst die Werte aller Größen am Boden, d.h. im untersten Segment, zeitaufgelöst zusammen. In der vorliegenden Arbeit war in der Regel lediglich die Anzahl der Partikel pro Fläche am Boden am Ende der Simulationsdauer von Interesse.

4.6 Sonstige verwendete Methoden

4.6.1 Größenbestimmung der SiO_2 -Partikel mittels Rasterelektronenmikroskopie

Der tatsächliche Durchmesser von Partikeln kann deutlich von der nominellen Herstellerangabe abweichen, weshalb er mittels REM bestimmt wurde. Hierzu wurden SE-Aufnahmen von SiO_2 -Partikeln auf ITO-Substraten erstellt und mittels ImageJ analysiert. Um eine ausreichend hohe Messgenauigkeit zu gewährleisten, wurde die Vergrößerung an den jeweiligen Partikeltyp angepasst. Die Durchmesser von 20 Partikeln wurden so gemessen und arithmetisch gemittelt.

4.6.2 Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des ζ -Potentials der SiO_2 -Partikel mittels dynamischer Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ermöglicht es hydrodynamische Durchmesser von Partikeln in Flüssigkeiten zu bestimmen [129]. Das Prinzip beruht auf Rayleigh-Streuung. Das bedeutet, dass Licht von kleinen Partikeln in alle Richtungen gestreut wird. Aufgrund der Brownschen Bewegung der Partikel in der Flüssigkeit variiert die Streuintensität jedoch zeitlich und damit variiert ebenfalls die Intensität der konstruktiven bzw. destruktiven Interferenz zwischen dem Streulicht verschiedener Partikel. Je kleiner die Partikel, desto stärker ist die Brownsche Bewegung und entsprechend größer ist die zeitliche Fluktuation der Intensität, welche von einem Detektor gemessen wird. Aus ihr wird mittels Autokorrelationsfunktion z.B. der Diffusionskoeffizient D bestimmt, mit dessen Hilfe man aus der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 3.7) den hydrodynamischen Durchmesser berechnen kann.

Ferner lässt sich das ζ -Potential von Partikeln in Suspension bestimmen. Das ζ -Potential ist das elektrische Potential von bewegten, geladenen Partikeln in Suspension. Befindet sich ein geladenes Partikel in Suspension in Ruhe, erscheint es nach außen hin neutral aufgrund der fest gebundenen Helmholtz-Schicht aus Ionen des Mediums und weiterer diffus gebundener Ionen. Bewegt es sich jedoch, so wird ein Teil der diffusen Schicht durch Reibung abgeschert und das Partikel erscheint geladen. Das resultierende Potential kann gemessen werden und kann als Maß für die Ladung von Partikeln in Suspension angesehen werden.

Im vorliegenden Fall wurde ein Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, USA) zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers (sowohl in Wasser als auch in DMEM + FBS) und des ζ -Potentials der drei in dieser Arbeit verwendeten Partikelklassen verwendet. Hierzu wurden aus den Standard-Suspensionen für Depositionsexperimente relevante Verdünnungen ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) erstellt und zum einen direkt gemessen (0 h Messung bei RT), zum anderen zunächst bei 37°C für 4 h bzw. 24 h ruhen gelassen und im Anschluss gemessen. Zur Messung mussten die Proben in Zeta-Küvetten überführt werden. Die Untersuchungen wurden am ITG, Campus Nord des KIT von Dr. Susanne Fritsch-Decker durchgeführt.

4.6.3 Physikalische Gasphasenabscheidung

Zur Beschichtung von Proben, um deren elektrische Leitfähigkeit zu verbessern, sowie zur Deposition von ITO-Schichten auf amorphen Kohlenstoffsubstraten wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Verfahren der physikalische Gasphasenabscheidung (engl. physical vapor deposition, PVD) verwendet.

Elektronenstrahlverdampfung

Bei der Elektronenstrahlverdampfung wird das zu deponierende Material unter Hochvakuum durch Bestrahlung mit hochenergetischen Elektronen in die Gasphase überführt. Dabei kann das zu beschichtende Objekt erhitzt oder gekühlt werden, um die Schichtqualität zu verbessern und das Objekt zu schützen. Die Atome in der Gasphase kondensieren schließlich auf allen Oberflächen, die in ihrer Flugbahn liegen, u.a. auf dem zu beschichtendem Objekt. Für Untersuchungen des Rückstreuielektronenkontrastes wurden in einer Lesker PVD75 (Kurt J. Lesker Company, Hastings, UK) amorphe Kohlenstoffsubstrate (Glaskohlenstoff, HTW, Thierhaupten, Deutschland) mit einer dünnen ITO-Schicht versehen. Bei einem Arbeitsdruck von 2×10^{-5} mbar wurden die auf 200°C aufgeheizten Substrate mit einer Rate von $0,35 \text{ \AA}/\text{s}$ beschichtet. Zum Ausheilen der Schicht wurden die Substrate anschließend in einem Hochtemperaturofen bei 360°C ausgelagert.

Thermisches Verdampfen

Beim thermischen Verdampfen wird unter Hochvakuum das zu verdampfende Material durch eine elektrische Heizung stark erhitzt, wodurch sich entstehender Materialdampf auf das Zielobjekt niederschlagen kann. Am LEM steht hierzu ein Kohlenstoffbeschichter PD 170AZw (Leybold-Heraeus, Köln, Deutschland) zur Verfügung, in dem durch einen dünnen Kohlenstoffaden Strom geleitet wird. Aufgrund des elektrischen Widerstands heizt sich der Faden auf und verdampft. Mit dieser Technik wurden in dieser Arbeit vereinzelt Proben mit einem wenige Nanometer dicken Kohlenstofffilm beschichtet, um die Leitfähigkeit der Proben für FIB-Tomografie-Untersuchungen zu erhöhen.

Kapitel 5

In-vitro-Deposition von SiO₂-Nanopartikeln

Zur Untersuchung des Depositionsverhaltens von SiO₂-Partikeln mit Größen zwischen 100 und 500 nm auf A549-Zellen wurden Depositionsexperimente in Abhängigkeit von der Expositionsdauer durchgeführt. Während in den hier betrachteten Zeiträumen von maximal 4 h das Verhalten von 100 nm großen Partikeln überwiegend durch Diffusion bestimmt wird, dominiert bei den größeren Partikeln die Sedimentation (vgl. Abbildung 3.3). In Abschnitt 5.1 werden zunächst die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Partikelcharakterisierung präsentiert. Kapitel 5.2 beschäftigt sich mit der Wirkung von Substratbeschichtungen auf die Deposition und deren experimentellen Untersuchung. In Kapitel 5.3 werden die experimentellen Ergebnisse mit Simulationen verglichen. In Abschnitt 5.4 wird die Rolle von fötalem Rinderserum auf die Deposition dargestellt. Um eine mögliche Verfälschung der gemessenen Flächendichten von Partikeln auf Zelloberflächen durch Inkorporation von Partikeln in die Zellen auszuschließen, wurde die Partikelaufnahme durch Zellen ebenfalls experimentell untersucht (Kapitel 5.5). Schließlich wird in Abschnitt 5.6 die Nutzbarkeit von ESEM für Depositionsuntersuchungen dargestellt.

5.1 Eigenschaften der SiO₂-Partikel

Tabelle 5.1. Zusammenfassung der gemessenen Partikeleigenschaften: Trockendurchmesser (d_{REM}), hydrodynamischer Durchmesser (d_{DLS}) in DMEM + FBS (CCM) und Wasser nach 0 h, sowie ζ -Potential.

SiO ₂ -Partikel	d_{REM} / nm	d_{DLS} / nm		ζ -Potential / mV
		(CCM)	(H ₂ O)	
100 nm NP	90 ± 8	173 ± 5	112 ± 2	-29 ± 1
200 nm SMP	188 ± 12	251 ± 6	188 ± 3	-22 ± 1
500 nm SMP	437 ± 23	532 ± 70	491 ± 17	-40 ± 1

In Tabelle 5.1 sind die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung zusammengefasst. Es fällt auf, dass die im Rasterelektronenmikroskop trocken gemessenen Durchmesser d_{REM} aller Partikel im Mittel kleiner sind als vom Hersteller angegeben. DLS-Messungen in CCM sowie in H₂O zeigten nach 0 h keine Agglomeration (vgl. Abbildungen A.4.1a,b im Anhang). Frühere Arbeiten mit diesen Partikeln haben gezeigt, dass auch noch nach 24 h stabile Größenverteilungen in den Suspensionen vorliegen [130]. Auch die Erfahrungen aus den durchgeführten Depositionsexperimenten zeigen keine gegenteiligen Anzeichen. Das negative ζ -Potential aller drei Partikelklassen zeugt von einer

deutlich negativen Ladung der Partikel in Suspension, was sich unterstützend auf die Stabilität der Suspensionen auswirkt.

Besonders auffallend sind jedoch die deutlich größeren, mittels DLS in CCM gemessenen hydrodynamischen Durchmesser d_{DLS} . Sie sind jeweils 85, 63 bzw. 95 nm größer als die Trockendurchmesser d_{REM} . Nienhaus et al. [131] haben jedoch gezeigt, dass die Schichtdicke der gängigsten, an NP-Oberflächen adsorbierten Proteine lediglich zwischen 3 und 7 nm beträgt. Folglich ist davon auszugehen, dass die Proteinkorona der in DMEM + FCS suspendierten Silika-Partikel den Partikeldurchmesser um etwa das Doppelte der Proteinelänge vergrößert. Einen weiteren Beitrag zum hydrodynamischen Durchmesser liefert die sich bildende elektrochemische Doppelschicht, welche anhand der Debye Länge in DMEM abgeschätzt werden kann:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{2 N_A e^2 I}} \quad (5.1)$$

Bei einer Ionenstärke I von $0,13 \text{ mol/L}$ ergibt sich damit eine Schichtdicke von lediglich ca. 1 nm [132]. Folglich lässt sich davon ausgehen, dass der hydrodynamische Durchmesser der Silika-Partikel in CCM ca. 12 nm größer sein muss als der Trockendurchmesser (angenommen die Proteinkorona ist im Mittel 5 nm dick).

Eine mögliche Erklärung für die zu großen d_{DLS} -Werte wären kleine Agglomerate von zwei bis drei Partikeln, jedoch zeigte die Analyse von REM-Aufnahmen deponierter Partikel, dass gut 90 % aller deponierten 100 und 200 nm Partikel Einzelpartikel sind. Daraus lässt sich folgern, dass die Partikelsuspensionen zum Großteil monodispers sein müssen und die unrealistischen hydrodynamischen Durchmesser der erheblichen Ungenauigkeit von DLS-Messungen in CCM geschuldet sind.

Im Fall der 500 nm Partikel sind nur gut 60 % der deponierten Objekte einzelne Partikel. Die übrigen 40 % setzen sich aus Dimern, Trimern und größeren Agglomeraten zusammen. Sollten diese Agglomerate aber bereits in der Suspension vorliegen, müsste in den Intensitäts-basierten DLS-Messungen ein ausgeprägter Peak in der Größenordnung zwischen 1 und $2 \mu\text{m}$ vorzufinden sein. Grund ist die starke Empfindlichkeit Intensitäts-basierter DLS-Messungen bezüglich der Größe von Objekte, die mit der sechsten Potenz skaliert, was bedeutet, dass die vermeintlichen Agglomerate mindestens 64 mal so stark das Licht streuen müssten wie Einzelpartikel. Da kein derartiger Peak beobachtet wird, sondern nur ein vergleichsweise breiter Peak im Bereich von 530 nm (vgl. Abbildung A.4.1a im Anhang), lässt sich daher für die 500 nm Partikel die gleiche Schlussfolgerung ziehen wie für die kleineren Partikel: die verwendeten Suspensionen sind monodispers und die beobachteten kleinen Agglomerate entstehen erst nach der Deposition auf der Substratoberfläche.

Entgegen den Messungen in CCM ergeben DLS-Messungen in H_2O deutlich nachvollziehbarere Ergebnisse (vgl. Tabelle 5.1 und Abbildung A.4.1b im Anhang). Zu Simulationenszwecken wurden für den hydrodynamischen Durchmesser daher diese d_{DLS} -Werte plus zweimal die durchschnittliche Dicke der Proteinkorona von 5 nm angenommen. Die Abweichungen von den theoretisch zu erwartenden Werten, d.h. $d_{\text{REM}} + 2 \times \text{Dicke Korona} + 2 \times \text{Debye Länge in DMEM}$, wurden zur Abschätzung der potentiellen Fehler berechneter Partikel-Flächendichten verwendet. Da aber im Falle der 200 nm Partikel d_{DLS} und d_{REM} identisch sind, wurde hier eine Ungenauigkeit von schätzungsweise 10 % angenommen. Details bezüglich der Fehlerberechnung werden in Kapitel 5.3.1 erläutert.

5.2 Quantifizierung der Deposition von SiO_2 -Nanopartikeln

Um die Deposition von SiO_2 -Partikeln auf A549-Zellen zu untersuchen, wurden unter verschiedenen Bedingungen *in-vitro*-Experimente durchgeführt und die resultierenden Flächendichten von

Partikeln auf der Oberfläche bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass A549-Zellen einen beachtlichen Einfluss auf das Depositionsverhalten haben.

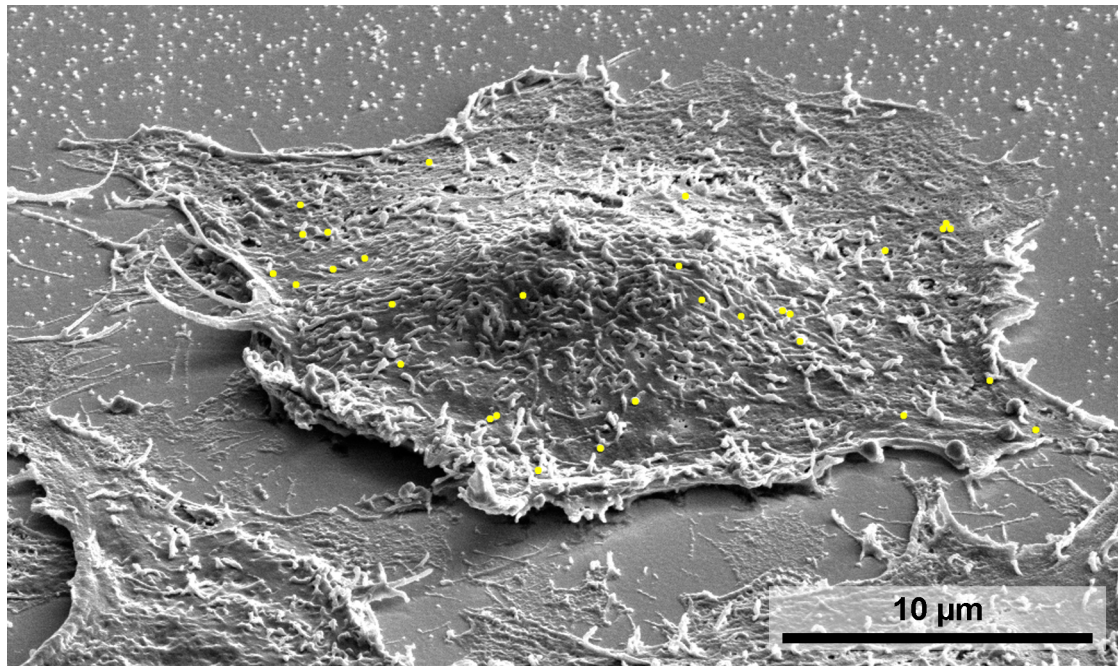


Abbildung 5.1. *Abbildung einer typischen A549-Zelle auf ITO-Substrat mit 100 nm SiO_2 -Partikeln. Der Betrachtungswinkel ist um 52° geneigt. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die Partikel auf der Zelloberfläche gelb hervorgehoben.*

Abbildung 5.1 zeigt beispielhaft eine SE Aufnahme einer dieser Zellen. Um eine bessere Vorstellung vom Aussehen der Zellen vermitteln zu können, wurde das Bild aus einer geneigten Perspektive aufgenommen. Sämtliche Aufnahmen zur Quantifizierung der effektiven Dosis wurden dagegen in Draufsicht erstellt. Im Topografiekontrast der SE Abbildung ist sehr gut die grobe, unebene Oberfläche der Zelle zu erkennen, die auch stets in den zur Quantifizierung verwendeten BSE Aufnahmen der Zelloberflächen zu erkennen ist. Sie wird durch zahlreiche Pseudopodien erzeugt. Pseudopodien sind füßchenförmige, längliche Plasmaausstülpungen der Zellmembran und treten in verschiedenen Formen auf. In der Mitte der Zelle ragt der Zellkern in die Höhe. Über die gesamte Zelle verteilt sind einzelne 100 nm große Silika-Partikel zu finden, welche zur besseren Sichtbarkeit im Bild gelb markiert wurden. Weitere Partikel sind auf dem die Zelle umgebenden freien ITO-Substrat zu erkennen (weiße Punkte). Im unteren Bereich des Bildes sind Ausläufer weiterer Zellen zu sehen. Hier fällt auf, dass in den freien Räumen zwischen den Zellen nahezu keine Partikel zu finden sind. Dies rührt von der natürlichen Bewegung der Zellen während des Experimentes her, durch die sie die deponierten Dosen in ihrer unmittelbaren Umgebung verfälschen. Aus diesem Grund werden interzelluläre Flächendichten in einigem Abstand zu Zellen gemessen.

5.2.1 Flächendichten von SiO_2 -Partikeln in Anwesenheit von A549-Zellen

Vergleicht man die Flächendichten auf Zelloberflächen (zellulärer Bereich) und auf freier Substratoberfläche zwischen den Zellen (interzellulärer Bereich), so fallen schnell Unterschiede auf. In Abbildung 5.2 werden repräsentative Aufnahmen interzellulärer Regionen (a,c,e) und entsprechender zellulärer Oberflächen (b,d,f) von drei verschiedenen Proben gegenübergestellt. In Abbildung 5.2a,b wurden 100 nm NP mit einer Eingabekonzentration von $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ verwendet, in Abbildung 5.2c,d

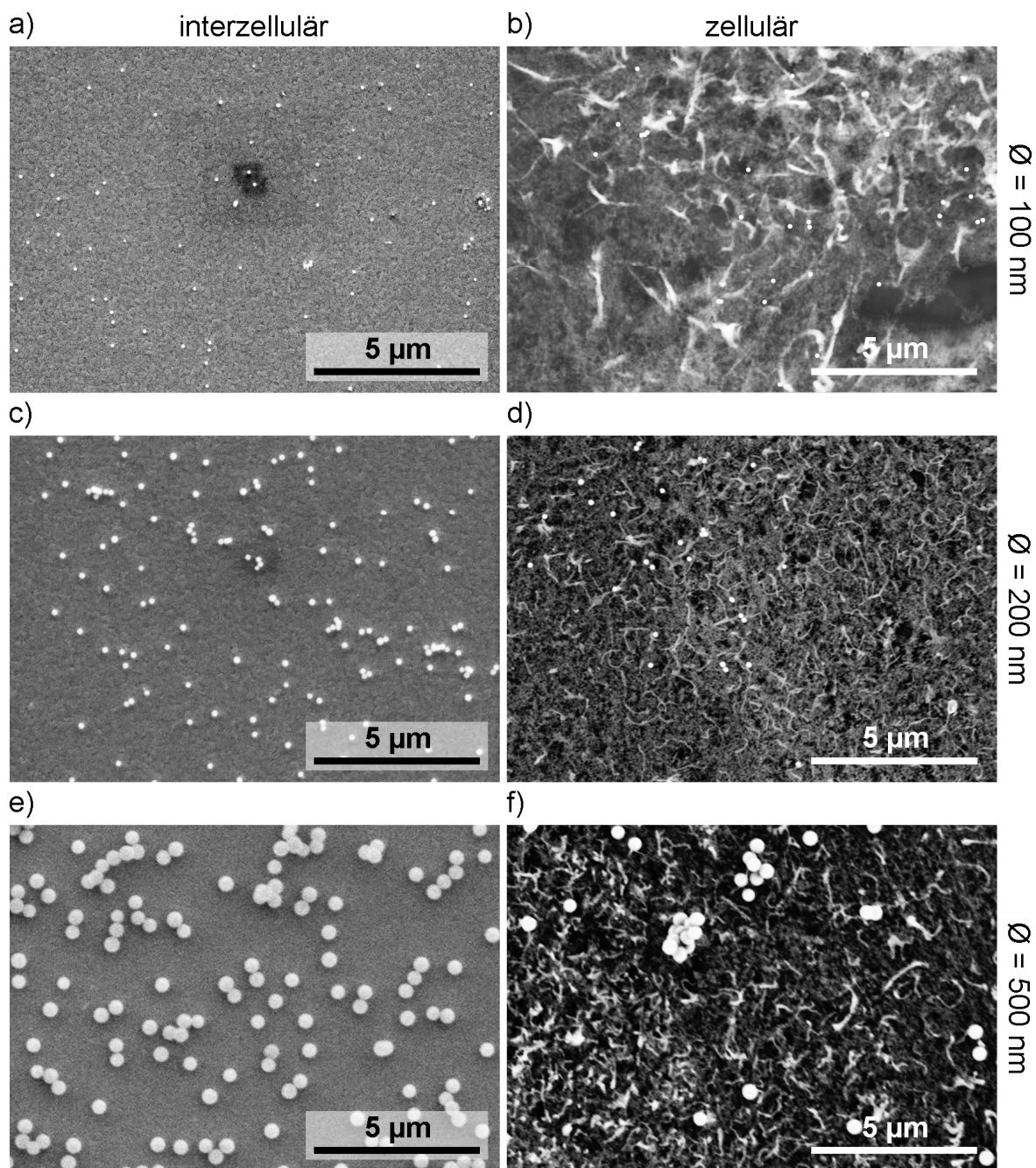


Abbildung 5.2. Repräsentative REM-Aufnahmen von interzellulär (a,c,e) und zellulär (b,d,f) gemessenen Flächendichten nach einstündiger Exposition von (a,b) 100 nm NP mit einer Eingabekonzentration von $7 \mu\text{g}/\text{mL}$, (c,d) 200 nm SMP mit $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Eingabekonzentration, und (e,f) 500 nm SMP mit $109 \mu\text{g}/\text{mL}$ Eingabekonzentration. (a,c,e) SE-REM-Bilder, aufgenommen mit 5 keV PE-Energie, (b,d,f) BSE-REM-Bilder aufgenommen mit 5 keV PE-Energie und 1,9 kV (b) bzw. 4 kV (d,f) Bremsspannung. Zu besserer Sichtbarkeit wurden Bildkontrast und Helligkeit angepasst.

200 nm SMP mit $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ und in Abbildung 5.2e,f 500 nm SMP mit $109 \mu\text{g}/\text{mL}$. Die Expositionsdauer betrug in allen Fällen eine Stunde. Es sind in allen Experimenten deutliche Unterschiede zwischen den Partikel-Flächendichten in zellulären und interzellulären Bereichen erkennbar. Ferner zeugen die Bilder von einer merklichen Inhomogenität der Flächendichten auf den Zellen verglichen mit relativ homogen verteilten Partikeln auf dem reinen Substrat. Besonders deutlich wird dies in

Abbildung 5.2d. Während im linken Bereich der abgebildeten Zelle zahlreiche Partikel vorzufinden sind, sind auf der rechten Seite kaum Partikel auszumachen.

Bei den BSE Bildern mit angelegter Bremsspannung wird auch deutlich, dass diese Technik den ungünstigen Nebeneffekt hat, die Topografie von zelleigenen Strukturen wie Pseudopodien zu verstärken. Je nach Form und Ausrichtung können diese Strukturen auch den Anschein von Partikeln erwecken, weshalb insbesondere bei den 100 nm NP mit Sorgfalt bei der Quantifizierung der Flächendichten vorgegangen werden muss.

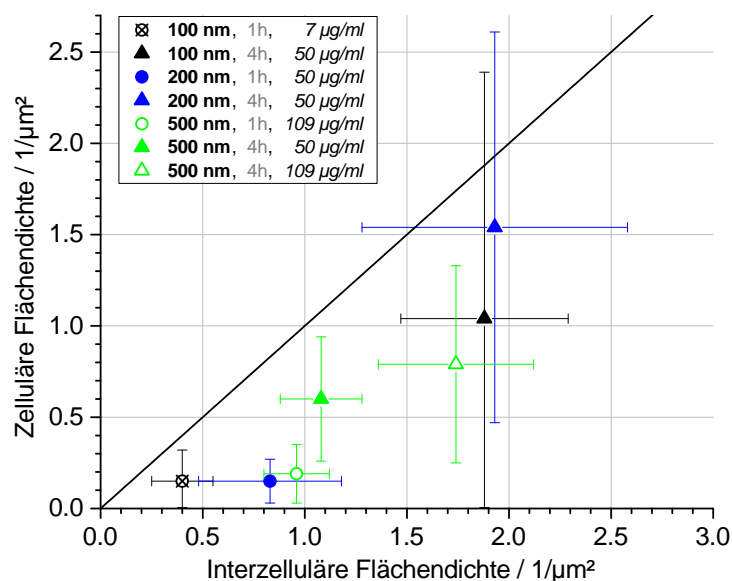


Abbildung 5.3. Vergleich von zellulär und interzellulär gemessenen Flächendichten aus Depositionsexperimenten mit 100 nm, 200 nm und 500 nm SiO_2 -Partikel. Expositionszeit bei verschiedenen Eingabekonzentrationen (s. Legende) betrug 1 h bzw. 4 h. Die diagonale Linie kennzeichnet eine Übereinstimmung von zellulären und interzellulären Werten.

In Abbildung 5.3 sind die Ergebnisse der Quantifizierung der Deposition grafisch aufbereitet. Dabei werden die durchschnittlich gemessenen zellulären Flächendichten den entsprechenden interzellulären Flächendichten gegenübergestellt. Schwarze Symbole entsprechen 100 nm NP, blaue Symbole 200 nm SMP und grüne Symbole 500 nm SMP. Versuche mit 1 h Expositionsdauer werden durch kreisrunde Symbole dargestellt, und Experimente mit 4 h Expositionsdauer durch dreieckige Symbole. Volle Symbole repräsentieren Eingabekonzentrationen von $50 \mu\text{g/ml}$, leere Symbole $109 \mu\text{g/ml}$ und gekreuzte Symbole $7 \mu\text{g/ml}$. Repräsentative Bilder zu den vierstündigen Versuchen finden sich in Abbildung A.5.1 im Anhang.

Wie bereits Abbildung 5.2 angedeutet hat, ist nun klar ersichtlich, dass die auf den Zellen gemessenen Flächendichten deutlich geringer ausfallen als im interzellulären Fall. Die diagonale schwarze Linie zeigt eine Übereinstimmung beider Größen an, und in allen gezeigten Fällen liegen die zellulären Werte deutlich unterhalb dieser Gerade. Zum Beispiel beträgt die interzelluläre Flächendichte im Fall von 100 nm NP nach 1 h Exposition durchschnittlich $0,4 \pm 0,15 \text{ 1}/\mu\text{m}^2$ (Abbildung 5.2a), wohingegen auf den Zellen nur $0,15 \pm 0,17 \text{ 1}/\mu\text{m}^2$ Partikel gefunden wurden (Abbildung 5.2b). Ferner fällt auf, dass die Messunsicherheiten verhältnismäßig groß sind, insbesondere bei einigen zellulären Messungen. Hintergrund sind starke globale Unterschiede der Flächendichten. Während die Partikel lokal relativ homogen verteilt sind, unterscheiden sie sich auf makroskopischer Skala einer Probe teils deutlich.

5.2.2 Zellulärer Einfluss auf die Deposition – zellfreie Experimente

Die mitunter starken Unterschiede zwischen zellulären und interzellulären Flächendichten lassen vermuten, dass die Zellen die deponierte Dosis beeinflussen. Konkret wird, basierend auf der Annahme eines präferenziellen Bindungsmechanismus über sogenannte „Dockingplätze“, davon ausgegangen, dass interzelluläre „Dockingplätze“ erst durch die Zellen selbst erzeugt werden. Dies wurde mittels zellfreien *in-vitro*-Experimenten bei unterschiedlicher Vorbeschichtung der Substratoberfläche untersucht. Auf die „Dockingplätze“-Hypothese wird im folgenden Abschnitt 5.2.3 detaillierter eingegangen.

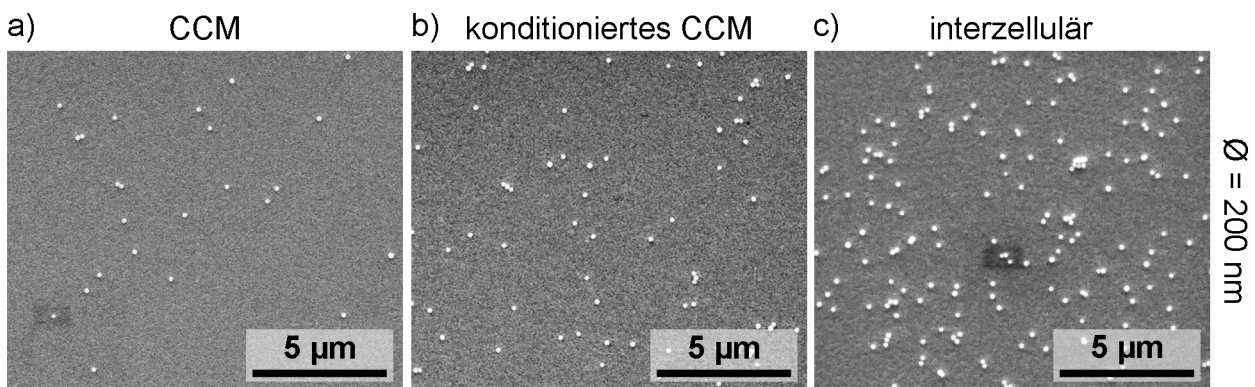


Abbildung 5.4. Repräsentative SE-REM-Aufnahmen von 200 nm SiO_2 -SMP auf Substraten mit unterschiedlicher Vorbeschichtung. a) Zellfreies Substrat, im Vorfeld der Deposition mit gewöhnlichem CCM vorbeschichtet. b) Zellfreies Substrat, vorbeschichtet mit konditioniertem CCM. c) Interzelluläre Fläche eines regulären *in-vitro*-Experimentes mit Zellen. Expositionsbedingungen in allen drei gezeigten Fällen identisch: $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Eingabekonzentration, 1 h Expositionsdauer. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

Abbildung 5.4 zeigt repräsentative SE-REM-Aufnahmen, die den Einfluss der Vorbeschichtungen auf die Flächendichten veranschaulichen. Gezeigt werden jeweils 200 nm Silika-Partikel nach einständiger Exposition bei $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Eingabekonzentration. In Abbildung 5.4a hat das zellfreie Substrat über Nacht eine Vorbeschichtung mit regulärem Zellkulturmedium erhalten. Beim zellfreien Substrat aus Abbildung 5.4b wurde das CCM durch in A549-Zellkulturen konditioniertes CCM ausgetauscht. Zu Vergleichszwecken ist in Abbildung 5.4c ein interzellulärer Bereich eines analogen *in-vitro*-Experimentes mit Zellen abgebildet. Bei Betrachtung der Aufnahmen stechen die außergewöhnlich geringen Flächendichten in den beiden zellfreien Experimenten ins Auge. Verglichen mit dem interzellulären Bereich in Abbildung 5.4c deponierte in Abbildung 5.4a und b nur ein Bruchteil der Partikel auf die Oberfläche. Ein genauerer Vergleich der beiden zellfreien Substrate zeigt, dass der Wechsel von gewöhnlichem CCM (a) zu konditioniertem CCM (b) eine leichte Erhöhung der Flächendichte mit sich bringt.

Die beschriebenen Beobachtungen bei 200 nm großen Partikeln treffen auch auf die anderen beiden Partikelgrößen zu. In Abbildung 5.5 sind in Analogie zu Abbildung 5.4 charakteristische Aufnahmen von 100 nm (a-c) und 500 nm Partikeln (d-f) aus zellfreien Versuchen bzw. zu Vergleichszwecken von interzellulären Bereichen gezeigt. Die Eingabekonzentrationen betragen $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ (100 nm) und $109 \mu\text{g}/\text{mL}$ (500 nm), die Expositionsdauer wie zuvor 1 h. Bei den kleineren Partikeln sind die Flächendichten so gering, dass visuell nur schwer ein Unterschied zwischen der CCM beschichteten Probe (Abbildung 5.5a) und der Probe, die mit konditioniertem CCM vorbeschichtet wurde (Abbildung 5.5b), feststellbar ist. Betrachtet man jedoch das Gesamtbild, so unterscheiden sich auch hier die durchschnittlichen Flächendichten, wobei das mit konditioniertem CCM vorbeschichtete

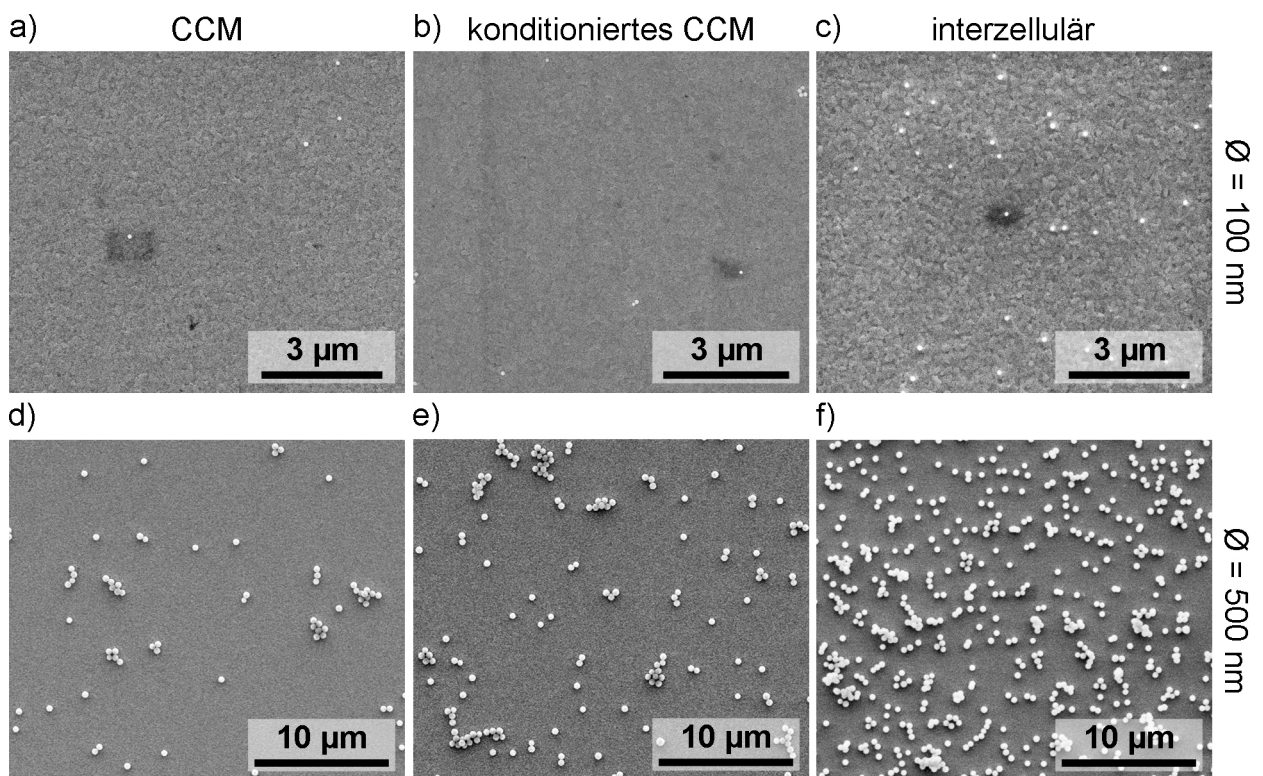


Abbildung 5.5. Repräsentative SE-REM-Aufnahmen von 100 nm SiO_2 -NP (a-c) und 500 nm SiO_2 -SMP (d-f) auf Substraten unterschiedlicher Vorbeschichtung nach 1 h Exposition. (a,d) Zellfreies Substrat, im Vorfeld der Deposition mit gewöhnlichem CCM vorbeschichtet. (b,e) Zellfreies Substrat, vorbeschichtet mit konditioniertem CCM. (c,f) Interzelluläre Fläche eines regulären in-vitro-Experimentes mit Zellen. Eingabekonzentration bei (a-c) $7 \mu\text{g}/\text{mL}$, bei (d-f) $109 \mu\text{g}/\text{mL}$. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

Substrat den etwas höheren Wert vorweisen kann. Die interzellulär, d.h. in Anwesenheit von Zellen, gemessenen Flächendichten sind aber auch hier sichtbar höher, wie Abbildung 5.5c anschaulich demonstriert.

Bei den größten Partikeln sind die Unterschiede wiederum deutlicher zu erkennen. Die geringste Flächendichte ist auf dem mit CCM vorbeschichteten Substrat zu finden (Abbildung 5.5d). Wird konditioniertes CCM zur Vorbeschichtung verwendet, erhöht sich auch hier die deponierte Menge Partikel merklich (Abbildung 5.5e). Die höchsten Partikeldichten werden bei Anwesenheit von Zellen in interzellulären Bereichen beobachtet (Abbildung 5.5f).

Abbildung 5.6 fasst die gemessenen Flächendichten der einstündigen Experimente in einem Balkendiagramm nach Partikelgröße sortiert zusammen. Neben den zellfreien Experimenten mit unterschiedlichen Vorbeschichtungen werden zum Vergleich auch die Ergebnisse der Standard-Experimente mit Zellen – sowohl interzelluläre als auch zelluläre Werte – abgebildet. In allen Fällen betragen die Eingabekonzentrationen $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ bei 100 nm Partikeln, $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ bei 200 nm Partikel und $109 \mu\text{g}/\text{mL}$ bei 500 nm Partikel. Die gezeigten Messwerte bestätigen die bisherigen Beobachtungen.

- Interzelluläre Flächendichten (schwarz) fallen bei allen drei Partikelklassen deutlich größer aus als die in zellfreien Experimenten bestimmten Flächendichten (grün und rot).
- Eine Vorbeschichtung zellfreier Substrate mit konditioniertem CCM (rot) führt allgemein zu einer Erhöhung der deponierten Dosis, verglichen mit einer Vorbeschichtung mit regulärem

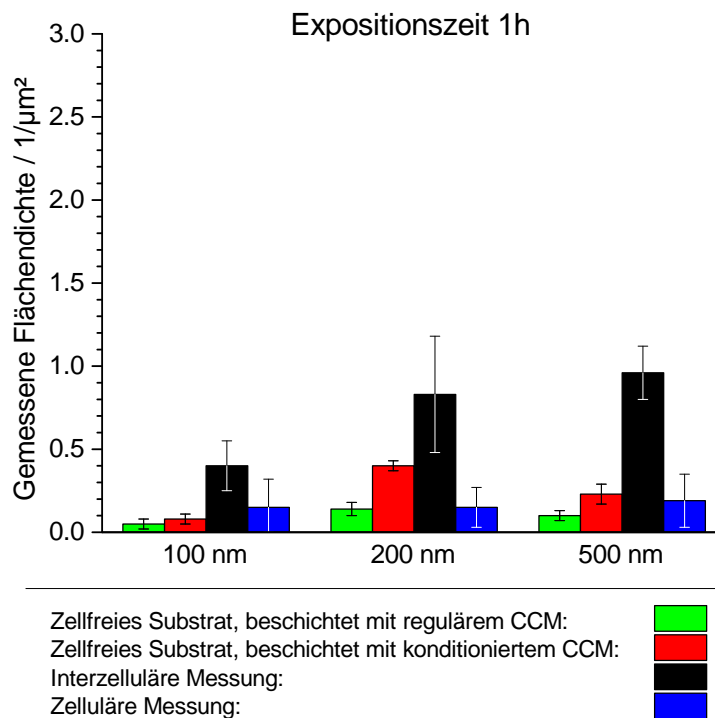


Abbildung 5.6. Balkendiagramm der gemessenen Flächendichten bei unterschiedlicher Vorbeschichtung zellfreier Substrate sowie auf zellulären und interzellulären Flächen in Anwesenheit von Zellen. Expositionszeit 1 h, Eingabekonzentrationen $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ (100 nm NP), $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ (200 nm SMP) und $109 \mu\text{g}/\text{mL}$ (500 nm SMP). Die Skalierung der Ordinate wurde wie in Abbildung 5.7 gewählt, die die Ergebnisse für 4 h Exposition zeigt.

Medium (grün).

- Zelluläre Flächendichten (blau) liegen meist auf ähnlichem Niveau wie unter zellfreien Bedingungen gemessene Werte (grün und rot).

Die geschilderten Ergebnisse lassen sich großteils auch auf die Resultate mit erhöhter Expositionszeit übertragen. Repräsentative Aufnahmen der vierstündigen Versuche sind in Abbildung A.5.2 im Anhang zu finden. Abbildung 5.7 fasst die gemessenen Flächendichten in einem weiteren Balkendiagramm nach Partikelgröße sortiert zusammen. Es werden sowohl zellfreie Versuche mit unterschiedlichen Vorbeschichtungen als auch zelluläre und interzelluläre Ergebnisse verglichen. Die Eingabekonzentrationen betragen in fast allen Fällen wiederum $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ bei 100 nm NP, $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ bei 200 nm SMP und $109 \mu\text{g}/\text{mL}$ bei 500 nm SMP. Einzige Ausnahme bildet der Versuch mit Zellen und 100 nm Partikel, welcher versehentlich auch mit $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ durchgeführt wurde. Aus diesem Grund sind die zellulären und interzellulären Messwerte in diesem Fall nur eingeschränkt mit den Resultaten der entsprechenden zellfreien Experimenten vergleichbar.

Betrachtet man zunächst nur die 100 und 200 nm Partikel, so treffen prinzipiell die bei den ein-stündigen Versuchen gemachten Beobachtungen auch hier zu.

- Die interzellulären Flächendichten (schwarz) sind deutlich größer als auf zellfreien Substraten gemessene Werte (grün und rot). Bei 100 nm Partikeln gilt dies aber zunächst nur unter der Einschränkung, dass die Eingabekonzentration im Fall mit Zellen siebenfach höher war als im zellfreien Fall. Jedoch deuten mit dem DG-Modell durchgeführte Berechnungen an, dass die beschriebenen Verhältnismäßigkeiten auch dann zutreffen, wenn gleiche Eingabekonzentrationen verwendet werden.

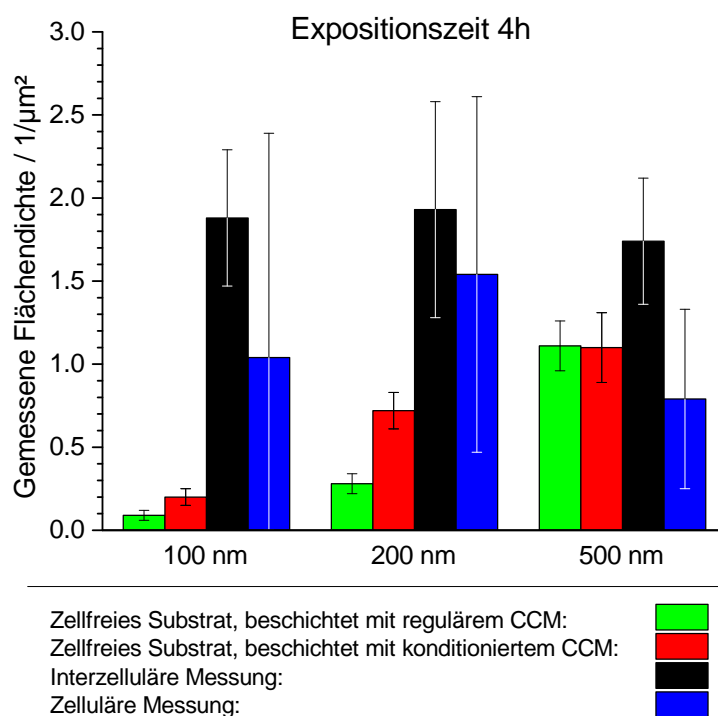


Abbildung 5.7. Balkendiagramm der gemessenen Flächendichten bei unterschiedlicher Vorbeschichtung zellfreier Substrate sowie auf zellulären und interzellulären Flächen in Anwesenheit von Zellen. Expositionszeit 4 h, Eingabekonzentrationen $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ (100 nm NP), $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ (200 nm SMP) und $109 \mu\text{g}/\text{mL}$ (500 nm SMP), mit Ausnahme der Expositionen mit 100 nm Partikeln mit Zellen ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$).

trationen verwendet werden.

- Die Flächendichten auf Substraten, die mit konditioniertem CCM vorbeschichtet wurden (rot), sind größer als die Flächendichten auf mit regulärem CCM vorbeschichteten Substraten (grün).

Der dritte Punkt, dass zelluläre und zellfreie Messwerte auf ähnlichem Niveau liegen, lässt sich ohne weiteres nicht auf die vierstündigen Ergebnisse übertragen, da die Messwerte allein für sich betrachtet auf den Zellen (blau) deutlich größer sind als auf zellfreien Substraten (grün und rot). Wie sich aber in Kapitel 5.3 beim Vergleich mit Simulationen zeigen wird, sind in diesem Fall die zellulären Flächendichten – möglicherweise aufgrund eines Präparationsfehlers – unverhältnismäßig groß im Vergleich zu den Flächendichten, die gemäß den Berechnungen zu erwarten wären. Ein starkes Indiz dafür sind auch die sehr großen Fehler der zellulären Messungen (vgl. Abbildung 5.7). Insofern kann man davon ausgehen, dass unter fehlerfreien Bedingungen bei den vierstündigen Versuchen mit 100 und 200 nm Partikeln tendenziell auch in etwa die Gleiche Menge Partikel zellulär zu finden sein sollte wie auf zellfreien Substraten.

Die Resultate mit 500 nm Partikeln nach 4 h Exposition weichen von den übrigen Ergebnissen teilweise ab (vgl. Abbildung 5.7).

- Die interzellulär gemessene Flächendichte (schwarz) ist ebenfalls größer als die auf zellfreien Substraten gemessenen Flächendichten (grün und rot).
- Trotz unterschiedlicher Vorbeschichtung stimmen die gemessenen Flächendichten auf beiden zellfreien Substraten jedoch überein (grün und rot). Ursachen hierfür werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

- Die zellulär gemessene Flächendichte (blau) ist etwas kleiner als die auf zellfreien Substraten gemessenen Flächendichten (grün und rot). Aufgrund der recht großen Messunsicherheit der zellulären Messung lässt sich jedoch auch in diesem Fall davon ausgehen, dass im Rahmen der Fehler die Flächendichten auf gleichem Niveau liegen.

Der Großteil der beschriebenen Ergebnisse lässt den Schluss zu, dass Zellen einen außerordentlichen Einfluss auf die Adhäsion von Partikeln und damit die Deposition haben.

5.2.3 Diskussion

Die quantitative Auswertung von *in-vitro*-Depositionsexperimenten mit Silika-Partikeln und A549-Zellen förderte überraschende Unterschiede der deponierten Dosis zu Tage, je nach betrachteter Oberfläche. Vor allen Dingen wurden unabhängig von Partikelgröße, Eingabekonzentration und Expositionsdauer weniger Partikel auf den Zellen gezählt als in interzellulären Bereichen abseits der Zellen. Auch in zellfreien Versuchen mit ITO-Substraten unterschiedlicher Vorbeschichtung zeigte sich im Allgemeinen eine deutlich schwächere Deposition als im interzellulären Fall. Dabei fiel insbesondere die Erhöhung der deponierten Dosis durch den Einsatz von konditioniertem CCM statt des regulären CCM zur Vorbeschichtung der Substrate auf.

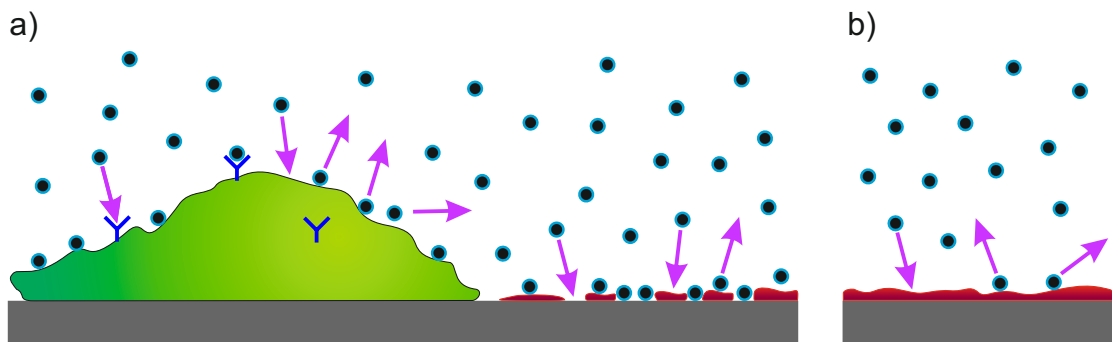


Abbildung 5.8. Schematische Darstellung des Adsorptionsmechanismus mittels Dockingplätzen. (a) Partikel mit Proteinkorona (hellblau) binden auf Zellen nur an bestimmte Rezeptoren, bzw. auf dem Substrat nur in Lücken der Proteinbeschichtung des Substrates. (b) Eine nahezu unversehrte Proteinbeschichtung im zellfreien Fall bietet fast keine Dockingplätze für Partikel und resultiert in einer deutlich geringeren Partikel-Flächendichte.

Es wurden umfangreiche Überlegungen angestellt, um die beobachteten Diskrepanzen zwischen zellulären und interzellulären Dosen (vgl. Abbildung 5.3) zu erklären. Aus mehreren Gründen, die im Folgenden noch näher erläutert werden, erscheint die folgende hypothetische Interpretation als die am besten Nachvollziehbare, bedarf jedoch weiterer experimenteller Validierung.

Die Silika-Partikel binden nur an sogenannte „Dockingplätze“, was in Abbildung 5.8a schematisch illustriert wird. Auf den Zellen handelt es sich dabei um auf der Zellmembran befindliche Rezeptoren, die an bestimmte Proteine binden können. Trifft ein Partikel mit solch einem in seiner Korona enthaltenen Protein auf einen passenden Rezeptor, so wird es fest gebunden [47, 133, 134]. Die Wahrscheinlichkeit für einen solches Aufeinandertreffen kann als recht groß angenommen werden, da die hohen Diffusionskonstanten der verwendeten Silika-Partikel von ca. $1 - 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für eine starke Brownsche Bewegung der Partikel sprechen, sodass es im Rahmen der zur Verfügung stehenden Zeit (1–4 h) zu sehr vielen Kontakten zwischen Partikel und Zellen kommt. Im Fall des Substrates wird angenommen, dass es sich bei den Dockingplätzen um Defekte der Proteinbeschichtung des Substrates handelt (s. Abbildung 5.8a). Wie die Partikel erhält auch die Oberfläche des Substrats

bei Kontakt mit proteinhaltigem Zellkulturmedium eine Beschichtung mit Proteinen. Da also Partikel und Substrat dem gleichen Proteinmix ausgesetzt sind und nach Lesniak et al. [135] Proteine untereinander nahezu keine Wechselwirkung zeigen, können die Partikel nur in Lücken der Proteinbeschichtung des Substrates fest an dessen Oberfläche binden. Über die Ursache der Entstehung dieser Defekte kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Sicher ist jedoch, dass die Zellen einen essentiellen Beitrag leisten, da zellfreie Versuche eine deutlich verringerte Deposition zeigten, es also in Abwesenheit von Zellen deutlich weniger Dockingplätze für die Partikel auf dem Substrat geben muss (vgl. Abbildung 5.8b).

Bei der Bindung an Dockingplätze, seien es Rezeptoren oder Lücken in der Proteinbeschichtung, muss es sich um eine sehr starke Bindung handeln, denn die mechanischen Kräfte auf die Partikel beim Absaugen der Partikelsuspension vor der Fixierung sind als enorm einzustufen. Sämtliche ggf. nur leicht gebundenen Partikel werden dabei entfernt. Ob auch stark gebundene Partikel verloren gehen ist experimentell kaum überprüfbar. Ein Testversuch mit direkter Fixierung vor dem Absaugen der Suspension hat zumindest keine merklichen Unterschiede zur regulären Prozedur aufgezeigt. Bei der direkten Fixierung wird das Fixiermittel höher konzentriert direkt in die Partikelsuspension hinzugegeben, jedoch besteht dabei die Gefahr von Artefakten durch die Wechselwirkung mit der Partikelsuspension, weshalb dieses Verfahren nicht die erste Wahl ist. Durch die Fixierung mit Paraformaldehyd werden Moleküle, wie Proteine, chemisch vernetzt, was deren Festigkeit und Stabilität erhöht, sodass auch bei den darauf folgenden Präparationsschritten keine weiteren Verluste zu erwarten sind. In einem zweiten Test wurden Proben doppelt prozessiert, d.h. alle Präparationsschritte wurden nach einer ersten Quantifizierung erneut durchgeführt und eine zweite Quantifizierung unternommen. Dieser Test ergab keine nennenswerten Unterschiede nach der zweiten Prozessierung im Vergleich zur ersten, sodass davon ausgegangen wird, dass ein Abwaschen nicht der Grund für die Diskrepanzen zwischen zellulären und interzellulären Flächendichten ist.

Die oft zitierte elektrostatische Abstoßung zwischen negativ geladenen Partikeln (negatives ζ -Potential) und der negativ geladenen Zellmembran [136, 137] kann auch nicht als Ursache für die geringere Partikeldeposition auf den Zellen angeführt werden. Aufgrund der Debye-Länge in DMEM von lediglich ca. 1 nm sind die Ladungen von Membran und Partikel so stark abgeschirmt, dass – in Anbetracht der Größe der Partikel und deren hohen Diffusionskonstanten – die Coulomb-Kraft den Kontakt zwischen Partikeln und Zelle nicht unterbinden kann. Jedoch ist sie mitunter ein Grund, warum die Partikel, wenn sie auf keinen passenden Rezeptor treffen, wieder leicht weg diffundieren können. Bei negativ geladenen Teilchen wurde deshalb im Allgemeinen nur eine sehr schwache Adsorption an die Zelloberfläche und damit nur eine sehr geringe Partikelaufnahme beobachtet [4, 138]. Partikel mit positivem Zeta-Potential tendieren dagegen stärker dazu auf der negativ geladenen Membran, unabhängig von Rezeptoren, liegen zu bleiben [137, 138].

Aus der Bindung an spezifische Rezeptoren folgt, dass die Partikel via Endozytose aufgenommen werden können [139]. Aus diesem Grund wäre die Inkorporation von Partikeln ein möglicher Grund für die Unterschiede zwischen zellulären und interzellulären Partikel-Flächendichten. Zur Untersuchung der Konzentration inkorporierter Partikel wurden FIB/REM-Tomografien mehrerer Zellen sowie STEM-Untersuchungen von Zelldünnschnitten durchgeführt, welche jedoch nur eine geringe Inkorporation von Partikeln zeigten, die nicht ausreicht, um besagte Diskrepanzen erklären zu können (s. Kapitel 5.5).

Schlussendlich sind die voneinander abweichenden Flächendichten wahrscheinlich unterschiedlichen Dichten von verfügbaren Rezeptoren auf Zellen und Defekten der Substratbeschichtung zuzuschreiben. Diese Interpretation ist nur schwer überprüfbar, jedoch konnten in zellfreien Versuchen aussagekräftige Indizien gewonnen werden, die dafür sprechen. Zum einen führte, wie weiter oben erwähnt, das Weglassen von Zellen – bei ansonsten identischer Präparation kommt dies einer Vor-

beschichtung des Substrates mit FBS gleich – zu einer stark reduzierten Deposition von Partikeln, ungeachtet ihrer Größe (vgl. Abbildung 5.6). Dies deutet auf eine intakte Proteinbeschichtung dieser Substrate hin und identifiziert die Zellen selbst als Ursache der Entstehung von Defekten der Substratbeschichtung und der damit verbundenen erhöhten interzellulären Deposition. Zum anderen führt die Vorbeschichtung mit konditioniertem Zellkulturmedium in zellfreien *in-vitro*-Versuchen zu einer leicht stärkeren Adsorption der Nanopartikel als im Fall mit regulärem Medium (vgl. Abbildung 5.6). Das aus A549-Zellkulturen stammende konditionierte Medium enthält zahlreiche zusätzliche Substanzen, wie zelleigene Proteine, die während der Kultivierung von Zellen ins Medium abgegeben werden. Dies führt unweigerlich zu einer veränderten Proteinbeschichtung der zellfreien Substrate, was – aus nicht genauer bekannten Gründen – in einer leichten Zunahme von Defekten resultiert.

Vereinzelt wurde der Einfluss von Zellen auf den Transportprozess und die Aufnahme von Partikeln in einer anderen Form bereits beobachtet. Lesniak et al. [59] lieferten erste Hinweise darauf. In ihrer Studie berichten sie, dass sich unter serumfreien Bedingungen in Anwesenheit von A549-Zellen auf Silika-NP eine Korona bildet, die sich deutlich von der durch Serumproteine geformten Korona unterscheidet. Diese Konditionierung von Partikeln wurde von Albanese et al. [140] anhand von Gold-Nanopartikeln zwischen 15 und 90 nm eingehender untersucht. Sie stellten in Folge der Modifizierung eine veränderte Proteinkorona, ein verstärktes Agglomerationsverhalten, stärkere Adhäsion an Zellmembranen und stärkere Partikelaufnahme fest.

Eine der wenigen Studien, die einen zellulären Einfluss auf die Partikeldeposition in *in-vitro*-Versuchen nachweisen konnte, kommt von Halamoda-Kenzaoui et al. [5], die ebenfalls *in-vitro*-Experimente mit fluoreszenzmarkierten Silika-NP (30 und 80 nm) und A549-Zellen mit zellfreien Versuchen vergleichen. Mittels Bestimmung des gesamten Fluoreszenzsignals auf den Oberflächen und im Zellkulturüberstand wird ein qualitativer Verlauf der Partikeldeposition gemessen. Es wird berichtet, dass unter serumfreien Bedingungen auf die zellfreie Oberfläche nur ein Bruchteil dessen deponiert wird, was auf einer Monolage Zellen zu finden ist. Dieses Ergebnis wird durch eigene serumfreie Versuche in dieser Arbeit bestätigt (s. Abschnitt 5.4). Interessanter ist jedoch, dass im Fall mit Serum sowohl auf der Zellmonolage als auch auf der leeren Kunststoffoberfläche der *wells* nur ein geringer Prozentsatz der eingegebenen Partikel zu finden ist. Leider werden die Daten hierzu nicht gezeigt, doch lässt sich aufgrund der getroffenen Aussagen annehmen, dass in beiden Fällen ungefähr die gleiche geringe deponierte Dosis gemessen wurde. Das deckt sich ebenfalls erstaunlich gut mit den in dieser Arbeit beobachteten Resultaten auf Zellen und auf zellfreien Substraten nach einstündiger Exposition (vgl. Abbildung 5.6). In dieser Arbeit ist es jedoch durch den Einsatz von REM erstmals möglich, eine Quantifizierung der kleinen effektiven Dosen durchzuführen. Die zellulär gemessenen Flächendichten (orange in Abbildung 5.6) sind ungefähr genauso groß wie die Flächendichten auf zellfreien, mit regulärem CCM vorbeschichteten Substraten (rot in Abbildung 5.6). Die analogen 4 h Messungen weichen davon zwar ab, doch weisen die zellulären Flächendichten auch extrem große Messunsicherheiten auf.

Es sei ferner noch erwähnt, dass die gleiche Gruppe [6] kurze Zeit später auch bei Gold-Nanopartikeln verschiedener Größen den gleichen zellulären Einfluss auf die deponierte Dosis beobachten konnte, jedoch diesmal bei zugesetztem Serum. Hier zeigt sich, wie unterschiedlich die Wechselwirkungen in biologischen Systemen sein können.

Basierend auf den erzielten Ergebnissen kann der REM eine sehr gute Eignung zur Bestimmung der effektiven Dosis ausgesprochen werden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und guten Auflösung konnten sehr kleine Dosen bis zu wenigen Partikeln pro $100 \mu\text{m}^2$ erfolgreich quantifiziert werden. Auf Substraten sind SiO_2 -Partikel grundsätzlich gut mit SE zu detektieren und mit Hilfe einer an den Substrathalter angelegten Bremsspannung können auch auf Zelloberflächen 100 nm kleine SiO_2 -NP mit BSE ausreichend gut sichtbar gemacht werden. Ob dies auch bei noch kleineren Na-

nopartikeln der Fall ist, bleibt abzuklären. Materialien mit größerer mittlerer Ordnungszahl sollten dabei aufgrund des höheren Rückstreuoeffizienten kein Problem darstellen. Die Abbildung leichter Materialien (wie beispielsweise Kohlenstoff Nanoröhrchen) wird dagegen ungleich schwieriger sein, da deren mittlere Ordnungszahlen der mittleren Ordnungszahl des Zellmaterials zu ähnlich sein werden. In solchen Fällen könnte nur der Topografiekontrast eine Abbildung ermöglichen, was jedoch bei grobstrukturierten Oberflächen, wie denen der A549-Zellen, schwierig sein wird.

Aus den durchgeführten Experimenten ergibt sich aber eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Quantifizierung der effektiven Dosis mittels REM. Um die Zählbarkeit zu wahren, dürfen die Dosen nicht zu groß sein. Andererseits sollten die deponierten Dosen auch nicht zu klein sein, da sich die statistische Unsicherheit der Versuche erhöht. Geht man bei der Sedimentation und Diffusion von Partikeln von poissonverteilten Zufallsexperimenten aus, lässt sich die zu erwartende Streuung durch den Variationskoeffizienten abschätzen. Sie bewegt sich in den gezeigten Experimenten in Größenordnungen zwischen 34 % im ungünstigsten Fall (850 gezählte Partikel in 100 Bildern) und 3,5 % im besten Fall (40000 gezählte Partikel in 50 Bildern). Eine zu kleine Dosis führt also unweigerlich zu statistisch ungenaueren Messungen.

Die gemessenen Standardabweichungen, die in den Abbildungen 5.3, 5.6 und 5.7 umgerechnet in Flächendichten gezeigt werden, liegen sogar teilweise deutlich über der theoretischen Standardabweichung nach Poisson. Einerseits passt dies zu der auf Zellen beobachteten, teilweise extremen Inhomogenität der Partikelverteilung, widerspricht andererseits aber dem Eindruck, dass auf den Substraten die Partikel recht homogen verteilt sind. Zwar könnte eine Erhöhung der Anzahl quantifizierter Bilder den Fehler weiter reduzieren, jedoch wird der Effekt bei einem bereits jetzt vorhandenen Stichprobenumfang von 50 bis 100 Bildern marginal sein. Wenn es die augenscheinliche Homogenität erlaubt, kann die Anzahl zu quantifizierender Bilder sogar deutlich reduziert werden, ohne eine nennenswerte Verschlechterung des Fehlers in Kauf nehmen zu müssen, wodurch deutlich Zeit gespart werden kann. Es lässt sich also schlussfolgern, dass der Partikeltransport *in-vitro* nur grob einer Poisson-Verteilung folgt.

5.3 Simulation des Partikeltransportes *in-vitro*

5.3.1 Vergleich von berechneten und gemessenen effektiven Dosen

Die beobachteten Messergebnisse wurden mit Simulationen verglichen, um deren prinzipielle Eignung zur Modellierung der Deposition zu überprüfen. Sowohl ISDD als auch das DG-Modell kamen dabei zum Einsatz, wobei schnell klar wurde, dass im Fall von *sticky* Randbedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Programmen besteht.

Abbildung 5.9 zeigt den Vergleich von einigen simulierten Flächendichten zwischen 0,2 und $3,5 \text{ } 1/\mu\text{m}^2$, welche mit beiden Programmen unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden (vgl. Tabelle 4.2 in Kapitel 4.5.2 und A.3.1 im Anhang). Werden beim DG-Modell *sticky* Randbedingungen mit $K_D = 10^{-9} \text{ mol/L}$ verwendet, so zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit ISDD (volle Symbole). K_D -Werte in der Größenordnung von 10^{-8} bis 10^{-9} mol/L sind charakteristisch für Bindungen hoher Affinität, was typisch ist für spezifische Protein-Wechselwirkungen [8]. Werden beim DG-Modell dagegen *non-sticky* Randbedingungen benutzt, werden klare Unterschiede zu ISDD deutlich (leere Symbole), da mit ISDD *non-sticky* Bedingungen nicht modelliert werden können. Bei 100 nm und 200 nm großen Partikeln sind die unter *non-sticky* Bedingungen berechneten Flächendichten wesentlich kleiner als unter *sticky* Randbedingungen. 500 nm SMP dagegen weisen eine schwächer ausgeprägte Abhängigkeit von den Randbedingungen auf. Aufgrund der minimalen Unterschiede zwischen ISDD und DG-Modell unter *sticky* Bedingungen werden im Folgenden die Messergebnisse

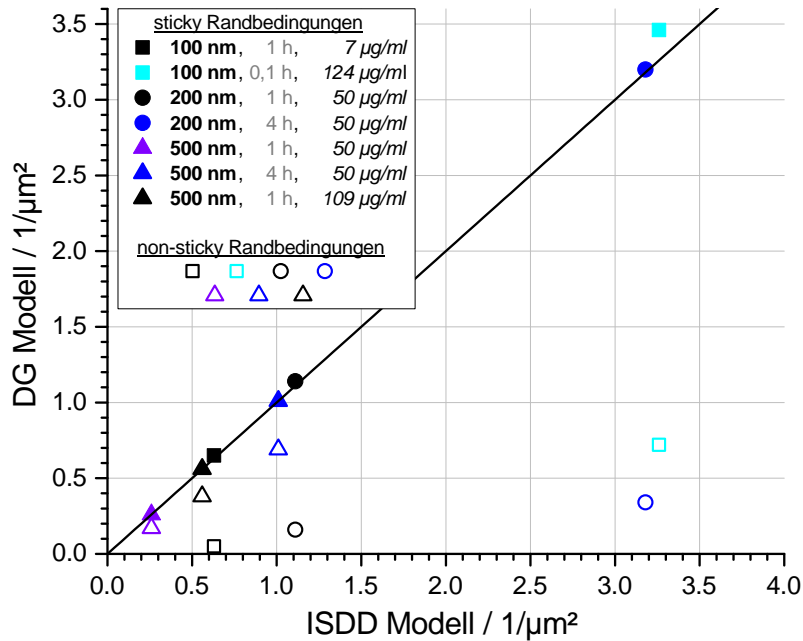


Abbildung 5.9. Gegenüberstellung von verschiedenen Simulationsergebnissen mit DG-Modell und ISDD. Die diagonale Linie kennzeichnet eine Übereinstimmung beider Programme. Beim DG-Modell wird zwischen Simulationen unter sticky Randbedingungen (volle Symbole) und non-sticky Randbedingungen (leere Symbole) differenziert.

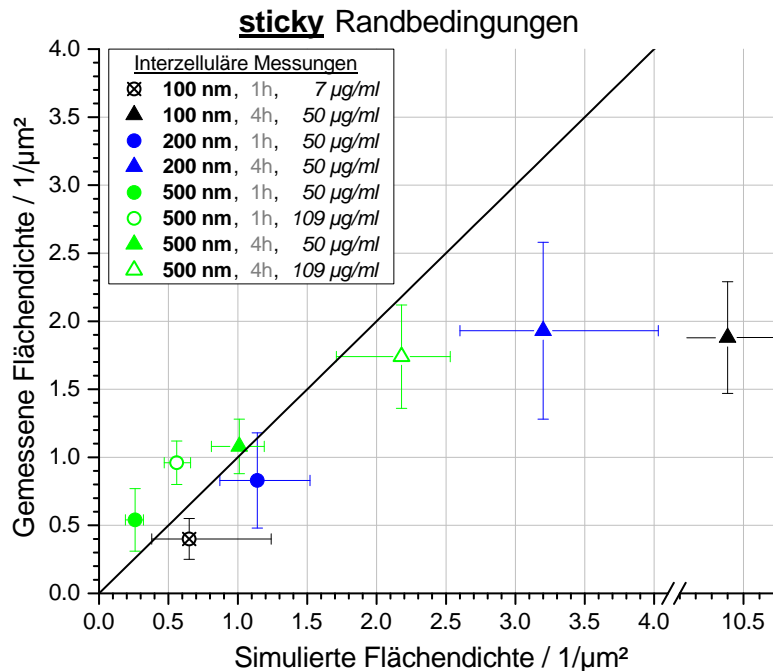


Abbildung 5.10. Vergleich von interzellulär gemessenen Flächendichten mit unter sticky Randbedingungen simulierten Flächendichten. Gegenstand sind Depositionsexperimente mit 100 nm, 200 nm und 500 nm SiO_2 -Partikel bei verschiedenen Eingabekonzentrationen (s. Legende) und 1 h bzw. 4 h Expositionsdauer. Man beachte die Unterbrechung der x-Achse zwischen 4,1 und $10 1/\mu\text{m}^2$. Die diagonale Linie kennzeichnet eine Übereinstimmung gemessener und berechneter Werte.

lediglich mit dem DG-Modell verglichen.

Wie in Abschnitt 5.2.1 gezeigt wurde, weisen interzellulär gemessene Flächendichten allgemein hohe Werte auf, weshalb hier zum Vergleich Simulationen mit *sticky* Randbedingungen herangezogen werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.10 zu sehen. Betrachtet man lediglich die Messungenauigkeiten (y -Fehler), so kann in deren Rahmen streng genommen nur in zwei Fällen von einer Übereinstimmung von gemessenen und berechneten Flächendichten gesprochen werden. Es gibt jedoch zwei wichtige Fehlerquellen, die dabei unberücksichtigt bleiben.

- Es besteht die Gefahr, dass bei der Präparation der Suspensionen (vgl. Kapitel 4.1.2) das nur einmalige Durchmischen der Standard-Suspensionen für 10 Sek. nicht ausreicht, um eine homogene Verteilung der Partikel zu erreichen. Bei der Entnahme für die weitere Verdünnung kann es folglich sein, dass für die gewünschte Endkonzentration zu viele oder zu wenige Partikel entnommen werden. Und auch bei der anschließenden Verdünnung wird nur zweimal für 10 Sek. durchgemischt, was nicht zwingend genügt, um die entnommenen Partikel homogen im deutlich größeren Volumen zu verteilen, sodass es zu globalen Konzentrationsunterschieden bei der Exposition von Zellen mit Partikeln kommen kann. Folglich wurde der potentielle Fehler der Eingabekonzentrationen mit 10 % abgeschätzt.
- Die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel werden mittels DLS-Messungen bestimmt, jedoch ist diese Technik höchst umstritten, insbesondere bezüglich ihrer Messgenauigkeit. Die potentielle Ungenauigkeit des hydrodynamischen Durchmessers wurde durch Differenzbildung eines Messwertes zum theoretisch zu erwartenden Wert abgeschätzt (s. Abschnitt 5.1).
- Eine dritte mögliche Unsicherheit stellt die Materialdichte dar, doch haben Simulationen mit leicht unterschiedlichen Dichten gezeigt, dass die Auswirkungen verhältnismäßig gering sind, sodass sie nicht weiter berücksichtigt wird.

Um die Auswirkungen der einzelnen Unsicherheiten auf die Flächendichten zu bestimmen, wurden zusätzliche Simulationen durchgeführt, in denen je ein Parameter um die ihm zugrundeliegende Unsicherheit variiert wurde. Der Differenzbetrag zum ursprünglich berechneten Wert wird als der resultierende Fehler der berechneten Flächendichte angenommen. Schließlich wird aus den Einzel Fehlern der quadratische Mittelwert berechnet, welcher in Abbildung 5.10, wie auch in den noch folgenden Abbildungen 5.12 und 5.11, als x -Fehler eines jeden Messwertes eingezeichnet ist. Es sei ferner erwähnt, dass der Fehler asymmetrisch ist.

Berücksichtigt man neben den Messungenauigkeiten auch die abgeschätzten Unsicherheiten der Simulationen, so kann in Abbildung 5.10 in deren Rahmen sogar in fünf der gezeigten Fälle von einer Übereinstimmung von gemessenen und berechneten Flächendichten gesprochen werden, zwei weitere Messpunkte liegen sehr nah dran. Auffällig ist lediglich ein Ausreißer (100 nm, 4 h, schwarzes, volles Dreieck), auf den im nächsten Abschnitt 5.3.2 noch näher eingegangen wird.

Der Vollständigkeit halber wurden die interzellulären Flächendichten noch mit *non-sticky* Simulationen verglichen (vgl. Abbildung A.6.1 im Anhang). Hierbei zeigte sich in der Tat eine schlechte Übereinstimmung mit den Messwerten, da das DG Modell mit *non-sticky* Randbedingungen die deponierte Menge Partikel deutlich unterschätzt.

In Abbildung 5.11 werden die zellulären Messungen mit *non-sticky* Simulationen verglichen, da sie eine stark reduzierte Deposition zeigten (vgl. Abbildung 5.6). Im Fall der einstündigen Expositionen (kreisrunde Symbole) zeigt sich im Rahmen der Messungenauigkeiten eine gute Übereinstimmung von Messungen und Simulationen. Dagegen weisen die Werte der 100 nm und 200 nm Partikel nach 4 h Expositionsdauer deutliche Abweichungen auf, weshalb hier nur aufgrund der immensen statistischen Fehler eine akzeptable Übereinstimmung konstatiert werden kann. Ursache hierfür sind möglicherweise globale Konzentrationsunterschiede in der Partikelsuspension aufgrund

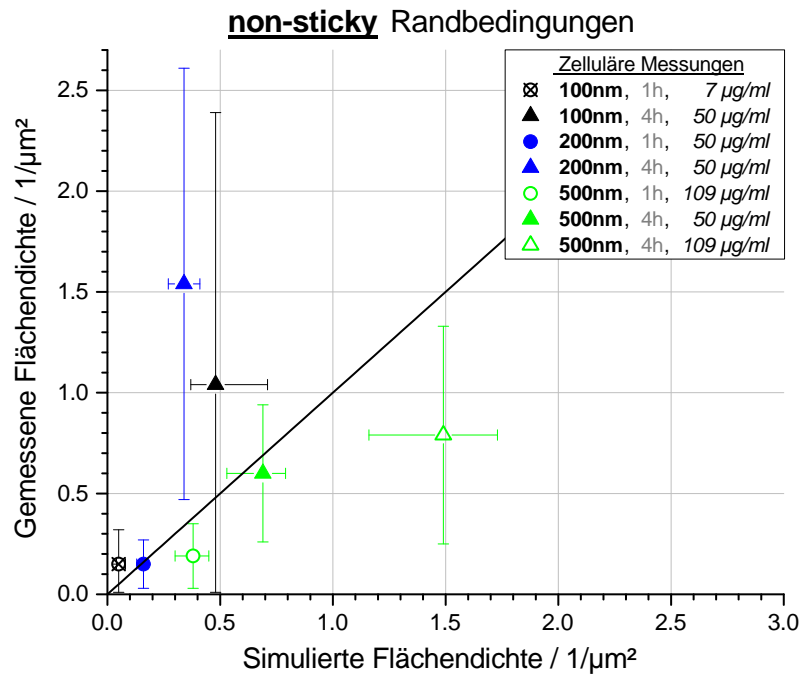


Abbildung 5.11. Vergleich von zellulär gemessenen Flächendichten mit unter *non-sticky* Randbedingungen simulierten Flächendichten. Gegenstand sind Depositionsexperimente mit 100 nm, 200 nm und 500 nm SiO_2 -Partikel bei verschiedenen Eingabekonzentrationen (s. Legende) und 1 h bzw. 4 h Expositionsdauer. Die diagonale Linie kennzeichnet die theoretische Übereinstimmung beider Werte.

ungenügender Durchmischung derselbigen, weshalb es auf der Probe zu starken Inhomogenitäten der Flächendichten kommt. Dies äußert sich folglich auch in den sehr großen Messfehlern. Bei 500 SMP stimmen berechnete und simulierte Flächendichten nach 4 h wiederum recht gut überein. Im Gegensatz dazu zeigen Simulationen mit *sticky* Randbedingungen eine merklich schlechtere Übereinstimmung, wie in Abbildung A.6.2 im Anhang zu erkennen ist. Die tatsächlich deponierte Dosis wird hier deutlich überschätzt.

Flächendichten der zellfreien Experimente liegen auf ähnlichem Niveau wie die zellulären Messungen (vgl. Abbildungen 5.6 und 5.7), weshalb diese Messwerte in Abbildung 5.12 ebenfalls mit *non-sticky* Simulationen verglichen werden. Hierbei wird zwischen Proben, die mit regulärem CCM vorbeschichtet wurden (rote Symbole), und Substraten mit einer Vorbeschichtung durch konditioniertes CCM (violette Symbole) unterschieden.

Betrachtet man lediglich die Versuche mit gewöhnlichem CCM als Vorbeschichtung (rote Symbole in Abbildung 5.12) zeigt sich allgemein eine akzeptable Übereinstimmung mit den *non-sticky* Simulationen. Vier von sechs Messpunkten liegen im Rahmen ihrer Fehler auf der Diagonalen, die eine Übereinstimmung von gemessenen und berechneten Werten anzeigt. Eine Ausnahme bilden hier die Flächendichten von 500 nm Partikeln (rote dreieckige Symbole), wobei im Fall der Messung nach 4 h Exposition (leeres rotes dreieckiges Symbole) im Rahmen der Unsicherheiten zumindest noch von einer akzeptablen Übereinstimmung gesprochen werden kann. Nach 1 h Exposition (volles rotes dreieckiges Symbol) liegt jedoch eine deutliche Abweichung von der berechneten Flächendichte vor.

Betrachtet man die Experimente mit Vorbeschichtungen durch konditioniertes Zellkulturmedium (violette Symbole in Abbildung 5.12), so fällt auf, dass die Übereinstimmung bei den 100 und 200 nm Partikel deutlich schlechter ausfällt, da die gemessenen Flächendichten größer sind. 500 nm

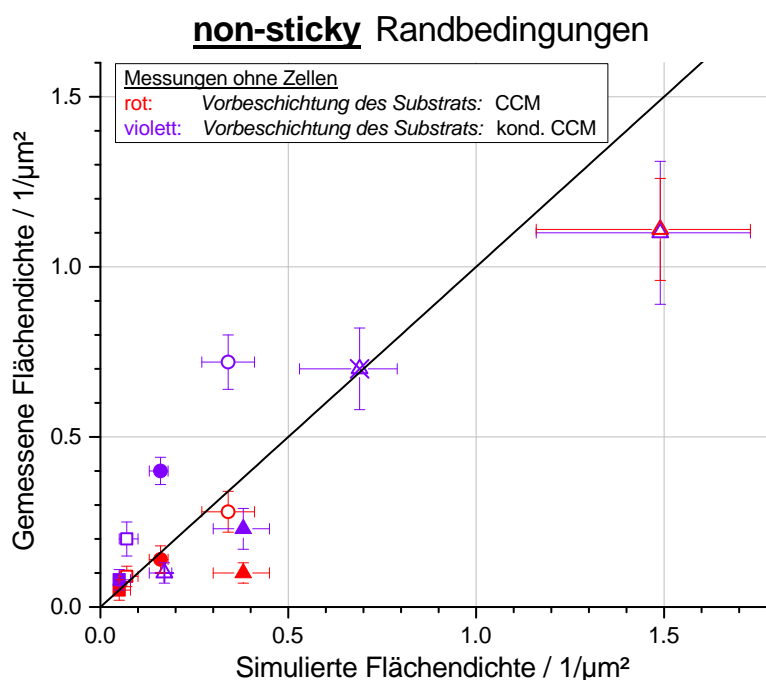


Abbildung 5.12. Vergleich von bei zellfreien Depositionsexperimenten gemessenen Flächendichten mit unter non-sticky Randbedingungen simulierten Flächendichten. Gegenstand sind Versuche mit 100 nm (quadratische Symbole), 200 nm (kreisrunde Symbole) und 500 nm (dreieckige Symbole) SiO_2 -Partikel bei verschiedenen Eingabekonzentrationen und 1 h (geschlossene Symbole) bzw. 4 h (leere Symbole) Expositionsdauer. Experimente mit CCM-Vorbeschichtung des Substrats sind rot dargestellt, Versuche mit konditioniertem CCM als Vorbeschichtung violett. Die diagonale Linie kennzeichnet eine Übereinstimmung gemessener und berechneter Werte.

Partikel bilden wiederum eine Ausnahme. Nach einstündiger Exposition (volles violette dreieckiges Symbol) ist die Übereinstimmung zwischen berechneten und experimentellen Werten besser als bei der Vorbeschichtung mit regulärem CCM. Nach vierstündiger Exposition (leeres violette dreieckiges Symbol) ist die gemessene Flächendichte nahezu identisch zum Fall mit der Vorbeschichtung mit regulärem CCM, entsprechend liegt auch hier eine akzeptable Übereinstimmung vor. Zwei weitere Messpunkte von 500 nm Partikeln mit reduzierter Eingabekonzentration ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$ statt $109 \mu\text{g}/\text{mL}$, leere violette dreieckige Symbole mit Pluszeichen und Kreuz) zeigen sogar eine gute Übereinstimmung, jedoch liegen hierfür keine Vergleichswerte in Form von Messungen auf Proben, die mit regulärem CCM vorbeschichtet wurden, vor.

Zum Vergleich wurden auch in diesem Fall zusätzliche Simulationen mit *sticky* Randbedingungen durchgeführt, welche jedoch wiederum die deponierte Dosis überschätzen und so eine sehr schlechte Übereinstimmung mit den gemessenen Flächendichten liefern (vgl. Abbildung A.6.3 im Anhang).

5.3.2 Diskussion

Bei erstmaliger Einführung des DG Modells wurde lediglich die Depositionskinetik, festgelegt durch Sedimentation und Diffusion, experimentell validiert [8]. Hierzu wurden berechnete Konzentrationsverläufe mit eingefrorenen Querschnitten von Partikelsuspensionen verglichen. Die Validität der implementierten variablen Randbedingungen, d.h. der *stickiness*, in Form einer Langmuir-schen Gleichgewichtskonstante K_D , als geeigneter Parameter zur Beschreibung unterschiedlicher Bindungsstärken von Partikeln an Oberflächen muss jedoch erst noch bestätigt werden. Beispiels-

weise haben Wiemann et al. [141] in ihrer Studie zu *in-vitro* Effekten von Silika Nanopartikeln auf Makrophagen sowohl ISDD als auch das DG Modell verwendet, um die effektive Dosis, die auf die Zellen gelangt, abzuschätzen. Jedoch beklagten sie das Fehlen einer geeigneten Methode zur quantitativen Messung der deponierten Menge Partikel, weshalb nicht festgestellt werden konnte, welches Modell oder welche Randbedingungen die Experimente am besten beschreiben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, dass REM hierfür sehr gut geeignet ist (s. Kapitel 5.2). Aus diesem Grund wurden die experimentell bestimmten Flächendichten mit mittels ISDD und DG Modell berechneten Flächendichten verglichen.

Der in Kapitel 5.2 postulierte Bindungsmechanismus von Partikeln über Dockingplätze sowie der festgestellte zelluläre Einfluss auf die Anzahl dieser zur Verfügung stehenden Dockingplätze haben spürbare Auswirkungen auf den Versuch, die Partikeldeposition zu simulieren. Das weit verbreitete Modell ISDD [7] stößt dabei an seine Grenzen, denn es berechnet die deponierte Partikeldichte völlig unabhängig von deren biologischem Kontext. Darunter fallen die Vernachlässigung von Partikel-Partikel- und Partikel-Zell-Wechselwirkungen, insbesondere Effekte durch die Proteinkorona. Darüber hinaus wird eine mögliche Rückdiffusion vom Boden in die Suspension ausgeschlossen. Hierdurch werden sämtliche Partikel, die den Boden erreichen, aus der weiteren Berechnung entfernt. Dies erzeugt einen zusätzlichen Konzentrationsgradienten, der die Diffusion zum Boden verstärkt. Abbildung 5.9 demonstriert auf anschauliche Weise den möglichen Fehler von ISDD, wenn die adhäsiven Eigenschaften eines Systems, in dem Partikeln nur schlecht an der Oberfläche des Bodens/der Zellen adsorbieren, nicht berücksichtigt werden. Lediglich bei den sehr großen 500 nm Partikeln sind die Unterschiede zwischen *non-sticky* Berechnungen im DG Modell und ISDD weniger stark ausgeprägt, da Diffusion mit zunehmender Partikelgröße weniger ins Gewicht fällt.

Der entwicklungstechnische Fortschritt des DG Modells [8] liegt also in der groben Implementierung dieser Effekte durch die Einführung der *stickiness* in Form der Langmuirschen Gleichgewichtskonstante. Jedoch wird diese als allgemeine Adsorptionseigenschaft des betrachteten Systems bestehend aus Oberfläche und Partikel betrachtet, d.h. die gesamte Oberfläche wird als stark oder schwach adsorbierend betrachtet (je nach gewählter *stickiness*). Dies ist aber nicht konsistent mit den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen und der darauf aufbauenden Hypothese der Adsorption an individuelle Dockingplätze. Ein Indiz dafür liefert der Ausreißer in Abbildung 5.10 (schwarzes volles dreieckiges Symbol). Hier wurde eine vergleichsweise hohe Flächendichte vom DG Modell vorhergesagt, während die tatsächlich gemessene Flächendichte viel kleiner ausfiel. Das Problem liegt darin, dass sämtliche Partikel, die sich am Ende der Exposition im untersten Segment befinden (vgl. Kapitel 3.2.2), als deponiert angenommen werden, und sich aus diesen die zu erwartende Flächendichte berechnet. Die angenommene hohe Adsorptionsstärke der Oberfläche ($K_D = 10^{-9} \text{ mol/L}$) in Kombination mit der hohen Konzentration von $50 \mu\text{g/mL}$ in diesem Versuch führt dazu, dass in der Simulation sehr viele Partikel im untersten Segment verbleiben und nicht zurück diffundieren können, sodass das DG Modell die deponierte Partikelmenge drastisch überschätzt. Dies spricht dafür, dass tatsächlich nur eine beschränkte Anzahl Dockingplätze verfügbar sein muss.

Dennoch beschreiben sowohl *sticky* als auch *non-sticky* Randbedingungen die gemessene Deposition auf die unterschiedlichen Oberflächen ansonsten überraschend gut, insbesondere wenn die Standardabweichungen der gemessenen Flächendichten und die abgeschätzten Unsicherheiten der berechneten Flächendichten in die Bewertung einbezogen werden (vgl. Abbildungen 5.10–5.12). Insofern kann der *stickiness* des DG Modells eine gewisse Validierung durch die hier durchgeführten REM Versuche zugesprochen werden. K_D bleibt jedoch eine eher schwammige Größe, da eine experimentelle Bestimmung derzeit nicht möglich ist und ihre Festlegung daher auf Schätzungen und

Annahmen beruht. In Verbindung mit der zuvor aufgestellten Dockingplätze-Hypothese müsste die *stickiness* auch uminterpretiert werden, nämlich als eine Art Maß für die zur Verfügung stehenden Dockingplätze.

In Anbetracht der grundsätzlichen Einfachheit des Modells lässt sich festhalten, dass das DG Modell bereits gute Anhaltspunkte für die Planung von *in-vitro*-Experimenten liefert. Dennoch stellt es nach wie vor keinen Ersatz für die Messung der tatsächlich deponierten Dosis dar, denn zum einen ist in Ermangelung einer profunden Messmethode die Abschätzung der korrekten *stickiness* im Vorfeld eines Versuches sehr schwierig, zum anderen scheinen die Simulationen sehr empfindlich auf Messungenauigkeiten des hydrodynamischen Durchmessers zu sein. Insbesondere bei kleinen Partikeln und hohen Konzentrationen macht sich dies bemerkbar, weshalb in solchen Fällen eine präzisere Kenntnis des hydrodynamischen Durchmessers absolut notwendig ist. Und schließlich können bei derart komplexen biologischen Systemen jederzeit unerwartete Effekte auftreten, die nur experimentell beobachtbar sind.

5.4 Auswirkungen des Weglassens von fötalem Rinderserum auf die Deposition von SiO_2 -Nanopartikeln

Neben den in Kapitel 5.2 durchgeführten regulären Depositionsexperimenten wurden auch mehrere Versuche durchgeführt, in denen das CCM der verwendeten Partikelsuspension nicht um 10 % FBS ergänzt wurde. Es ist bekannt, dass das Hinzufügen von Serumproteinen zu einer Verringerung der Aufnahme von Silika-NP durch Epithelzellen führt [59]. Auch für Nanopartikel aus anderen Materialien wie Polystyrol oder Kohlenstoff werden gleiche Beobachtungen berichtet [142, 143]. Insofern dient der Vergleich von Experimenten ohne den Zusatz von FBS zum CCM („-FBS“-Proben) mit den zuvor diskutierten regulären Experimenten mit zugesetzten FBS („+FBS“-Proben) dazu, Indizien für oder wider eine Partikelaufnahme als mögliche Ursache der zellulären und interzellulären Unterschiede zu erhalten. Die Resultate der -FBS-Experimente werden im Folgenden vorgestellt.

5.4.1 Experimentelle Beobachtungen

Abbildung 5.13 zeigt typische SE-REM-Aufnahmen von interzellulären (a,c,e) und zellulären (b,d,f) Flächen von Versuchen ohne FBS. In Abbildung 5.13a,b wurden 100 nm NP verwendet, in Abbildung 5.13c,d 200 nm SMP und in Abbildung 5.13e,f 500 nm SMP, alle mit $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Eingabekonzentration und 4 h Expositionsdauer. In den weiß eingerahmten Kästen in jedem Bild wird die Vergrößerung eines ausgewählten Ausschnitts des jeweiligen Bildes gezeigt.

Bei den beiden Proben mit 100 und 200 nm Partikeln (Abbildung 5.13a-d) lässt sich eine gravierende Partikelagglomeration beobachten. Die Agglomerate haben dabei unterschiedlichste Größen, wie in den jeweiligen Vergrößerungen in Abbildung 5.13a-d zu erkennen ist. Sie reichen von Zusammenschlüssen einiger weniger Partikel bis hin zu großen Anhäufungen vieler hundert Partikel. Mit der starken Agglomeration geht aber auch eine entsprechend umfangreiche Deposition einher, die eine quantitative Auswertung der Proben weder zellulär noch interzellulär erlaubt. Die Auswirkungen des Fehlens von FBS werden besonders deutlich, wenn die Bilder in Abbildung 5.13 mit repräsentativen Aufnahmen der analog mit FBS durchgeführten Versuche verglichen werden, in welchen die Deposition bereits als verhältnismäßig stark einzustufen ist (vgl. Abbildung A.5.1a-d im Anhang).

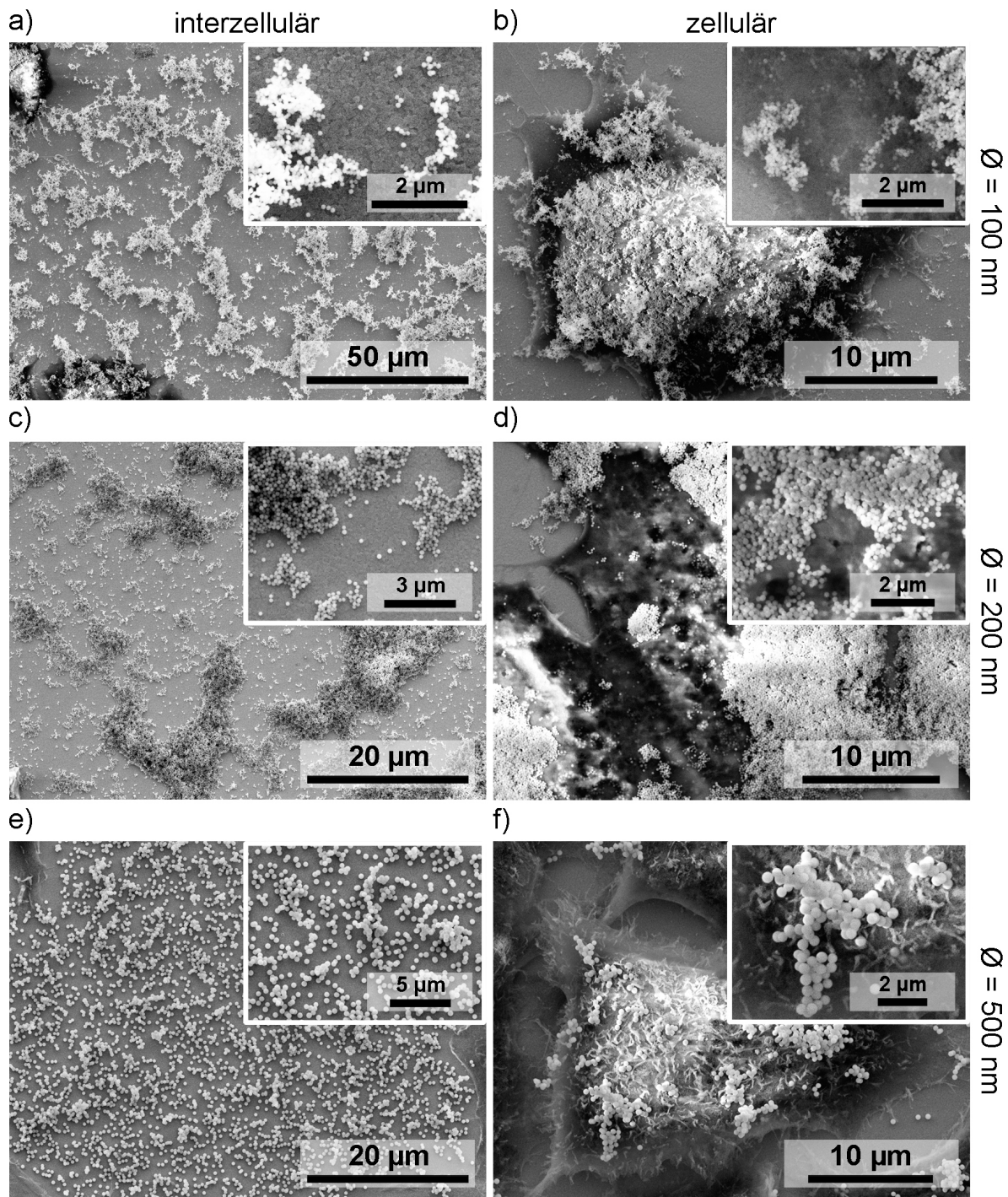


Abbildung 5.13. Repräsentative SE-REM-Aufnahmen von interzellulären (a,c,e) und zellulären (b,d,f) Flächen eines vierstündigen -FBS-Versuches, durchgeführt mit einer Eingabekonzentration von $50 \mu\text{s}/\text{mL}$, für 100 nm NP (a,b), 200 nm SMP (c,d) und 500 nm SMP (e,f). Weiß eingerahmt sind Vergrößerungen ausgewählter Bereiche des jeweiligen Bildes.

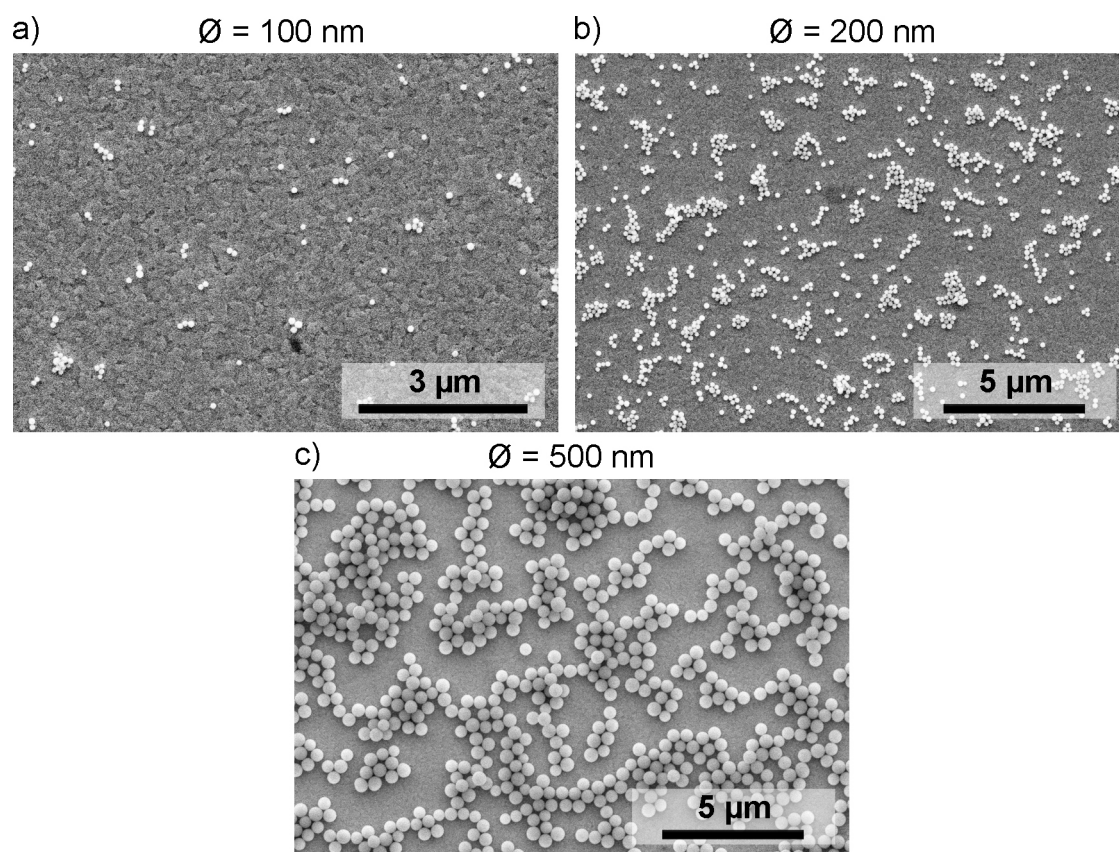


Abbildung 5.14. Repräsentative SE-REM-Aufnahmen zellfreier *-FBS*-Versuche auf mit regulärem CCM vorbeschichteten ITO-Substraten. 4 h Exposition mit (a) 100 nm SiO₂-NP bei 7 µg/mL Eingabekonzentration, (b) 200 nm SiO₂-SMP bei 50 µg/mL Eingabekonzentration und (c) 500 nm SiO₂-SMP bei 109 µg/mL Eingabekonzentration.

Bei 500 nm Partikeln ist die Agglomeration schwächer ausgeprägt, wie in Abbildung 5.13e,f zu sehen ist. Die Vergrößerungen zeigen, dass die größten Agglomerate nur einige Dutzend Partikel enthalten. Der Großteil der deponierten Partikel aber ist in Verbänden von wenigen Partikeln oder sogar als einzelne Partikel vorzufinden. Dennoch ist auch in diesem Fall die Deposition *-FBS* stärker als im analog mit *FBS* durchgeführten Experiment (vgl. Abbildung A.5.1e,f im Anhang).

Auch in Abwesenheit von Zellen zeigt sich der Einfluss des Fehlens von *FBS* klar. In Abbildung 5.14 sind charakteristische SE-REM-Aufnahmen zellfreier Experimente mit gewöhnlichem CCM ohne *FBS* gezeigt. Die Expositionsdauer betrug 4 h. Abbildung 5.14a zeigt deutlich mehr 100 nm NP (Eingabekonzentration 7 µg/mL) auf dem Substrat liegend als es mit *FBS* der Fall ist (vgl. Abbildung A.5.2a im Anhang). Auch ist die Häufigkeit von Agglomeraten höher als mit *FBS*, wo vornehmlich einzelne Partikel detektiert werden. Auch bei 200 nm SMP (Eingabekonzentration 50 µg/mL) ist bei *-FBS* (Abbildung 5.14b) eine viel höhere Deposition und Agglomeration zu beobachten als bei *+FBS* (vgl. Abbildung A.5.2d im Anhang). Gleiches gilt auch für die in Abbildung 5.14c gezeigten 500 nm SMP (Eingabekonzentration 109 µg/mL). Mit *FBS* ist bei den größten Partikeln zwar auch schon eine geringe Agglomeration zu beobachten (vgl. Abbildung A.5.2g im Anhang), jedoch hält sie sich die Gesamtmenge deponierter Partikel noch im quantifizierbaren Rahmen.

5.4.2 Diskussion

Durch die Gegenüberstellung der –FBS-Resultate mit +FBS-Ergebnissen soll die mögliche Aufnahme von SiO_2 -Partikeln durch die Zellen untersucht werden. Da durch die Hinzugabe von Proteinen ins CCM die Partikelaufnahme reduziert wird [59], müsste durch das Weglassen der Serumproteine in den –FBS-Versuchen eine geringere effektive Dosis auf der Partikeloberfläche vorliegen als im Fall +FBS, vorausgesetzt die Depositionskinetik ist in beiden Fällen die Gleiche. Bei vergleichbaren Flächendichten auf den Zellen, sowohl bei –FBS als auch bei +FBS, könnte folglich Partikelaufnahme ausgeschlossen werden.

Leider wurden dabei zwei Faktoren unterschätzt. Die Abwesenheit von Serum führt zu einer stärkeren Adhäsion von SiO_2 -NP an A549-Zellen [135] und zu einer deutlich stärkeren Partikeldeposition [5]. Das bedeutet, es erreichen beim Fehlen von FBS viel mehr Partikel die Zellen als im Fall mit FBS, wie in Abbildung 5.13 auch zu sehen ist. Die extreme Anhäufung von Partikeln in den Versuchen ohne Serum verhindert deshalb eine mögliche Aussage über etwaige Partikelaufnahme in den Versuchen mit Serum.

Wie der Vergleich der Ergebnisse ohne Serum (Abbildung 5.13) und mit Serum (Abbildung A.5.1 im Anhang) zeigt, führt das Weglassen von Serumproteinen bei allen drei Partikelklassen zur verstärkten Bildung von Agglomeraten. Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Studien zum Agglomerationsverhalten von Nanopartikeln. So zeigten Gualtieri et al. [58], dass 30 und 50 nm große SiO_2 -NP mikrometergroße Agglomerate in Abwesenheit von Rinderalbumin (bovine serum albumin, BSA) bilden. BSA ist ein Protein, das im Blut von Kühen vorkommt und ein wesentlicher Bestandteil von FBS ist. Das Hinzufügen von 0,1 % BSA hingegen führt bereits zu einem deutlichen Rückgang der Agglomeration. Auch Humanalbumin, das menschliche Pendant zu BSA, stabilisiert nachweislich 30 nm große Silber-NP und verhindert deren Agglomeration [65].

Die Tatsache, dass alle Partikel bei DLS-Messungen in Wasser stabil sind (vgl. Kapitel 5.1), spricht eigentlich gegen eine Agglomeration im reinen CCM ohne FBS, da im Wasser auch keine Proteine vorliegen. Agglomeration im DMEM (das in dieser Arbeit verwendete CCM) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da das DMEM möglicherweise das ζ -Potential der Partikel soweit verändern kann, dass es doch zur Agglomeration kommt. DLS-Messungen in DMEM ohne FBS liegen leider nicht vor.

Aus physikalischer Sicht ist eine Agglomeration der Partikel im CCM ohne FBS die einzige sinnvolle Erklärung der stark erhöhten Deposition. Durch Agglomeration gewinnt die gravitationsgetriebene Sedimentation stark an Bedeutung, da die Sedimentationsgeschwindigkeit V proportional zum Quadrat des Objektdurchmessers d_P ist (vgl. Kapitel 3.2.1, Gleichung 3.6) Bereits ein Zusammenschluss weniger Partikel führt zu einem deutlich größeren Objektdurchmesser und damit zu einer viel größeren Sedimentationsgeschwindigkeit, zumal der entscheidende hydrodynamische Durchmesser von Agglomeraten nochmals größer ist. Wie empfindlich *in-vitro*-Systeme auf Variationen des hydrodynamischen Durchmessers sind wurde bereits in Abschnitt 5.3.2 diskutiert.

Darüber hinaus ist auch unter serumfreien Bedingungen ein zellulärer Einfluss auf die Deposition erkennbar: ein qualitativer Vergleich der Bilder in Abbildung 5.13 und 5.14 zeigt, dass deutlich weniger Silika-Partikel in zellfreien Versuchen als in Versuchen mit Zellen auf dem nur mit regulärem Medium beschichteten zellfreien Substrat liegen bleiben. Dies ist vermutlich der gleiche Effekt, wie er bereits in Abschnitt 5.2.2 bei zugesetzten Serumproteinen beobachtet und diskutiert wird. Dieser zelluläre Einfluss auf den Partikeltransport konnte in Abwesenheit von Serum erst kürzlich in einer Studie von Halamoda-Kenzaoui [5] beobachtet werden, in der auf dem Boden leerer Polystyrol *wells* nur ein Bruchteil der deponierten Menge von Silika-NP gefunden wurde, die auf einer Monolage A549-Zellen zu finden war.

Schließlich soll noch kurz auf die Bedeutung der –FBS-Ergebnisse in Bezug auf die Simulationen eingegangen werden. Während die berechneten effektiven Dosen in einem akzeptablen Rahmen zu den +FBS gemessenen Flächendichten passen (vgl. Abschnitt 5.3), ist das beim Weglassen des Serums aufgrund der stark erhöhten Deposition nicht mehr der Fall, trotz identischer Versuchsbedingungen. Auch wenn die –FBS-Versuche nicht quantitativ ausgewertet werden konnten, ist klar, dass die deponierten Partikeldichten drastisch unterschätzt werden. Auch eine Erhöhung der *stickiness* auf K_D Werte mehrere Größenordnungen unterhalb von 10^{-9} mol/L (d.h. eine deutliche Erhöhung der möglichen relative Bedeckung f der Oberfläche) erbrachte in einem Test keine weitere Erhöhung der berechneten Deposition. Wie zuvor erwähnt ist der entscheidende Parameter in diesem Fall wahrscheinlich der hydrodynamische Durchmesser der Agglomerate im CCM. Ohne eine präzise Kenntnis seiner Dimension ist eine Verwendung der Simulationen für serumfreie *in-vitro*-Versuche auszuschließen, was den möglichen Einsatzbereich beider Modelle deutlich einschränkt.

5.5 Untersuchung möglicher Inkorporation von SiO_2 -Nanopartikeln durch A549-Zellen

Die in Kapitel 5.2 behandelten Unterschiede zwischen zellulär und interzellulär gemessenen Flächendichten könnten darauf zurückzuführen sein, dass Partikel durch die Zellen aufgenommen werden und deshalb nicht mehr an der Zelloberfläche nachweisbar sind. Da aus serumfreien Versuchen darüber keine Aussage getroffen werden kann, wurde die potentielle Aufnahme von Silika-Partikeln in Zellen mit einem kombinierten FIB/REM-System untersucht. Dabei werden die Zellen schichtweise aufgeschnitten und analysiert. Ferner wurden zur weiteren Bestätigung Dünnschnittproben mittels STEM untersucht.

5.5.1 Focused-Ion-Beam-Tomografie von ganzen Zellen

Abbildung 5.15 zeigt beispielhaft zwei im iSPI™-Verfahren (s. Abschnitt 4.3) erstellte SE-REM-Aufnahmen von aufgeschnittenen A549-Zellen. Die Querschnittsansichten zeigen die Glassubstrate im Vordergrund und darauf die dünnen ITO-Schichten mit etwas hellerem Kontrast. Darüber eröffnet sich der Blick ins Innere der Zellen, jedoch lassen sich Details nur schwer identifizieren. Lediglich ein Teil des Zellkerns in Abbildung 5.15a (weiße Markierung) hebt sich klar vom Rest der Zelle ab, da er deutlich dichter ist. In Abbildung 5.15a sind einige 200 nm Silika-Partikel auf der Zelloberfläche zu erkennen (s. z.B. gelbe Markierung), aber nur ein Partikel innerhalb (grüne Markierung). Gleiches gilt für die 100 nm NP in Abbildung 5.15b. Der gelbe Kreis markiert ein Partikel auf der Zelloberfläche, der grüne Kreis ein Partikel im Inneren. Die Bilder vermitteln eine gute Vorstellung über die Schwierigkeit der Erkennung von Partikeln im Inneren einer Zelle. Ursache ist die starke Topografie der zellulären Ultrastruktur. Insgesamt ergab die Untersuchung von 15 Zellen, dass im Allgemeinen nahezu keine Silika-Partikel von A549-Zellen aufgenommen werden.

Zuletzt seien noch die Beschädigungen der Zellmembran in Form von zahlreichen Löchern erwähnt, welche in den für Quantifizierungsstudien in Kapitel 5.2.1 erstellten Bildern nicht zu sehen sind. Erst durch die bessere Leitfähigkeit der Oberfläche aufgrund der Beschichtung mit Kohlenstoff lassen sie sich erkennen. Das Ausmaß der Beschädigungen ist von Probe zu Probe unterschiedlich, weshalb hier von einem Präparationsproblem auszugehen ist. Wahrscheinlichste Ursache ist ein unzureichender Austausch von Wasser und Ethanol während der Entwässerung. Infolge dessen verdampfen bei der KPT etwaige Rückstände von Wasser, ohne den kritischen Punkt erreicht zu haben, was zu den beobachteten Beschädigungen der Zellmembran führt.

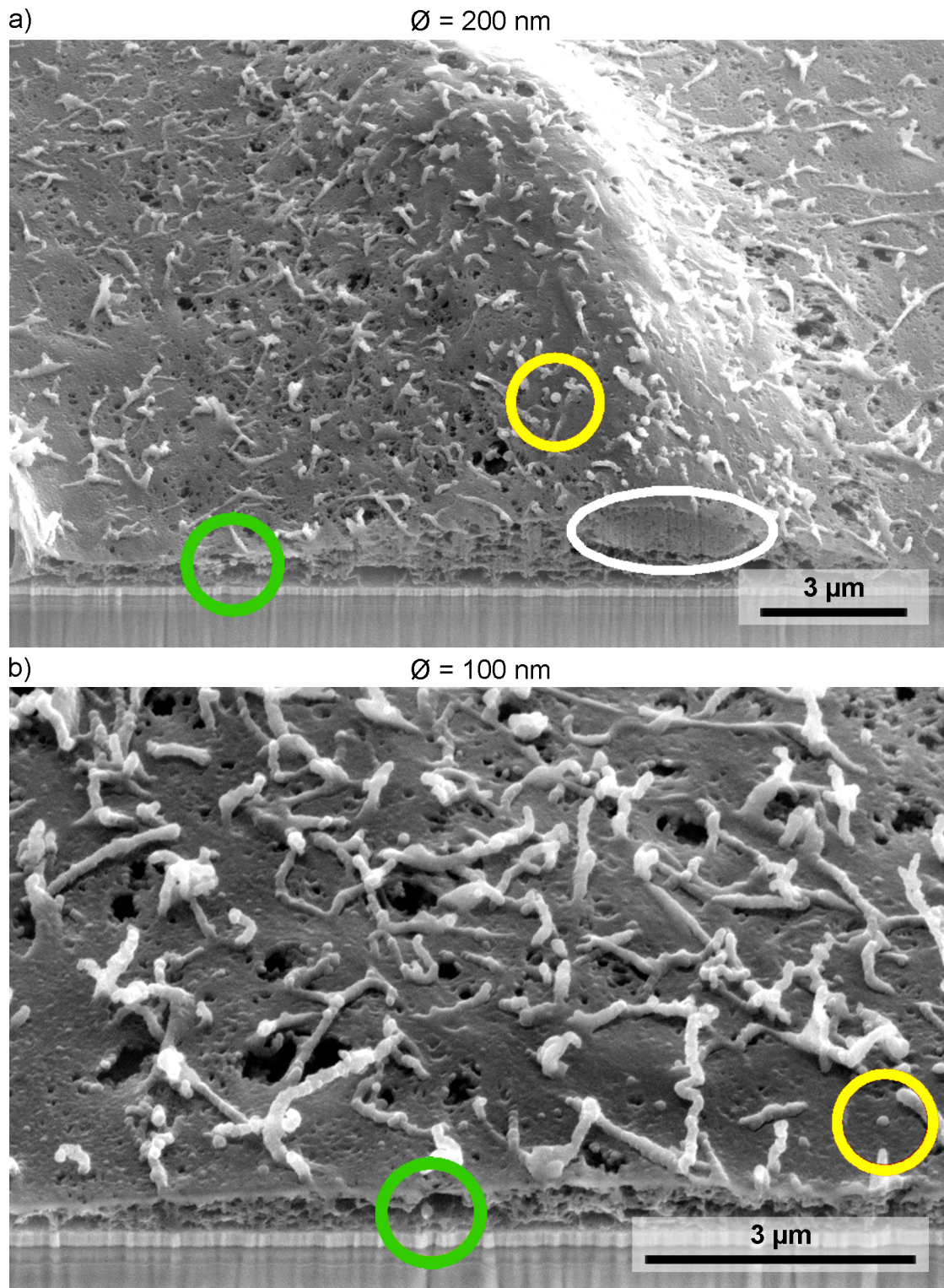


Abbildung 5.15. Exemplarische SE-REM-Bilder mittels FIB aufgeschnittener A549-Zellen mit SiO_2 -Partikeln in (grüne Markierungen) und auf (gelbe Markierungen) der jeweiligen Zelle: a) 200 nm SMP, b) 100 nm NP. Entstanden am FIB/REM-System FEI Strata 400.

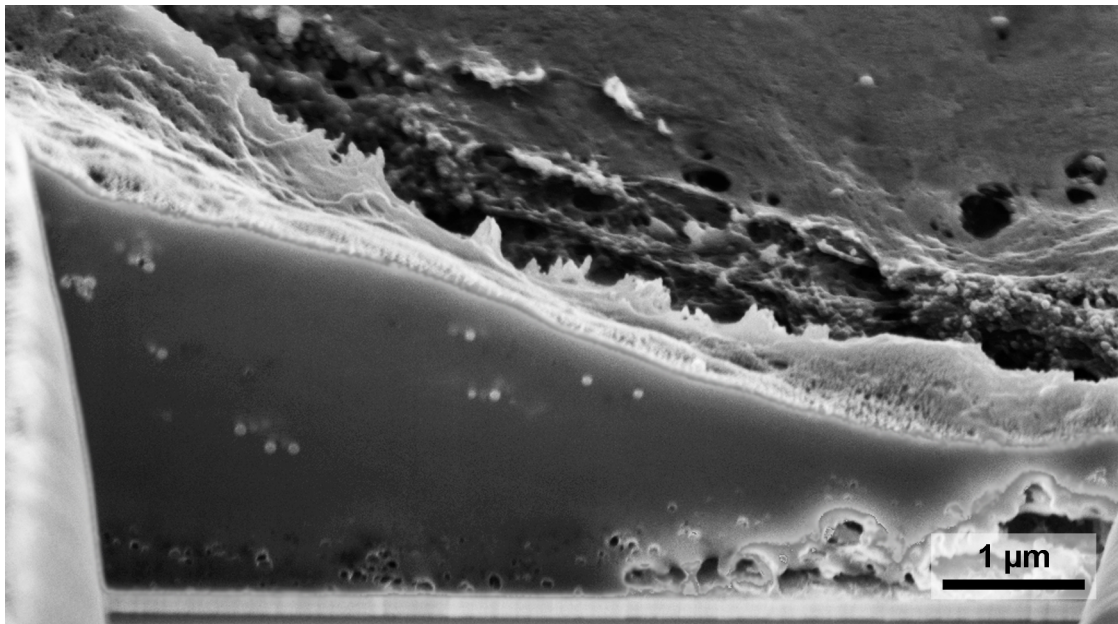


Abbildung 5.16. SE-REM-Aufnahme des Randbereiches einer dichten A549-Zelle mit zahlreichen, sichtbaren 100 nm großen SiO_2 -Partikeln, aufgenommen am FIB/REM-System Zeiss Crossbeam.

Da an der FEI Strata 400 kein BSE-Detektor zur Verfügung steht, ist es nicht möglich, sich hier Materialkontrast zunutze zu machen. Beim Versuch die Zelltomografie an einer Zeiss Crossbeam durchzuführen, fanden sich in einigen Zellen überraschenderweise große Mengen von Silika-Partikeln. Ein Beispiel ist in Abbildung 5.16 zu sehen. Auffällig ist das massive Erscheinungsbild des Inneren der Zelle, was die einfache Erkennung der Partikel erst möglich macht.

In den Abbildungen 5.17 und 5.18 wird dieser spezielle A549-Zelltyp mit regulären A549-Zellen verglichen, um die Unterschiede hervorzuheben.

Abbildung 5.17a zeigt nochmals ein Beispiel eines Querschnittes besagter spezieller Zellen mit mehreren 100 nm SiO_2 -NP im Inneren (weiß hervorgehoben). Auch lassen sich einzelne Poren erkennen. Die abgebildete Zelloberfläche weist keine feinen Pseudopodien mehr auf und erscheint allgemein eher hügelig und glatt. Wie in Abbildung 5.15 sind auch hier einzelne Löcher in der Zellmembran zu erkennen. Aufgrund ihres massiven Erscheinungsbildes im Inneren werden diese Zellen im Folgenden als *dichte* Zellen bezeichnet.

Reguläre Zellen dagegen erscheinen im FIB-Querschnitt durch die Ultrastruktur des Zellinneren leicht und „luftig“ (s. Abbildung 5.17b). Ausnahme bildet hier der Zellkern (weiße Markierung), der Ähnlichkeit mit den *dichten* Zellen hat, jedoch eine deutlich höherer Porosität aufweist. Anders als in den *dichten* Zellen ist aber in keinem Zellkern der regulären Zellen ein SiO_2 -Partikel nachweisbar gewesen. Die Zelloberfläche in Abbildung 5.17b weist zahlreiche typische Pseudopodien auf, jedoch ist die Zellmembran in diesem Fall sehr stark beschädigt. Auch hierfür ist Restfeuchtigkeit in der Zelle während der KPT die wahrscheinlichste Ursache.

In Abbildung 5.17c wird ein weiterer A549-Zelltyp präsentiert, der vereinzelt anzutreffen ist und wie eine Zwischenform der beiden erstgenannten anmutet. Aufgrund des teilweise dichten, teilweise regulären Erscheinungsbildes im Querschnitt werden sie als *semi-dicht* bezeichnet. Auf der Oberfläche der dargestellten Zelle sind nur wenige Pseudopodien zu erkennen, jedoch einige 200 nm große Silika-Partikel und wiederum mehrere Löcher in der Zellmembran.

Wie bereits angedeutet lassen sich die A549-Zelltypen auch oberflächlich klar unterscheiden. In Abbildung 5.18 werden SE-Übersichtsaufnahmen jeweils eines typischen Vertreters seines Zelltyps

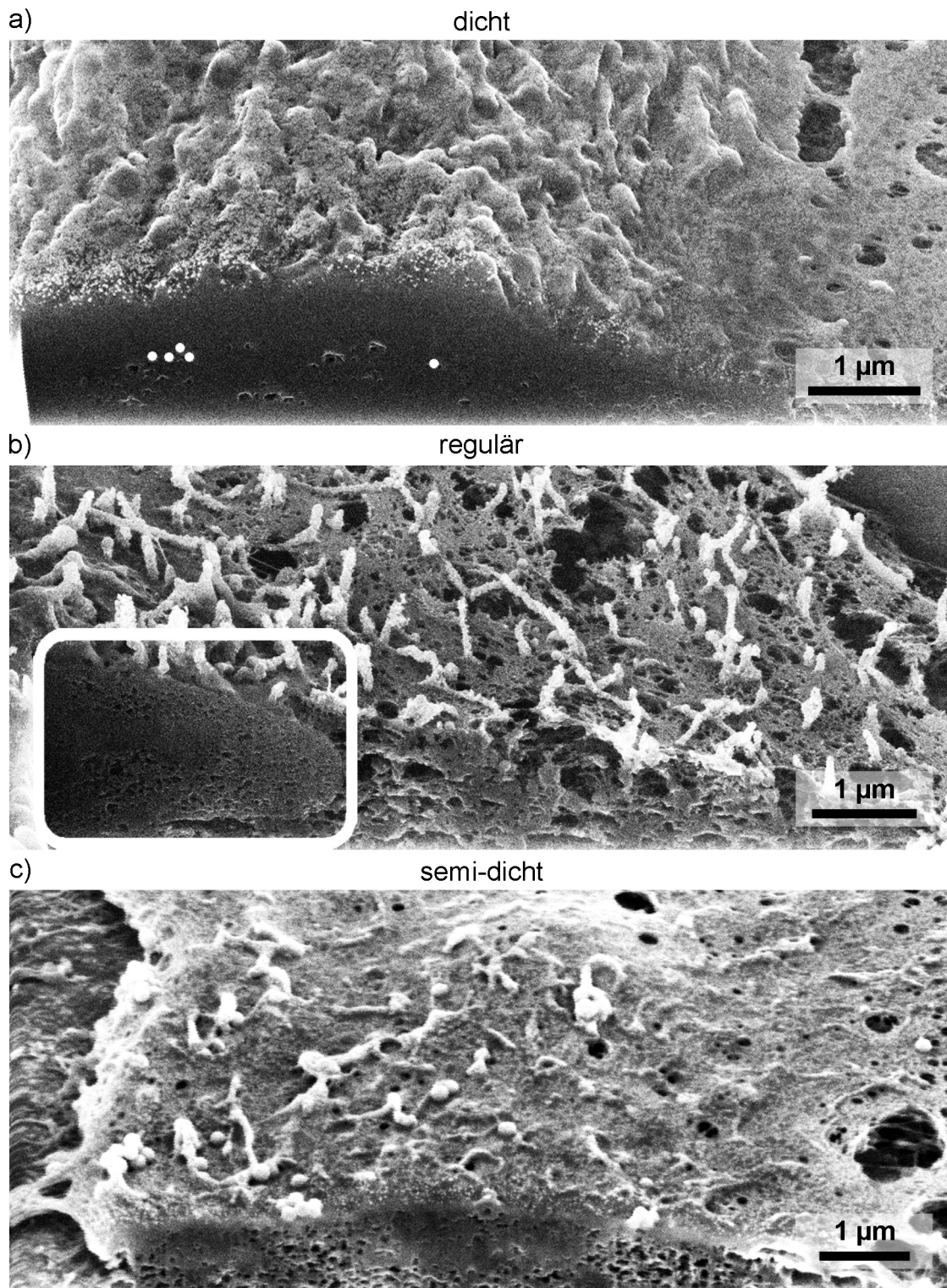


Abbildung 5.17. SE-REM-Aufnahme mittels FIB aufgeschnittener A549-Zellen, welche die unterschiedlichen Erscheinungsbilder der drei beobachteten A549-Zelltypen demonstrieren: a) dichte Zelle mit 100 nm NP im Inneren (weiß hervorgehoben zur besseren Sichtbarkeit), b) reguläre Zelle und c) semi-dichte Zelle. Der weiße Rahmen in (b) markiert den Zellkern. In (a,b) wurden die Zellen mit 100 nm SiO_2 -NP exponiert, in (c) mit 200 nm SiO_2 -SMP.

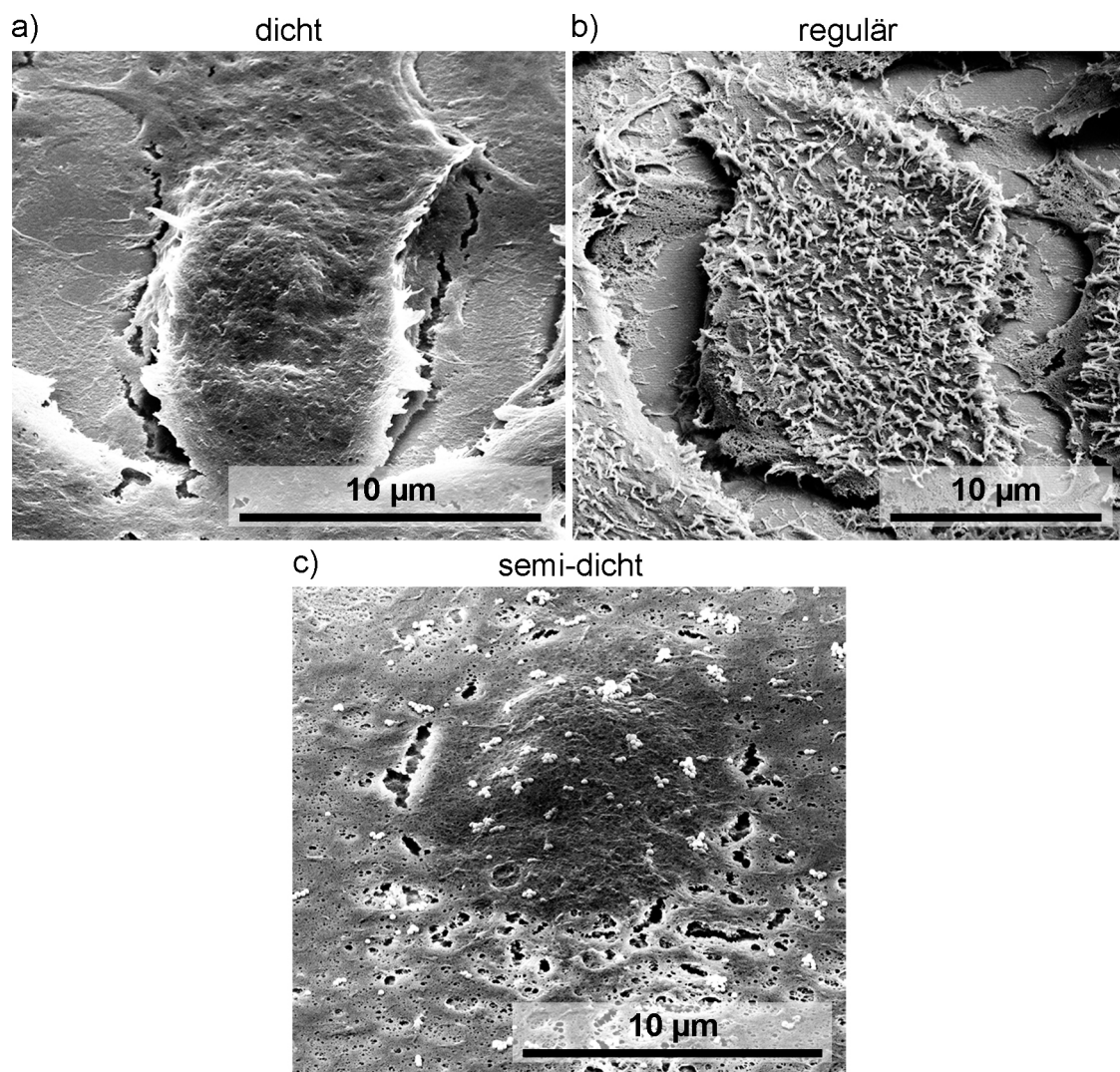


Abbildung 5.18. Gekippte SE-REM-Aufnahmen der drei unterschiedlichen Zelltypen: a) dichte Zelle mit glatter Oberfläche, b) reguläre Zelle mit starker Topografie, c) semi-dichte Zelle mit glatter Oberfläche.

gezeigt. *Dichte* Zellen haben eine glatte, flache Oberfläche (Abbildung 5.18a), wohingegen reguläre Zellen zahlreiche Pseudopodien auf der Oberfläche haben, die ihnen eine starke Topografie verleihen (Abbildung 5.18b). *Semi-dichte* Zellen weisen ebenfalls eine sehr glatte Oberfläche auf (Abbildung 5.18c), was deren Artverwandtschaft mit den *dichten* Zellen bekräftigt. Wie aber in Abbildung 5.17c bereits gezeigt wurde, können auch sie noch einzelne Pseudopodien haben. Die in den Abbildungen 5.18a,c sichtbaren Risse sind wie die vielen Löcher in den Zellmembranen Artefakte der kritischen Punkt Trocknung, hervorgerufen durch die Schrumpfung der Zellen während des Trocknens [144].

Aufgrund der äußerlich unterschiedlichen Erscheinungsbilder zeigen die *dichten* und *semi-dichten* Zellen auch bei niedrigeren Vergrößerungen im Rasterelektronenmikroskop einen von regulären Zellen abweichenden Kontrast. In Abbildung 5.19a sind links *dichte* Zellen zu sehen und im rechten Teil des Bildes reguläre Zellen, getrennt von einer gelben Linie. Aufgrund der starken Topografie liefern die regulären Zellen ein viel stärkeres SE-Signal als die *dichten* Zellen, bei denen nur der Bereich des Zellkerns aufgrund von Aufladung hell abgebildet wird. Abseits der Kerne sind die *dichten* Zellen kaum vom Substrat zu unterscheiden, regelrecht schwarz. Auch bei den regulären

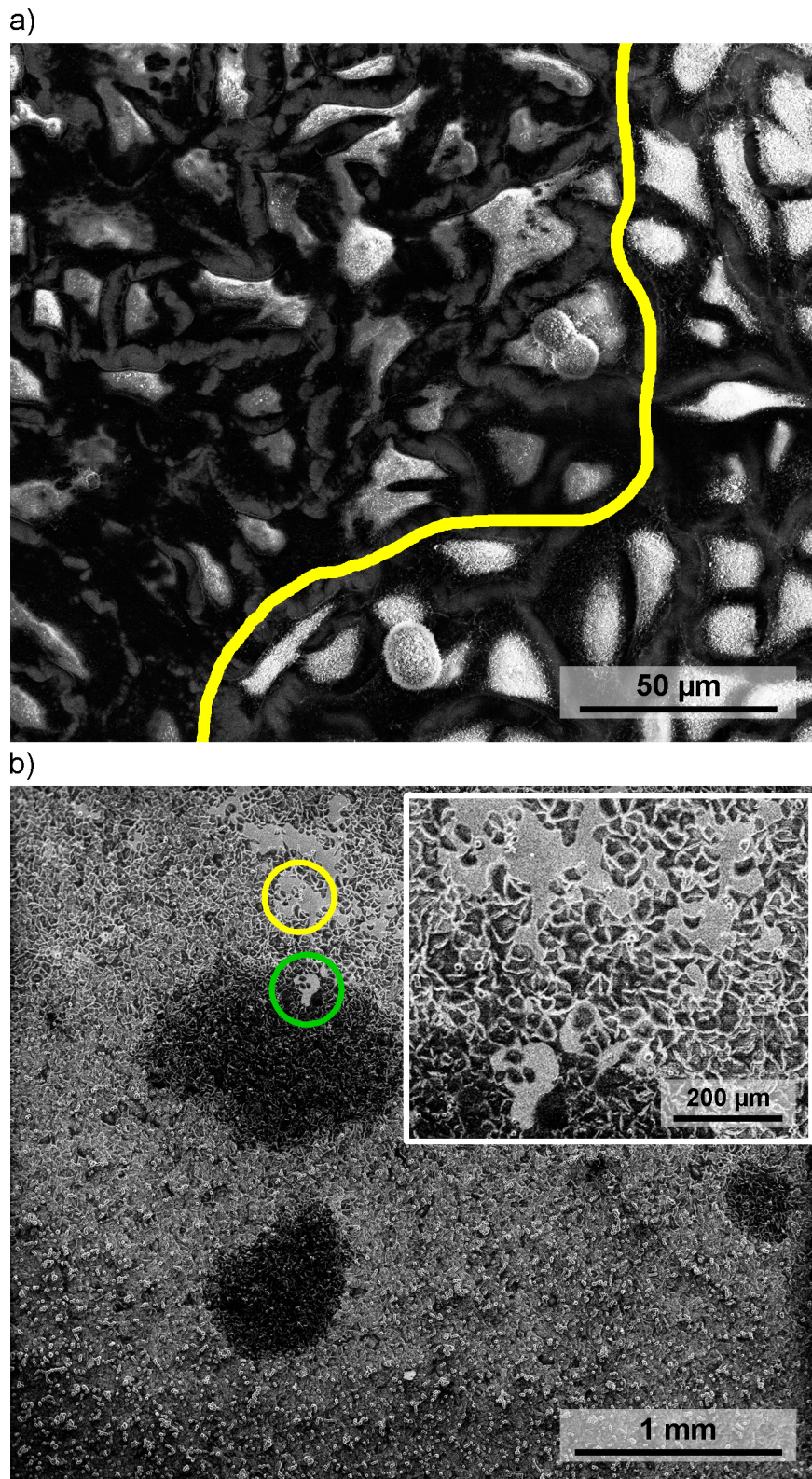


Abbildung 5.19. a) SE-REM-Aufnahme zeigt stark unterschiedlichen Kontrast zwischen dichten Zellen (mit vorwiegend dunklem Kontrast) und normalen Zellen (mit großteils hellem Kontrast). Gelbe Linie stellt ungefähr die Grenze zwischen den beiden Zelltypen dar. b) Schwarze Flecken auf ITO-Substrat aufgrund des dunkleren Kontrastes dichter Zellen. Grüner Kreis markiert freie Substratfläche inmitten dichter Zellen, welche keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zum Substrat in Umgebung normaler Zellen (gelber Kreis) zeigt. Bildausschnitt oben rechts zeigt Vergrößerung des Bereichs um die grüne und gelbe Markierung.

Zellen zeigen die Randbereiche dunklen Kontrast, jedoch sind diese Bereiche deutlich kleiner. Sofern sich die *dichten* Zellen auf einen endlichen Bereich beschränken, resultiert daraus bei sehr geringen Vergrößerungen der Eindruck von schwarzen Flecken auf der Probe. In Abbildung 5.19b sind drei solcher schwarzen Flecken zu sehen. Grün markiert ist ein Stück freie Substratfläche innerhalb des Flecks. Verglichen mit dem ebenfalls sichtbaren Substrat zwischen regulären Zellen (gelbe Markierung), ist keinerlei Unterschied, keine Verfärbung des Substrats innerhalb des Flecks zu erkennen. Die Vergrößerung dieser Bereiche in Abbildung 5.19b macht diesen Sachverhalt nochmals deutlicher. Damit ist gezeigt, dass der dunklere Kontrast der *dichten* Zellen im Vergleich zum helleren Kontrast der regulären Zellen nicht von etwaigen Kontaminationen des Substrats herrührt.

5.5.2 Rastertransmissionselektronenmikroskopie von zellulären Dünnschnitten

Zahlreiche Dünnschnitte von in EPON eingebetteten A549-Zellen wurden mit dem Ziel der Bestätigung der FIB-Ergebnisse mittels STEM untersucht. Die Zellen wurden hierzu 100 nm, 200 nm und 500 nm SiO₂-Partikeln bei einer Eingabekonzentration von 50 µg/mL für 4 h exponiert.

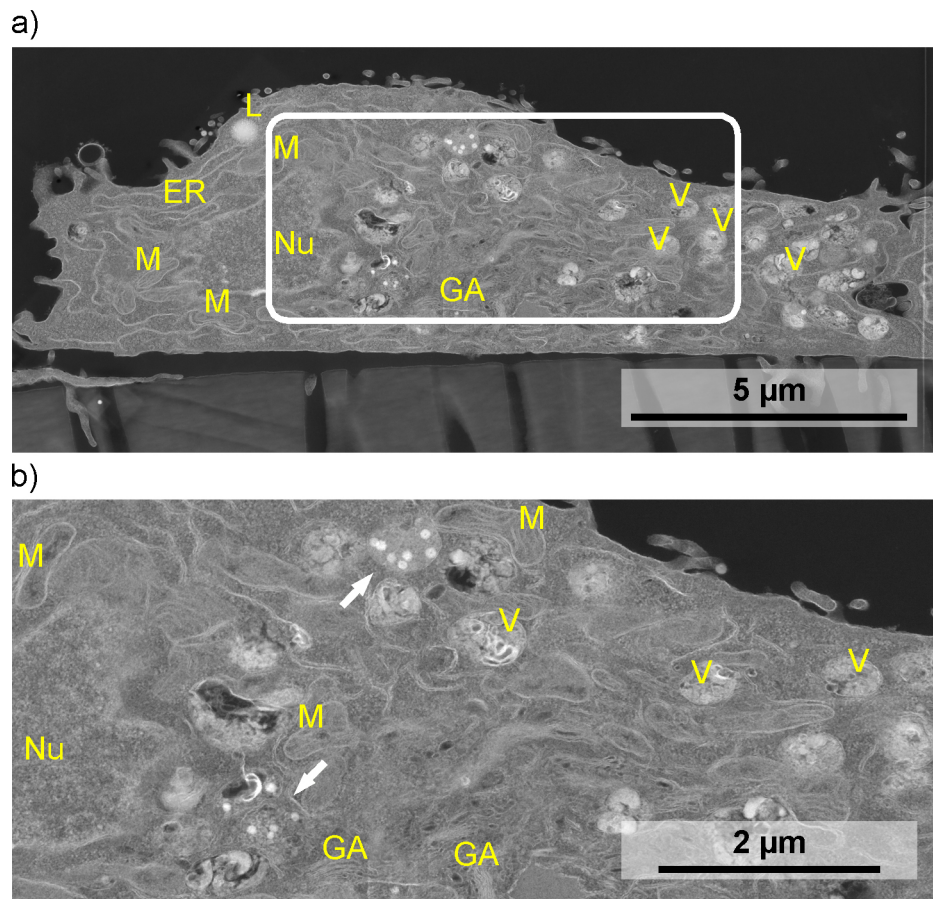


Abbildung 5.20. (a) 30 keV HAADF-STEM-Aufnahme eines Dünnschnitts einer A549-Zelle mit 17 inkorporierten 100 nm SiO₂-Nanopartikel. (b) Vergrößerungen des weiß umrandeten Ausschnitts in (a). Weiße Pfeile markieren die Positionen der Partikel innerhalb einer Zelle. Mit gelben Zeichen sind einige typische Organellen der Zelle markiert: Nu = Zellkern, M = Mitochondrium, GA = Golgi-Apparat, ER = Endoplasmatisches Retikulum, L = Fetttröpfchen, V=Vesikel.

Abbildung 5.20 zeigte eine repräsentative HAADF-STEM-Aufnahme eines Dünnschnitts einer A549-Zelle mit 100 nm SiO₂-Nanopartikeln. HAADF-STEM-Bilder zeigen besonders guten Mate-

rialkontrast. Durch die „Färbung“ der Zellen mit Osmiumtetroxid und Uranylacetat (vgl. Kapitel 4.1.4) lagern sich die Schwermetalle an zelluläre Strukturen an, sodass in HAADF-Aufnahmen die Ultrastruktur der Zellen detailliert sichtbar wird. So sind in Abbildung 5.20a gut zahlreiche Mitochondrien (M) und Vesikel (V) zu erkennen, von denen der Übersicht halber nicht alle markiert wurden. Im linken Teil ist ein Ausschnitt des Zellkerns (Nu) zu sehen sowie ein Fetttropfen (L). In der Vergrößerung in Abbildung 5.20b werden besonders Details innerhalb der einzelnen Organellen sichtbar, wie beispielsweise die Einstülpungen der inneren Membran der Mitochondrien. Ferner lassen sich auch gut die beiden Golgi Apparate (GA) erkennen. Die aufgenommenen SiO₂-NP sind ebenfalls sehr gut zu erkennen (weiße Pfeile in Abbildung 5.20b). Sieben NP befinden sich eingeschlossen in einem Vesikel (oberer Pfeil), während sich sechs weitere scheinbar frei im Cytoplasma gruppieren (unterer Pfeil). Am unteren Rand von Abbildung 5.20a ist die poröse Kunststoffmembran zu sehen, auf der die Zelle kultiviert wurde.

Insgesamt wurden 102 Zellquerschnitte hinsichtlich der aufgenommenen Silika-Partikel ausgewertet. Die Spanne der Anzahl gefundener Partikel in den Zellen ist dabei sehr breit. Ein Großteil (80 %) enthält zwischen null und vier Partikel. Eine repräsentative HAADF-STEM-Beispielaufnahme einer Zelle mit nur einem enthaltenen Partikel findet sich in Abbildung A.5.4 im Anhang. Weitere 10 % der Dünnschnitte weisen zwischen fünf und neun Partikel pro Zellquerschnitt auf (s. zum Beispiel Abbildung A.5.5 im Anhang). Die übrigen 10 % enthalten nachweislich 10 oder mehr Partikel in ihrem Inneren. Ein extremes Beispiel ist in Abbildung 5.20 gezeigt. Der dargestellte Zellquerschnitt enthält insgesamt 17 Nanopartikel.

Tabelle 5.2. Prozentuale Anteile von Zellquerschnitten einer Partikelklasse, die eine bestimmte Anzahl Partikel inkorporiert haben.

Anzahl Partikel pro Zellenquerschnitt	Anteil der Zellquerschnitte mit		
	100 nm NP	200 nm SMP	500 nm SMP
0	7 %	13 %	53 %
1–4	41 %	73 %	47 %
5–9	21 %	11 %	0 %
10+	31 %	3 %	0 %

Betrachtet man die Ergebnisse nach den einzelnen Partikelklassen aufgeschlüsselt, dann werden Unterschiede deutlich. In Tabelle 5.2 werden für jede Partikelgröße die prozentualen Anteile der Querschnitte, die eine bestimmte Anzahl von Partikeln beinhalten, zusammengefasst. So fällt auf, dass über die Hälfte der untersuchten Dünnschnitte mit 500 nm Partikeln keine Partikel in den Zellen aufweisen. Die Anteile bei 100 nm und 200 nm Partikeln sind deutlich kleiner (7 % und 13 %). Trotzdem gibt es auch bei den 500 nm SMP nachweislich eine geringe Aufnahme, da 47 % der betrachteten Zellquerschnitte 1–4 Partikel enthalten. Auch im Fall der 200 nm SMP weist der Großteil (73 %) der Dünnschnitte 1–4 Partikel pro Zelle auf. 100 nm NP dagegen tendieren dazu stärker aufgenommen zu werden, wie die größeren Anteile bei 5–9 und 10+ Partikel pro Zelle andeuten.

Diesen Resultaten können deutliche Tendenzen im Hinblick auf die Größenabhängigkeit der Partikelaufnahme entnommen werden. Die Häufigkeit von Zelldünnschnitten, die keine Partikel enthalten, steigt mit zunehmender Partikelgröße an, während die Anzahl mit verhältnismäßig vielen Partikeln (5–9) je Dünnschnitt abnimmt. Dies spricht für eine klar schlechtere Inkorporation der großen Submikropartikel gegenüber den kleineren Nanopartikeln.

Da Dünnschnitte immer nur einen Ausschnitt einer Zelle zeigen, ist die statistische Aussagekraft einzelner Schnitte sehr gering. Infolge dessen lassen sich die Ergebnisse nur eingeschränkt mit

den Zahlen der Depositionsversuche aus Kapitel 5.2 vergleichen. Abbildung 5.21 veranschaulicht schematisch, wie diese Vergleichbarkeit hergestellt werden soll.

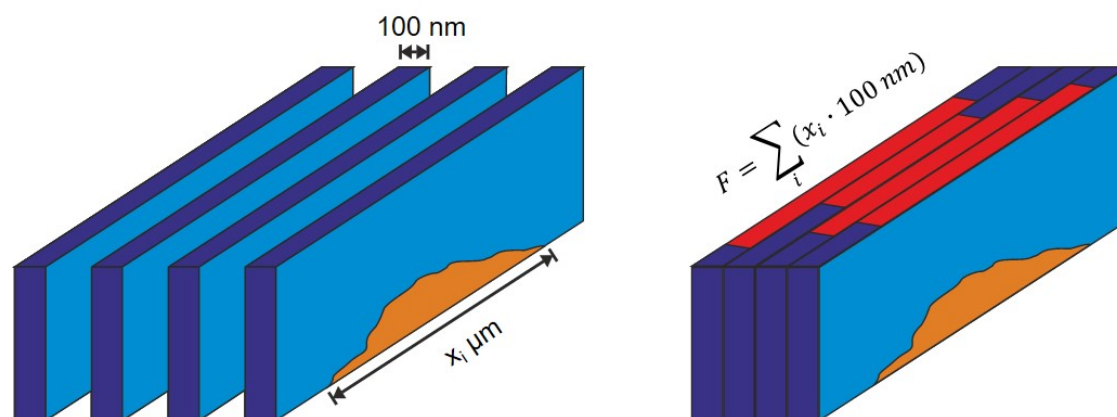


Abbildung 5.21. Schema zur Veranschaulichung der Umrechnung der STEM-Quantifizierung in Flächendichten durch Aufsummieren der projizierten Flächen einzelner Dünnschnitte (rote Flächen).

Zunächst wird die gesamte *projizierte Oberfläche* der in den Dünnschnitten abgebildeten Zellen auf eine imaginäre ebene Oberfläche über diesen bestimmt (rote Balken in Abbildung 5.21). Hierzu muss die Querschnittslänge x_i einer Zelle mit der Dicke des jeweiligen Dünnschnitts multipliziert werden. Die Summe dieser Projektionen bildet die gesamte *projizierte Oberfläche* und entspricht prinzipiell der Fläche, die aus REM-Aufnahmen in der Draufsicht gewonnen wird. Ferner werden pro Partikelklasse alle gezählten Partikel aufsummiert, sowohl intrazellulär (d.h. in den Zellen) als auch zellulär (d.h. unmittelbar auf der Oberfläche). Dividiert man diese mit der zugrundeliegenden *projizierten Oberfläche* erhält man eine *projizierte Flächendichte*.

Tabelle 5.3. Berechnete projizierte Flächendichten aus STEM-Messungen für jede Partikelklasse, verglichen mit mittels REM gemessenen Flächendichten nach 4 h Exposition bei 50 μg/mL.

Partikelklasse	berechnete Flächendichten in 1/μm ²			gemessene Flächendichten in 1/μm ²	
	in Zellen	auf Zellen	in & auf Zellen	zellulär	interzellulär
100 nm	1,89	0,22	2,11	1,04 ± 1,35	1,88 ± 0,41
200 nm	0,59	0,46	1,05	1,54 ± 1,07	1,93 ± 0,65
500 nm	0,32	0,80	1,12	0,60 ± 0,34	1,08 ± 0,20

Die Resultate dieser Berechnungen sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Zum Vergleich sind darüber hinaus die gemessenen interzellulären und zellulären Flächendichten des mit gleichen Parametern (4 h Exposition, 50 μg/mL Eingabekonzentration) durchgeführten Depositionsexperimentes enthalten, welches bereits in Abschnitt 5.2 diskutiert wurde. Mittels REM bestimmte zelluläre Werte lassen sich mit den berechneten projizierten Flächendichten von Partikeln auf den Zellen vergleichen und interzelluläre Werte der REM-Studien mit der gesamten projizierten Flächendichte von Partikeln in den Zellen als auch auf den Zellen.

- Bei 500 nm SMP passen die zellulär mit REM gemessenen Flächendichten recht gut zu den mittels STEM auf Zellen bestimmten projizierten Werten. Vergleicht man die interzellulär gemessenen Flächendichten mit der berechneten projizierten Flächendichte von Partikeln in und auf Zellen, so stimmen die Werte gut überein. Insgesamt lässt sich also eine tendenziell gute Übereinstimmung feststellen.

- Bei 200 nm SMP ist die gesamte projizierte Flächendichte (von Partikeln in und auf den Zellschnitten) deutlich kleiner als die mit REM bestimmten interzellulären und zellulären Flächendichten. Das bedeutet, dass die absolute Menge gefundener Partikel in den Dünnschnitten deutlich geringer ist als das, was in den REM-Versuchen vorgefunden wurde. Es liegt folglich keinerlei Übereinstimmung vor.
- Bei 100 nm NP stimmt zwar die gesamte projizierte Flächendichte der STEM-Untersuchungen recht gut mit der interzellulär gemessenen Flächendichte aus dem REM-Versuch überein, d.h. die Gesamtzahl deponierter Partikel in diesen beiden Fällen ähnelt sich, aber die Mengen auf den Zellen stimmen nicht überein. Das bedeutet im STEM-Versuch sind deutlich mehr NP von den Zellen aufgenommen worden, als die Differenz zwischen interzellulärer und zellulärer Flächendichte aus dem REM-Versuch vermuten lässt.

5.5.3 Diskussion

Die Untersuchung möglicher Inkorporation von SiO_2 -Partikeln durch A549-Zellen erbrachte ambivalente Ergebnisse. Zum einen zeigen tomografische FIB-Untersuchungen, dass in regulären Zellen nahezu keine Partikel aufzufinden sind. Eine Verfälschung der Resultate durch Herausschlagen von ganzen Partikeln durch den Ionenstrahl ist sehr unwahrscheinlich, da Partikel, die sich auf der Oberfläche befinden, trotz Ionenbeschuss nachweislich stabil bleiben. Einzig im Falle der 100 nm Partikel lassen sich aufgrund der Partikelgröße begründete Zweifel an der einwandfreien Detektierbarkeit der Teilchen innerhalb der komplexen Zellstrukturen hegen.

Andererseits zeigen STEM-Resultate klare Indizien, dass SiO_2 -Partikel von A549-Zellen aufgenommen werden (vgl. Tabelle 5.2), und das auch in signifikanten Mengen (vgl. Tabelle 5.3).

Doch der Vergleich der STEM-Ergebnisse mit den regulären REM-Versuchen ist problematisch, da die zur Berechnung der Flächendichten verwendeten projizierten Oberflächen in der Summe nur sehr geringe Zelloberflächen repräsentieren. Die gesamte projizierte Oberfläche beträgt jeweils nur ca. $100 \mu\text{m}^2$ (100 nm Partikel), $230 \mu\text{m}^2$ (200 nm Partikel) und $150 \mu\text{m}^2$ (500 nm Partikel). Im Vergleich dazu decken die je 50 ausgewerteten zellulären Bilder beim vierstündigen REM-Experiment mit gleicher Eingabekonzentration ca. $9400 \mu\text{m}^2$ (100 nm Partikel), $16000 \mu\text{m}^2$ (200 nm Partikel) bzw. $36000 \mu\text{m}^2$ (500 nm Partikel) Zelloberfläche ab, d.h. das 70 bis 240fache. Hinzu kommt, dass mit STEM nur ein sehr eingeschränktes Areal der Probe erfasst wird, da aus der gesamten Kunststoffmembran, auf der die Zellen in STEM-Versuchen kultiviert werden, nur drei kleinere Proben ausgestochen und eingebettet wurden (s. Abschnitt 4.1.4). Ferner wurden aus lediglich einer dieser drei eingebetteten Proben im Ultramikrotom Dünnschnitte erstellt. Die Schnitte wurden zudem sukzessive vom eingebetteten Block geschnitten, sodass im Endeffekt mit STEM nur ein sehr kleiner Ausschnitt der ganzen Probe abgebildet wird. Globale Inhomogenitäten, wie sie bei REM-Versuchen beobachtet werden und zu sehr großen statistischen Unsicherheiten führen, werden so außer Acht gelassen. Schlussendlich besteht also die Möglichkeit, dass zufällig ein Bereich mit besonders starker Aufnahme ausgewählt wurde. Solche Bereiche wurden bei den FIB/REM-Tomografie Untersuchungen sogar beobachtet, nämlich in Form von Ansammlungen *dichter* Zellen (vgl. Abbildung 5.19b). Die in diesem Zelltyp beobachtete starke Partikelaufnahme (vgl. Abbildung 5.16) würde zu der großen Menge gefundener 100 nm Partikel in den Zellen bei STEM-Untersuchungen passen (vgl. Tabelle 5.3).

Weitere Zweifel an der statistischen Aussagekraft der STEM-Resultate liefern die Ergebnisse der FIB-Tomografie-Untersuchungen, die, wie zuvor erwähnt, so gut wie keine Partikel in regulären Zellen nachweisen konnten. Basierend auf den berechneten projizierten Flächendichten aus STEM-Untersuchungen müsste bei einer typischen Schnittbreite in der FIB von $10 \mu\text{m}$ rechnerisch durchschnittlich alle 170 nm ein 200 nm großes Partikel sichtbar sein, d.h. bei einer Schnitttiefe von

50 nm in jedem vierten aufgenommene Bild. Diese Häufigkeit hätte bei den FIB-Untersuchungen auffallen müssen. Im Fall der 100 nm Partikel müsste sogar alle 50 nm ein Partikel in den FIB-Schnitten erscheinen. Beides ist nicht der Fall.

Durch die beschriebenen statistischen Unwägbarkeiten der STEM-Experimente muss auch die grundsätzliche Vergleichbarkeit von FIB und STEM in Frage gestellt werden. STEM kann nur in einem kleinen Cluster von Zellen als repräsentativ betrachtet werden, wohingegen FIB durch die Wahl einzelner, über die gesamte Probe verteilter Zellen die Probe als Ganzes repräsentiert. Trotz der Schwierigkeit der Detektierbarkeit von SiO_2 -Partikeln in den Zellen, insbesondere bei den kleinsten 100 nm NP, kann daher FIB als aussagekräftiger eingestuft werden, da das Gesamtbild von größerem Interesse ist als eine Detailaufnahme.

Auch wenn die STEM-Ergebnisse alleine für sich betrachtet werden, lässt sich dennoch keine eindeutige Aussage über die Partikelaufnahme von Silika-Partikeln in A549-Zellen treffen. Die REM-Studien in Kapitel 5.2 kommen bei allen drei Partikelklassen zum Ergebnis, dass zellulär weniger deponiert als interzellulär, und daher die Vermutung nahe liegt, dass die Differenzen möglicherweise von den Zellen aufgenommen wurden. Im Gegensatz dazu sind die hier diskutierten STEM-Ergebnisse insgesamt in sich sehr inkonsistent. Während bei 500 nm Partikeln eine tendenziell gute Übereinstimmung zwischen REM und STEM zu beobachten ist, passen die Ergebnisse bei 200 nm Partikeln im Grunde überhaupt nicht zu den REM-Resultaten. Bei 100 nm Partikeln stimmen zwar die Gesamtzahlen deponierter Partikel einigermaßen überein, dafür aber nicht die Mengen auf den Zellen. Diese Inkonsistenz spricht dafür, dass bei den durchgeführten STEM-Experimenten systematische Fehler vorliegen müssen.

Wie weiter oben erläutert, stellen *dichte* Zellen eine mögliche Ursache für die in den Dünnschnitten beobachtete, ungewöhnlich starke Partikelaufnahme im Fall der 100 nm NP dar. Daneben gibt es eine weitere mögliche Fehlerquelle, die insbesondere für die schlechte Übereinstimmung zwischen STEM und REM bei den 200 nm Partikeln verantwortlich sein könnte. Beim Einbetten und Aushärten des EPONs könnten Partikel von den Zelloberflächen auf- und weggeschwemmt werden, sodass die Zahl der deponierten Partikel auf den Zellen unterschätzt werden würde. Jedoch konnten Partikel im EPON oberhalb der Zellen nur in Ausnahmefällen beobachtet werden, was für die Stabilität der während der Präparation durchgeführten Fixierung spricht. Zwar finden sich zahlreiche Löcher zwischen 50 und 100 nm Durchmesser im Einbettmaterial, jedoch sind diese auch bei Dünnschnitten mit 200 und 500 nm großen Partikel in der gleichen Größenordnung und damit kleiner als die jeweiligen Partikel. Hierbei handelt es sich folglich um Lufteinschlüsse und nicht um verloren gegangene Partikel.

Schlussfolgernd lässt sich daher zusammenfassen, dass grundsätzlich Inkorporation von SiO_2 -Partikeln durch A549-Zellen existiert und mittels STEM-Experimenten bestätigt wird, eine zweifelsfreie Quantifizierung aber nicht möglich ist. Statistisch relevant hingegen sind die mittels FIB-Tomografie erhaltenen Ergebnisse. Diese besagen, dass im Mittel keine nennenswerte SiO_2 -Partikelaufnahme stattfindet, welche die Diskrepanzen zwischen zellulären und interzellulären Flächendichten erklären könnte. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen von Gualtieri et al. [58], die in anderen Epithelzellen (BEAS-2B) ebenfalls keine Aufnahme von mit Rhodamin funktionalisierten amorphen Silika-NP (30 und 50 nm) nachweisen konnten.

Schließlich wird im Folgenden noch genauer auf die Ergebnisse der FIB/REM-Tomografie eingegangen.

Bei den FIB-Untersuchungen wurden teilweise sogenannte *dichte* Zellen entdeckt, die oft hohe Partikelkonzentrationen beinhalten. Worum es sich bei dem dichten Material handelt konnte nicht geklärt werden. Es ähnelt optisch zwar dem Zellkern, weist aber kaum Porosität auf und ist auch nicht auf einen bestimmten Bereich beschränkt, sondern in der gesamten Zelle zu finden. Ferner

gibt es *semi-dichte* Zellen, die im Inneren teilweise die Merkmale *dichter* Zellen, teilweise die regulärer Zellen zeigen. Möglicherweise befinden sie sich in einer Übergangsphase. Äußerlich weisen aber sowohl *dichte* als auch *semi-dichte* Zellen bereits die gleiche glatte Oberfläche auf.

In seiner Dissertation beschreibt Dass [145] ein äußerlich ähnliches Aussehen von anderen Epithelzellen (HeLa), wenn sie polymeren Nanopartikeln ausgesetzt werden. Dabei Kugeln die Zellen sich zusammen und verlieren ihre Pseudopodien auf der Zelloberfläche, werden also ebenfalls glatt. Dafür bilden sich auf der Zelloberfläche kugelförmige Plasmaausstülpungen. Zusammen mit dem Zusammenkugeln sind das beides Anzeichen von Apoptose, einer Form des kontrollierten Zelltods. Zieht man aus diesen Beobachtungen den Schluss, dass das Verschwinden der Pseudopodien ebenfalls ein Hinweis auf Apoptose ist, so lässt sich daraus folgern, dass die bei den *dichten* Zellen beobachtete glatte Oberfläche auch auf ein Zellsterben hindeutet. Ein weiteres Indiz dafür sind die vielen Silika-Partikel innerhalb dieser *dichten* Zellen, die diesen Prozess verursacht haben könnten. Es gibt aber auch einige Aspekte, die sowohl gegen Apoptose, als auch gegen Partikel als Ursache der *dichten* Zellen sprechen. Zum einen ist aus Übersichtsaufnahmen ersichtlich, dass die *dichten* Zellen nicht stärker zum Zusammenkugeln tendieren als es reguläre Zellen tun. Wäre ihre glatte Oberfläche ein Hinweis für Apoptose, so müssten in den Bereichen *dichter* Zellen deutlich mehr zusammengerollte Zellen zu finden sein. Ferner verlieren apoptotische, reguläre Zellen nicht ihre zahlreichen Pseudopodien und werden somit nicht glatt, insofern deutet auch dies auf keinen zwingenden Zusammenhang zwischen Apoptose und glatter Oberfläche hin. In Abbildung 5.19a ist im unteren Bildabschnitt eine apoptotische, reguläre Zelle abgebildet. Zwar ließe sich noch argumentieren, dass die Veränderung der Zelloberflächen hin zu einer glatten Oberfläche erst durch Nanopartikel induziert wird und reguläre Zellen keine Partikel aufgenommen haben, jedoch zeigt sich das Phänomen der *dichten* Zellen mit glatten Oberflächen auch auf Kontrollproben, die nicht Silika-Partikeln ausgesetzt waren. Im Anhang zeigt Abbildung A.5.3 eine Querschnittsaufnahme einer solchen *dichten* Zelle von einer Kontrollprobe sowie deren glatte Oberfläche. Das bedeutet die Entstehung dichter, glatter Zellen ist unabhängig von den Nanopartikeln.

Aufgrund der glatten Oberfläche erscheinen beide Zelltypen in SE-Bildern neben regulären Zellen und deren zerklüfteten Erscheinungsform regelrecht schwarz, was sie leicht identifizierbar macht. Dadurch konnte ihr Vorkommen auf einzelne, fleckenartige Bereiche eingegrenzt werden (vgl. Abbildung 5.19b), weshalb sie schlussendlich als eine Anomalie, vermutlich ein Präparationsartefakt, betrachtet werden.

5.6 Überprüfung der Eignung des ESEM-Modus zur Quantifizierung der effektiven Dosis

Da die meisten Versuche dieser Arbeit an einem ESEM durchgeführt wurden und diese Mikroskopietechnik prädestiniert ist biologische Proben zu untersuchen, wurden testweise nasse Proben von A549-Zellen mit 100 nm SiO₂-Nanopartikel (Eingabekonzentration 7 µg/mL, Expositionsdauer 1 h) unter ESEM-Bedingungen untersucht, um die Praktikabilität der Technik für die Quantifizierung von Partikeldeposition zu eruieren. Da die Entwässerung mit Alkohol und die KPT entfallen, verursacht dieses Verfahren prinzipiell weniger Präparationsartefakte. Die erhaltenen Resultate werden in Abbildung 5.22 und 5.23 in Form einiger bei 780 Pa und 3°C aufgenommenen STEM- und SE-Bilder präsentiert. Die gewählte Beschleunigungsspannung betrug 30 kV bei einem Arbeitsabstand von 12 mm.

Abbildung 5.22 zeigt eine DF-STEM-Aufnahme eines der neun Siliziumnitrid Fenster der untersuchten Probe. Auf der 200 nm dicken Membran sind mehrere A549-Zellen zu erkennen (heller Kontrast). Die beiden farblichen Rahmen umfassen zwei Bereiche, die näher untersucht wurden.

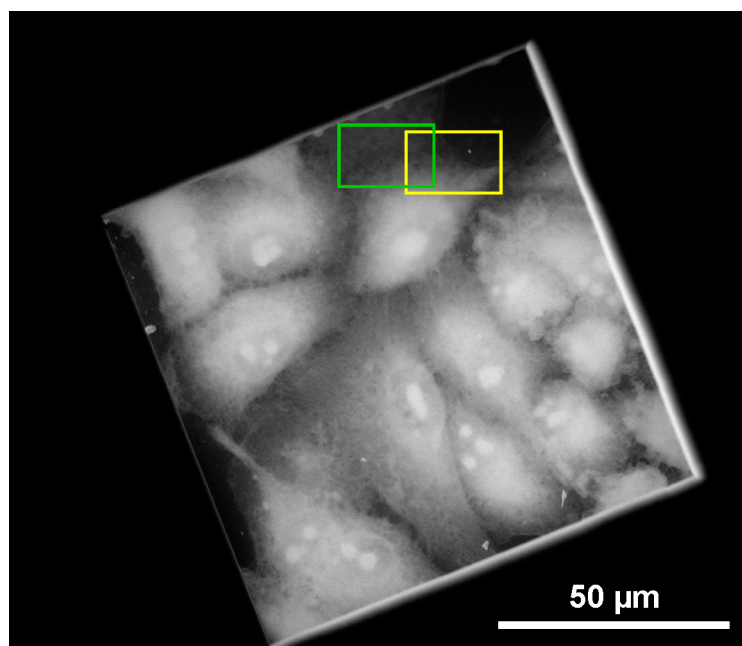


Abbildung 5.22. DF-STEM-Übersichtsaufnahme eines Siliziumnitrid Fensters mit adhärennten Zellen unter ESEM-Bedingungen. Gelbe und grüne Markierung zeigen Bereiche von Detailaufnahmen aus Abbildung 5.23.

Gelb markiert ist der Randbereich einer Zelle. Oberhalb von ihr findet sich freie Membranfläche. Grün umrandet ist ebenfalls ein Randbereich der Zelle, der jedoch im gesamten Ausschnitt sehr dünn ist, weshalb der DF-STEM-Kontrast zur Siliziumnitrid Membran sehr schwach ausfällt.

In Abbildung 5.23a wird eine Vergrößerung des gelb markierten Ausschnitts aus Abbildung 5.22 gezeigt (ebenfalls DF-STEM). Auf dem Substrat (schwarzer Kontrast) sind recht gut einzelne Partikel als helle Punkte erkennbar. In den dünnen Regionen der Zelle (heller Kontrast) ist dies auch noch der Fall (oben links in Abbildung 5.23a), jedoch wird die Zelle zu ihrer Mitte hin schnell zu dick für STEM-Aufnahmen (unterer heller Bereich in Abbildung 5.23a), sodass aufgrund der starken Elektronenstreuung die Signale der Partikel untergehen.

Abbildung 5.23b zeigt eine DF-STEM-Aufnahme des in Abbildung 5.22 grün markierten Bereichs. Es handelt sich dabei um dünne Ausläufer der Zelle, die nach unten hin an Dicke zunehmen (zunehmend hellerer Kontrast). Auch hier ist gut zu erkennen, dass mit zunehmender Dicke die Partikel schlechter zu detektieren sind.

Abbildungen 5.23c,d schließlich zeigen die beiden gleichen Probenstellen wie Abbildungen 5.23a,b, jedoch handelt es sich dabei um SE-Aufnahmen. In Abbildung 5.23c lässt sich die Silhouette der Zelle aus Abbildung 5.23a nur erahnen, basierend auf den auf der freien Membran erkennbaren SiO_2 -Partikeln sowie dem größeren Schmutzpartikel, das auch in Abbildung 5.23a zu erkennen ist. Im zellulären Bereich dagegen sind fast keine Details auszumachen. Selbst in den dünnen Regionen kann man nur ganz schwach vereinzelt Partikel erkennen. Das gleiche gilt auch für die Zelloberfläche in Abbildung 5.23d, wo nahezu keine SiO_2 -Partikel detektierbar sind. Es scheint folglich nicht möglich SiO_2 -NP auf Zellen mit dem SE-Detektor abzubilden. Ein zu dicker Wasserfilm fällt als Ursache aus, da er auch auf dem Substrat die Abbildung mit Sekundärelektronen verhindern müsste. Der Versuch für diesen Zweck den ESEM-BSE-Detektor zu verwenden war nicht erfolgreich, da es nicht gelang ein Bild zu erhalten.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der ESEM-Modus ein hohes Maß an Optimie-

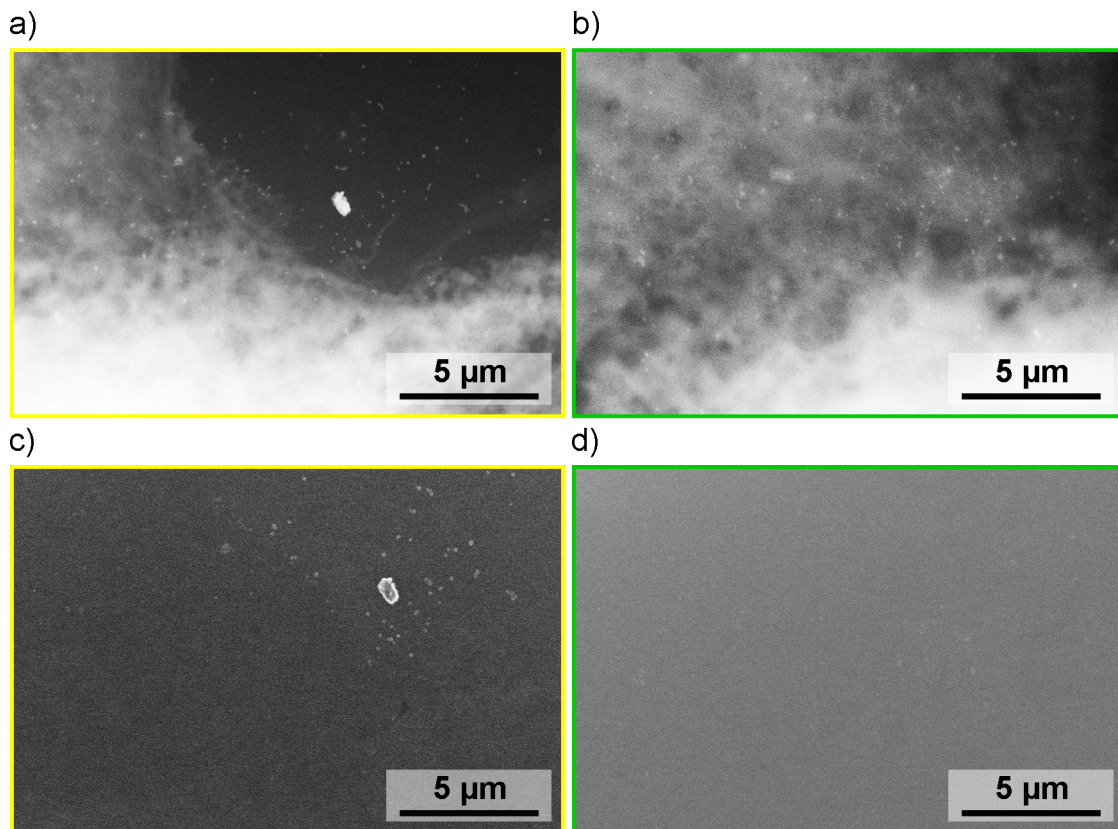


Abbildung 5.23. 30 keV STEM- (a,b) und SE- (c,d) Aufnahmen von A549-Zellen auf Siliziumnitrid Membran mit 100 nm SiO_2 -Nanopartikeln unter ESEM-Bedingungen.

rung der Versuchsdurchführung erfordert. Zwar können mit STEM erfolgreich SiO_2 -NP auf Zellen detektiert werden, jedoch ist nur ein Bruchteil der Zelloberfläche mit STEM analysierbar, da in den dicken Bereiche der Zellen der Partikelkontrast aufgrund der starken Streuung durch das Zellmaterial verloren geht. Peckys und de Jonge [85, 88] demonstrieren in ihren Arbeiten aber, dass stark streuende NP aus Gold auch in dickeren Bereichen einer Zelle mit STEM erfolgreich detektiert werden können. Von daher sollte es bei Nanopartikeln aus vergleichbarem Material möglich sein, im ESEM-Modus mit STEM quantitative Analysen der Partikeldeposition auf Zellen durchzuführen. Ferner kann die Option der BSE-Abbildung im ESEM-Modus nicht ausgeschlossen werden. Sollte damit eine Abbildung von Silika-Nanopartikeln auf Zellen gelingen, wäre eine umfangreiche Quantifizierung wie mit gewöhnlicher REM möglich.

Den Möglichkeiten des ESEM-Modus steht grundsätzlich ein sehr hoher Anspruch an die Fähigkeiten des Mikroskopnutzers gegenüber. Normale REM-Untersuchungen sind prinzipiell deutlich einfacher und schneller durchzuführen, insbesondere in interzellulären Regionen. Darüber hinaus wird in Abbildung 5.22 die geringe Anzahl an Zellen auf einem Fenster deutlich, weshalb es erforderlich wäre viele Proben zu präparieren, um eine ausreichende Statistik zu erhalten. Folglich sind im ESEM höchstens kleinere Stichproben realisierbar.

Kapitel 6

Rückstreuelektronenkontrast in Rasterelektronenmikroskopie-Bildern von SiO₂-Nanopartikeln auf komplexen Substraten

Bei den zuvor behandelten Depositionsversuchen wurden Zellen auf ITO-beschichteten Substraten kultiviert. Diese Konfiguration ermöglicht es die Zellen im REM zu betrachten, ohne sie zusätzlich mit einer elektrisch leitfähigen Schicht beschichten zu müssen, da bereits das leitfähige ITO unterhalb der Zellen für den nötigen Ladungsaustausch sorgt. In diesen Versuchen erforderte die Abbildung von SiO₂-Nanopartikeln auf Zelloberflächen die Verwendung von BSE-Aufnahmen. Hierbei wurden auch vereinzelt freie Substratflächen aufgenommen, jedoch zeigten die an diesen Stellen vorhandenen SiO₂-Partikel abhängig von den gewählten Bedingungen ungewöhnliche Kontrastinversionen. Die Verwendung von BSE ermöglicht die Darstellung von Materialkontrast, weshalb im Normalfall SiO₂-Partikel (mittlere Ordnungszahl $\bar{Z} = 10$) dunkel auf hellem ITO (mittlere Ordnungszahl $\bar{Z} > 24$, abhängig von der genauen Stöchiometrie) erscheinen sollten. Da unter bestimmten Bedingungen das Gegenteil der Fall war, wurden diese Kontrastinversionen eingehend untersucht. Zunächst werden in Kapitel 6.1 die Resultate der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierung der beiden verwendeten ITO-Substrate präsentiert. In Kapitel 6.2 werden die experimentellen Ergebnisse bezüglich des BSE-Kontrastes von SiO₂-Nanopartikeln auf diesen Substraten dargestellt, gefolgt von einem Vergleich mit MC-Simulationen in Kapitel 6.3. Schließlich werden die Ergebnisse und die Entstehung der Kontrastinversionen in Abschnitt 6.4 diskutiert.

6.1 Eigenschaften von *ITO160* und *ITO22*

Abbildung 6.1 zeigt HAADF-STEM-Aufnahmen von *ITO160* (Abbildung 6.1a) und *ITO22* (Abbildung 6.1b). Man erkennt deutlich den hellen Materialkontrast des ITOs ($\bar{Z} > 24$) im Vergleich zum dunklen Kontrast der Substrate (in (a) Glas mit $\bar{Z} = 10$ und in (b) Glaskohlenstoff mit $\bar{Z} = 6$). In beiden Bildern ist eine Platinschicht zu erkennen, welche bei der Herstellung der TEM-Lamellen zu deren Schutz während des FIB-Prozesses aufgebracht wird. In Abbildung 6.1a ist darüber hinaus eine dünne Kohlenstoffschicht zwischen ITO und Platin zu erkennen, die für FIB-Tomografie zur Erhöhung der Leitfähigkeit aufgedampft wurde. Während die *ITO160*-Schicht dicht und homogen erscheint, erweckt die des *ITO22*-Substrats einen wolkgigen Eindruck, was auf deutliche Porosität im Material hindeutet. Dies lässt darauf schließen, dass die effektive Dichte der *ITO22*-

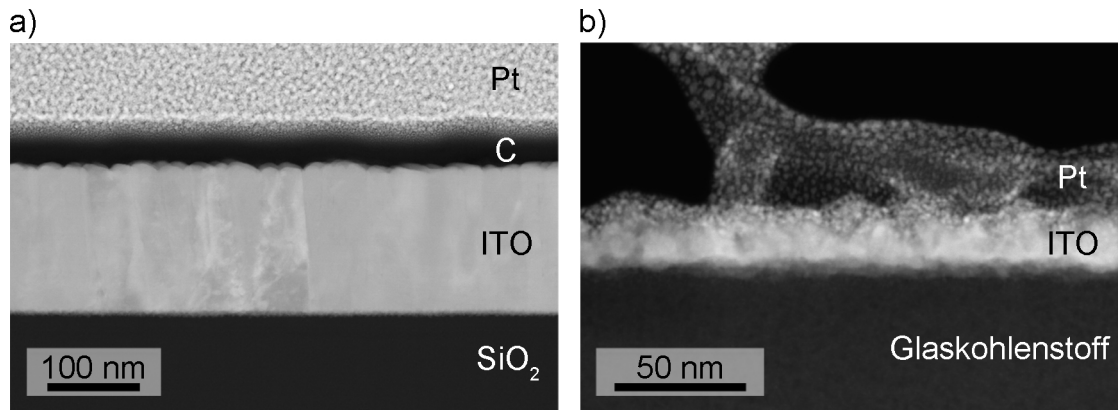


Abbildung 6.1. HAADF-STEM-Aufnahmen von Querschnitten von (a) ITO160 und (b) ITO22, aufgenommen bei 200 keV PE-Energie. Beide Substrate wurden bei der Lamellen-Anfertigung zum Schutz mit einer Platin-Schicht überzogen. In (a) ist ferner eine dünne Kohlenstoffschicht zu erkennen, welche mittels PVD für FIB-Tomografie zusätzlich aufgetragen wurde.

Schicht geringer sein muss als bei ITO160. In der Tat zeigen MC-Simulationen eine deutlich bessere Übereinstimmung mit Messergebnissen, wenn für ITO22 eine Dichte von lediglich $5,0 \text{ g/cm}^3$ angenommen wird statt den nominellen $7,1 \text{ g/cm}^3$.

Laut Herstellerangabe beträgt die Dicke der ITO-Schicht auf ITO160-Substraten 180 nm. Die Auswertung mehrerer HAADF-STEM-Aufnahmen zeigt jedoch, dass die Dicke im Mittel lediglich $160 \pm 5 \text{ nm}$ beträgt (woher auch die Bezeichnung ITO160 rührt). Entsprechend ergibt sich für die hausintern hergestellten ITO22-Schichten eine Dicke von $22 \pm 5 \text{ nm}$.

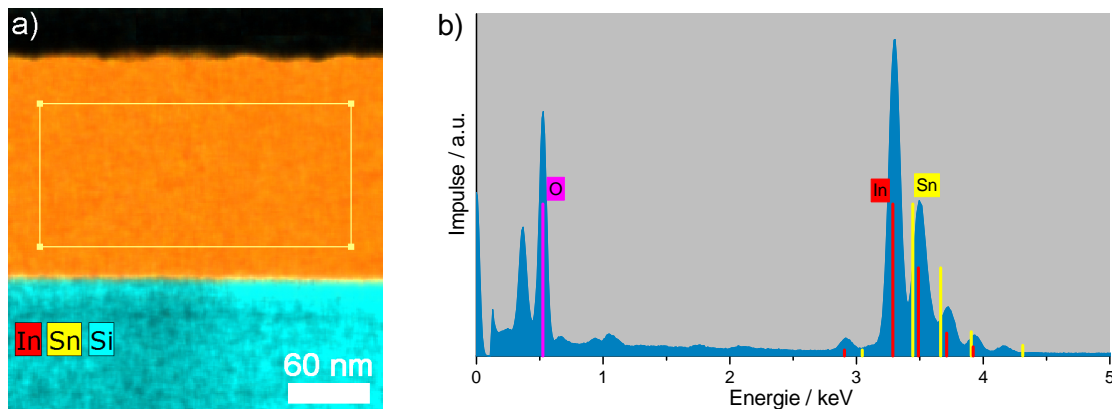


Abbildung 6.2. (a) EDXS-Mapping der in Abbildung 6.1a gezeigten Probenstelle von ITO160, aufgenommen bei 200 keV. Der Rahmen fasst den Bereich ein, der zur Quantifizierung herangezogen wurde. Das dabei gemessene EDXS-Spektrum mit den wichtigsten Linien von Indium, Zinn und Sauerstoff ist in (b) dargestellt.

In Abbildung 6.2a wird das zu einem Ausschnitt von Abbildung 6.1a gehörende EDXS-Mapping einer ITO160-Schicht gezeigt. Das Indium-Signal in Abbildung 6.2a ist rot und das Zinn-Signal gelb eingefärbt, weshalb die ITO-Schicht in der Summe orange erscheint. Darunter ist in hellblau das Silizium-Signal des Glasträgers zu erkennen. Vom umrahmten Bereich wurde eine Quantifizierung durchgeführt; das zugehörige gemittelte EDXS-Spektrum mit den relevanten Linien von Indium, Zinn und Sauerstoff ist in Abbildung 6.2b dargestellt. Hier wird deutlich, dass die unmittelbare Nachbarschaft von Indium und Zinn im Periodensystem (Ordnungszahlen 49 und 50) eine Quantifizierung erschwert, da die charakteristischen Energien sehr nah beieinander liegen und im

Spektrum deshalb überlappen. Die Analyse vierer Probenstellen von *ITO160* ergibt eine atomare Zusammensetzung von im Mittel 50,5 at.% Sauerstoff, 45 at.% Indium und 4,5 at.% Zinn, was einer Summenformel von $\text{In}_{10}\text{Sn}_1\text{O}_{11}$ entspricht. Zum Vergleich: die nominelle Zusammensetzung von ITO ist $\text{In}_{18}\text{Sn}_1\text{O}_{29}$, das heißt die ITO-Schicht enthält deutlich weniger Indium, als sie enthalten sollte.

Die Quantifizierung dreier Probenstellen von *ITO22* zeigt ebenfalls Abweichungen von nominell zu erwartenden Werten: 59,5 at.% Sauerstoff, 35,5 at.% Indium und 5 at.% Zinn entsprechen einer Summenformel von $\text{In}_7\text{Sn}_1\text{O}_{12}$ statt nominell $\text{In}_{18}\text{Sn}_1\text{O}_{29}$.

Da eine Quantifizierung von Sauerstoff mittels EDXS stark fehlerbehaftet sein kann und daher mit Skepsis betrachtet werden sollte, wurde sie für beide Substrate unter Ausschluss von Sauerstoff, also nur für Indium und Zinn, wiederholt. Doch auch so ergibt sich ein In-zu-Sn-Verhältnis von 10:1 (*ITO160*) bzw. 7:1 (*ITO22*), während es nominell 18:1 beträgt. Geht man von einer Zusammensetzung aus stöchiometrisch korrekten Indium- und Zinnoxid aus (d.h. In_2O_3 und Sn_1O_2), so ergeben sich, basierend auf den obigen Verhältnissen, die Summenformeln $\text{In}_{10}\text{Sn}_1\text{O}_{17}$ (*ITO160*) und $\text{In}_{14}\text{Sn}_2\text{O}_{25}$ (*ITO22*). Da zwischen den beiden Varianten der Quantifizierung effektiv nur bei *ITO160* ein Unterschied im Sauerstoffanteil existiert und dieser bei MC-Simulationen keine nennenswerte Auswirkung zeigt, wurden bei allen Simulationen die Ergebnisse der Quantifizierung mit Sauerstoff verwendet (vgl. Tabelle 4.1).

6.2 Kontrastinversionen im Rückstreuelektronenbild von SiO_2 -Nanopartikeln auf Indium-Zinn-Oxid beschichteten Substraten

BSE-Abbildungen von 100 nm großen Silika-Nanopartikeln auf *ITO22*- und *ITO160*-Substraten wurden mit einem ringförmigen Halbleiterdetektor aufgenommen, welcher zentral unter dem Polschuh montiert ist (vgl. Kapitel 3.3.4). Die systematische Untersuchung der Kontrastinversionen in diesen BSE-Bildern zeigte eine ausgeprägte Abhängigkeit des NP-Kontrastes von PE-Energie (E_0) und Arbeitsabstand (WD) sowie vom verwendeten Substrat. Es wurden Energiebereiche zwischen 3 und 17 keV untersucht sowie Arbeitsabstände von 4 bis 12 mm.

6.2.1 Arbeitsabstandsabhängigkeit

In Abbildung 6.3 wird die WD Abhängigkeit des BSE-Kontrastes auf *ITO160* bei konstanter PE-Energie von 5 keV betrachtet. Zum Vergleich sind SE-Bilder der gleichen Probenstellen gezeigt, die unter gleichen Bedingungen erstellt wurden. Man erkennt, dass sich der SE-Kontrast bei den verschiedenen Arbeitsabständen kaum ändert (Abbildung 6.3a-c), während Nanopartikel in den BSE-Aufnahmen (Abbildung 6.3d-f) offenkundig mit unterschiedlichem Kontrast erscheinen. Bei einer WD von 4 mm weisen sie einen hellen (positiven) Kontrast auf (Abbildung 6.3d), welcher angesichts der deutlich kleineren mittleren Ordnungszahlen von SiO_2 ($\bar{Z} = 10$) im Vergleich zu ITO ($\bar{Z} = 28,5$) überrascht. Man erwartet eigentlich negativen Materialkontrast von SiO_2 auf ITO im BSE-Bild. Bei Erhöhung der WD verringert sich der NP-Kontrast rapide und verschwindet bei ungefähr 6 mm WD, d.h. Partikel sind nicht mehr vom Hintergrund zu unterscheiden (Abbildung 6.3e). Wird die WD weiter erhöht, so kehrt sich der Kontrast um und NP erscheinen dunkel vor hellem Hintergrund, wie Abbildung 6.3f für $\text{WD} = 12$ mm demonstriert.

Beim *ITO22*-Substrat konnte im untersuchten WD Bereich von 4 bis 12 mm keine Kontrastinversion beobachtet werden. Der Kontrast blieb stets positiv. Exemplarische Bilder finden sich in

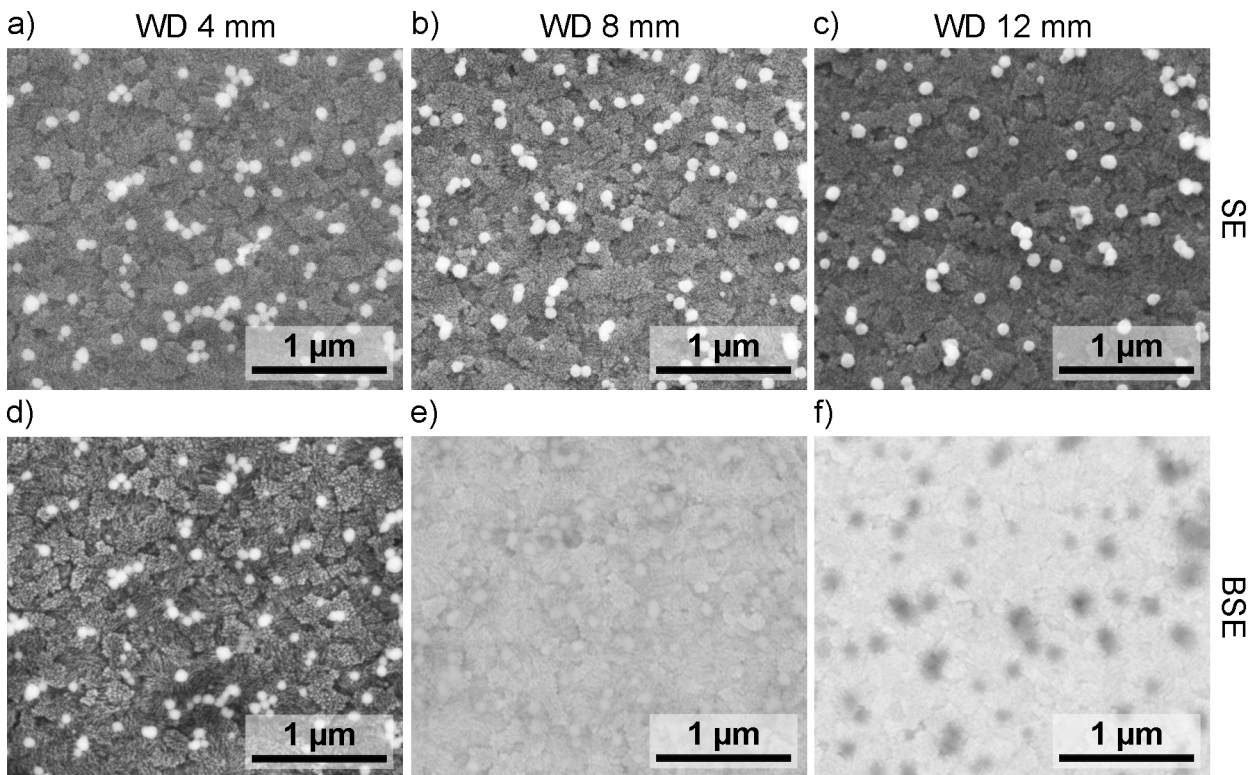


Abbildung 6.3. 5 keV SE- (a-c) sowie BSE-Aufnahmen (d-f) von 100 nm SiO₂-NP auf ITO160 in Abhängigkeit vom Arbeitsabstand zwischen 4 und 12 mm. Jedes einzelne Bildpaar (a+d, b+e, c+f) zeigt identische Probenstellen. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich erhöht.

Abbildung A.7.1 im Anhang. Ferner wurden Messreihen bei $E_0 = 10$ keV durchgeführt. Auf ITO160 ist der Partikelkontrast im gesamten WD Bereich sehr schwach. Die Partikel sind also kaum zu erkennen. Dennoch ist eine Kontrastumkehr von positiven zu negativen Werten bei $WD = 10$ mm messbar. Auf ITO22 bleibt der Kontrast wiederum stets positiv. Beispielbilder hierzu finden sich ebenfalls im Anhang, Abbildungen A.7.2 (ITO160) und A.7.3 (ITO22).

Darüber hinaus fallen zwei Dinge auf. Das ITO160-Substrat zeigt einen stark ausgeprägten, kachelartigen Topografiekontrast in der BSE-Aufnahme bei 4 mm (Abbildung 6.3d). Das Bild ähnelt stark dem SE-Bild (Abbildung 6.3a), was auf die Überlagerung von Material- und Topografiekontrast hindeutet. Außerdem sticht der deutlich unscharfe Kontrast der Partikel in Abbildung 6.3f hervor, welcher auf das größere Wechselwirkungsvolumen zurückzuführen ist, aus dem BSE, verglichen mit SE, austreten.

6.2.2 Energieabhängigkeit

Abbildung 6.4 präsentiert BSE-Aufnahmen von ITO160 bei konstanter WD von 10 mm mit unterschiedlichen PE-Energien von 3 keV, 10 keV und 17 keV. Bei geringen Beschleunigungsspannungen ist der Kontrast erwartungsgemäß negativ (Abbildung 6.4a). Der Kontrast wird mit zunehmender PE-Energie geringer. Bei $E_0 = 10$ keV sind die NP nicht mehr vom Hintergrund zu unterscheiden (Abbildung 6.4b). Trotz weiter zunehmender Energie bleibt der Kontrast verschwindend gering. Bei 17 keV (Abbildung 6.4c) beträgt er laut Messung $0,04 \pm 0,01$, weshalb man hier ebenfalls von einer Kontrastinversion bei $E_0 \approx 10$ keV sprechen kann.

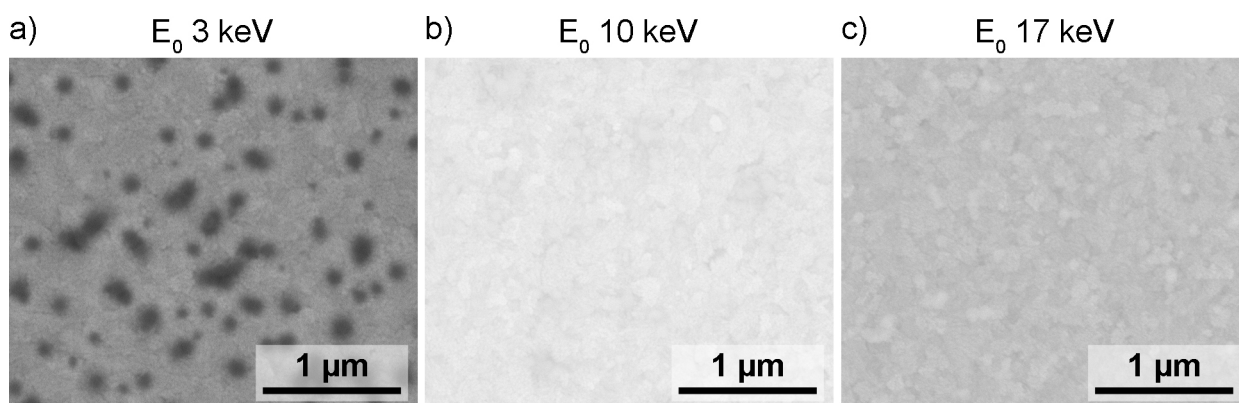


Abbildung 6.4. BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf ITO160 bei $\text{WD} = 10 \text{ mm}$. Die verwendete PE-Energie beträgt bei (a) 3 keV, (b) 10 keV und (c) 17 keV. Bildkontrast und Helligkeit wurden bei (a) zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

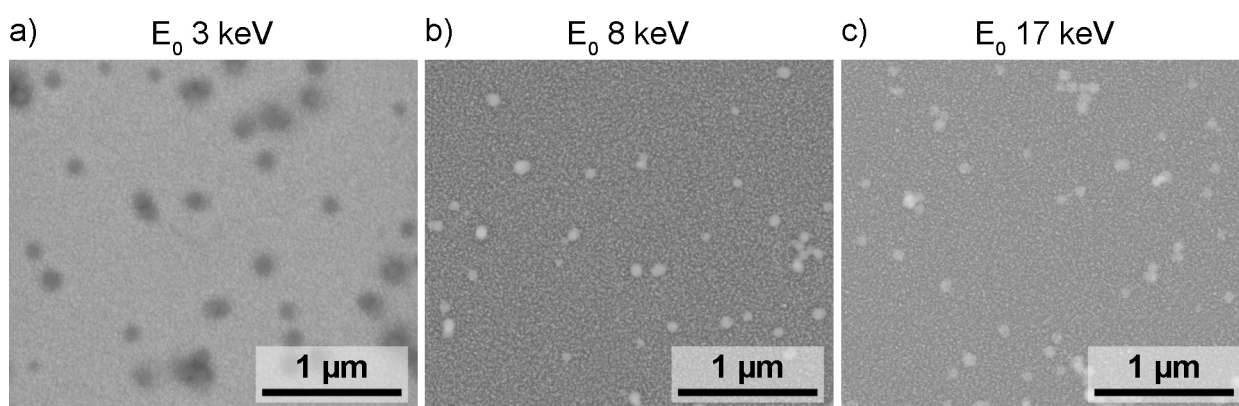


Abbildung 6.5. BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf ITO22 bei $\text{WD} = 10 \text{ mm}$. Die verwendete PE-Energie beträgt bei (a) 3 keV, (b) 8 keV und (c) 17 keV. Bildkontrast und Helligkeit wurden bei (a) und (b) zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

Bei ITO22 und dem gleichen Arbeitsabstand von 10 mm ist das E_0 -abhängige Kontrastverhalten der NP ähnlich, jedoch deutlicher ausgeprägt, wie Abbildung 6.5 zeigt. Bei 3 keV liegt ebenfalls negativer Kontrast vor (Abbildung 6.5a), der mit zunehmender PE-Energie schwächer wird. In Abbildung 6.5b ist klar zu erkennen, dass der Kontrast bei $E_0 = 8 \text{ keV}$ invertiert ist, was bedeutet, dass in diesem Energiebereich eine Kontrastinversion stattfindet. 8 keV stellt auch das lokale Maximum dar, denn für größere Energien nimmt der NP-Kontrast bis zur höchsten hier verwendeten PE-Energie von 17 keV wieder stetig ab.

Beide Messreihen wurden auch mit 6 mm und 4 mm WD durchgeführt. Im ersten Fall ist der Partikelkontrast auf ITO160 extrem schwach und die Partikel sind kaum zu erkennen. Dennoch ist eine Kontrastinversion zwischen 3 keV und 4 keV messbar. Auf ITO22 ist bei 6 mm dagegen der Kontrast stets positiv. Bei $\text{WD} = 4 \text{ mm}$ ist der Kontrast auf beiden Substraten stets positiv und keine Kontrastumkehr messbar. Einzelne anschauliche Aufnahmen hierzu finden sich in Abbildungen A.7.4 bis A.7.7 im Anhang.

Auch bei konstantem Arbeitsabstand wird die Überlagerung von Material- und Topografiekontrast bei höheren PE-Energien deutlich. Obwohl die Oberfläche des ITO22-Substrates sichtlich feiner ist (helle und dunkle Flächen), ähnelt beispielsweise Abbildung 6.5b sehr stark einer SE-Aufnahme.

6.2.3 Substratabhängigkeit

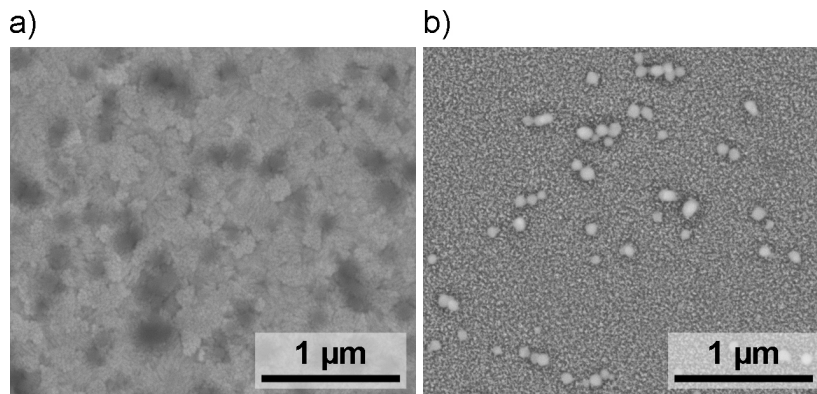


Abbildung 6.6. Vergleich von BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf (a) ITO160 und (b) ITO22, aufgenommen mit 6 keV und 10 mm WD. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

Eine weitere Kontrastinversion fällt auf, wenn man Bilder gleicher Silika-Partikel auf den beiden verschiedenen Substraten miteinander vergleicht (Abbildung 6.6). Obwohl die Aufnahmebedingungen identisch sind ($E_0 = 6$ keV, $WD = 10$ mm), zeigt Abbildung 6.6a negativen Partikelkontrast auf ITO160, während Abbildung 6.6b positiven NP-Kontrast auf ITO22 aufweist. Der erste Verdacht, dass es sich hierbei um eine materialabhängige Kontrastinversion handeln könnte, wird sich im Folgenden als Fehleinschätzung herausstellen. Tatsächlich ist sie ein Ergebnis der unterschiedlichen ITO-Schichtdicken.

6.3 Vergleich von gemessenen und berechneten Kontrastwerten

Die beobachteten Kontrastinversionen bei BSE-Abbildungen von NP zeugen von der Problematik der Interpretation von BSE-REM-Bildern. Bei komplexen Strukturen, wie den vorliegenden Silika-NP auf ITO-beschichteten Substraten, ist eine Deutung des Partikelkontrastes als reiner Materialkontrast unzureichend. Ferner ist aus praktischer Sicht der Versuch, den Kontrast für jedes zu untersuchende System aufs Neue mittels „Trial and Error“ Methode zu optimieren langwierig und arbeitsintensiv. Aus diesem Grund wurde im Folgenden mit MC-Simulationen ein systematischer Ansatz gesucht, die Entstehung des BSE-Kontrastes zu verstehen und optimale Abbildungsbedingungen für optimalen Kontrast zu finden.

In Abbildungen 6.7 - 6.10 werden die experimentell bestimmten Kontrastwerte (quadratische Symbole, durchgezogene Linien) mit MC-Simulationen verglichen. Dabei kamen sowohl Mott-Wirkungsquerschnitte nach Czyżewski (kreisförmige Symbole, gestrichelte Linien) als auch Screened-Rutherford-Wirkungsquerschnitte (dreieckige Symbole, gestrichelte Linien) zum Einsatz.

In Abbildung 6.7a wird der Partikelkontrast als Funktion der WD bei 5 keV PE-Energie dargestellt. Wie bereits in Abbildung 6.3 gezeigt, nimmt der gemessene Kontrast auf ITO160 für zunehmende WD stetig ab und unterläuft einer Inversion von positiv nach negativ bei $WD = 6$ mm (schwarze, volle quadratische Symbole). Die entsprechenden MC-Simulationen bestätigen diesen Verlauf und zeigen lediglich beim kleinsten Arbeitsabstand von 4 mm eine merkbliche Abweichung. Gleichmaßen enthalten sind in Abbildung 6.7a die Messwerte auf ITO22 (rote, leere quadratische Symbole). Sie zeigen ebenfalls eine stetige Abnahme des positiven Kontrastes, der sich für große Arbeitsabstände null annähert. MC-Simulationen geben auch hier den Verlauf korrekt wieder und deuten

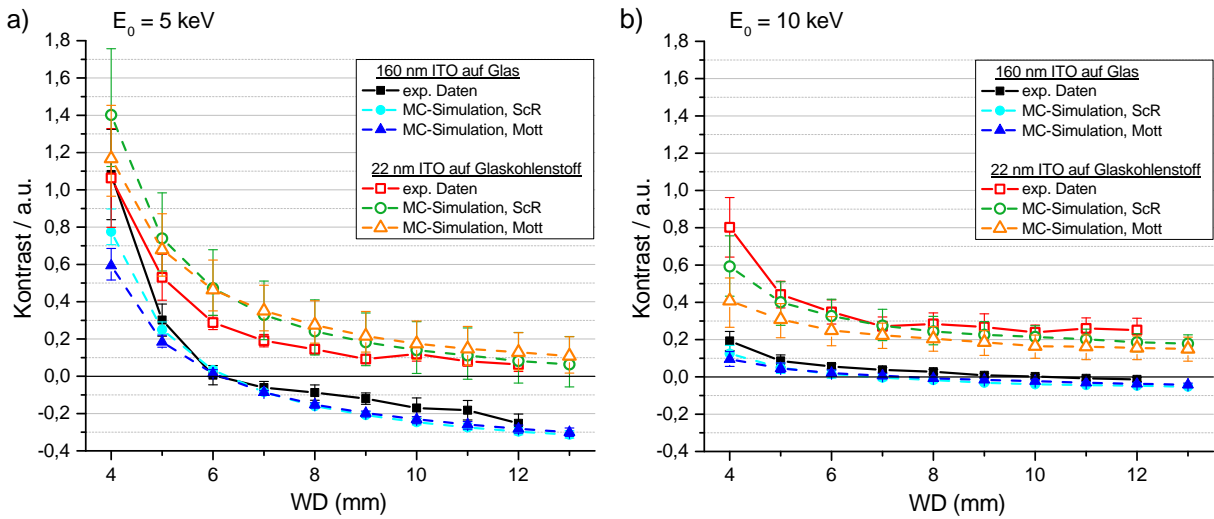


Abbildung 6.7. BSE-Kontrast von SiO_2 -NP auf ITO22 und ITO160 in Abhängigkeit vom Arbeitsabstand bei (a) $E_0 = 5 \text{ keV}$ und (b) $E_0 = 10 \text{ keV}$. Es werden experimentelle Daten (quadratische Symbole, durchgezogene Linien) mit MC-Simulationen verglichen, welche entweder mit Screened-Rutherford (kreisförmige Symbole, gestrichelte Linien) oder Cz-Mott (dreieckige Symbole, gestrichelte Linien) Wirkungsquerschnitten berechnet wurden.

ferner an, dass für größere Arbeitsabstände bei ITO22 eine Kontrastinversion möglich ist. Abbildung 6.7b präsentiert die Ergebnisse von Messungen und Simulationen mit $E_0 = 10 \text{ keV}$. Wie schon bei der kleineren PE-Energie nimmt der positive Kontrast für zunehmende WD ab, jedoch sind die Steigungen der Kurven ab ca. 5 mm merklich flacher, sodass sie sich asymptotisch einem konstanten Wert zu nähern scheinen. Zugleich sind die Kontrastwerte mit 10 keV im Allgemeinen kleiner als mit 5 keV. Bei ITO22 ist keinerlei Tendenz zur Kontrastinversion sichtbar, bei ITO160 dagegen ist eine Kontrastumkehr messbar, aber nur sehr schwach ausgeprägt. Dennoch wird auch sie von MC-Simulationen bestätigt.

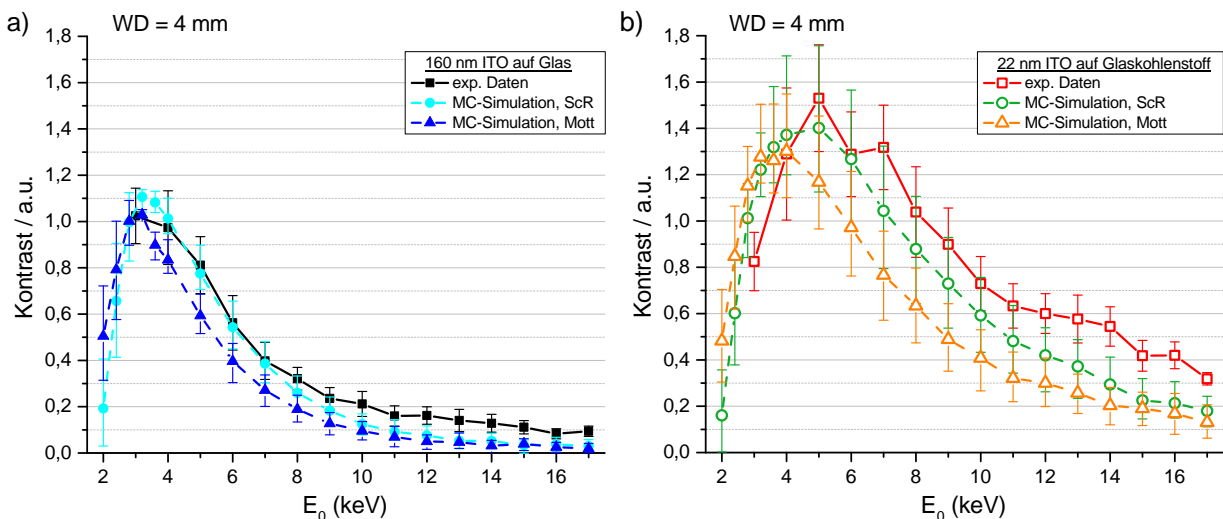


Abbildung 6.8. BSE-Kontrast von SiO_2 -NP auf (a) ITO160 und (b) ITO22 in Abhängigkeit von E_0 bei $WD = 4 \text{ mm}$. Es werden experimentelle Daten (quadratische Symbole, durchgezogene Linien) mit MC-Simulationen verglichen, welche entweder mit Screened-Rutherford (kreisförmige Symbole, gestrichelte Linien) oder Cz-Mott (dreieckige Symbole, gestrichelte Linien) Wirkungsquerschnitten berechnet wurden.

Auch bei konstant gehaltenem Arbeitsabstand von 4 mm und variabler PE-Energie zeigen beide Substrate ein ähnliches Verhalten, wie Abbildungen 6.8a (*ITO160*) und 6.8b (*ITO22*) demonstrieren. Nanopartikel haben in Messungen und MC-Simulationen durchweg positiven Kontrast, der sich für $E_0 > 5$ keV asymptotisch null annähert. Ferner weisen beide Substrate bei $E_0 \leq 5$ keV ein Maximum auf. In diesem Zusammenhang deuten die MC-Simulationen in beiden Fällen auch klar Kontrastinversionen bei Energien unterhalb von 2 keV an, welche aber experimentell nicht nachgewiesen werden können aufgrund der stark abnehmenden Detektoreffizienz in diesem Energiebereich. Die Übereinstimmung zwischen Simulationen und Messung ist bei *ITO160* (Abbildung 6.8a) gut, insbesondere wenn ScR-Wirkungsquerschnitte verwendet werden. Dagegen sind die Diskrepanzen bei *ITO22* (Abbildung 6.8b) größer, wenn auch im Rahmen der Fehlerbalken noch akzeptabel. Auch hier passen Simulationen mit ScR-Wirkungsquerschnitten besser als die mit Mott.

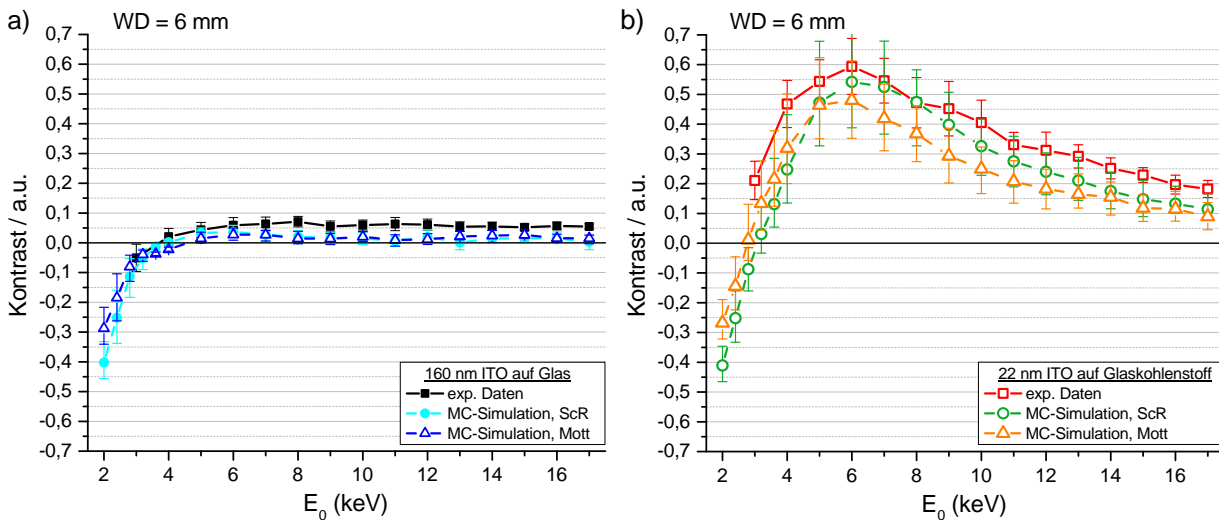


Abbildung 6.9. BSE-Kontrast von SiO_2 -NP auf (a) *ITO160* und (b) *ITO22* in Abhängigkeit von E_0 bei $\text{WD} = 6$ mm. Es werden experimentelle Daten (quadratische Symbole, durchgezogene Linien) mit MC-Simulationen verglichen, welche entweder mit Screened-Rutherford (kreisförmige Symbole, gestrichelte Linien) oder Cz-Mott (dreieckige Symbole, gestrichelte Linien) Wirkungsquerschnitten berechnet wurden.

Bei einer Erhöhung der WD um lediglich 2 mm auf 6 mm zeichnet sich auf *ITO160* bereits ein deutlich anderes Bild ab (Abbildung 6.9a). Die gemessene Kontrastkurve hat bei Energien ≥ 4 keV einen sehr flachen Verlauf und weist nur extrem geringe Kontrastwerte auf, jedoch kehrt er sich bei der kleinsten verwendeten PE-Energie von 3 keV ins Negative um. MC-Simulationen bestätigen dies, deuten aber auch eine schnelle Zunahme des negativen Kontrastes für $E_0 < 3$ keV an.

Auch beim *ITO22*-Substrat ist der Partikelkontrast bei $\text{WD} = 6$ mm grundsätzlich deutlich schwächer als im Fall $\text{WD} = 4$ mm (Abbildung 6.9b), gleichwohl ist der Verlauf vergleichbar: Maximum bei $E_0 = 6$ keV und asymptotische Annäherung an null für große Energien. Die Übereinstimmung der MC-Simulationen ist im Rahmen der Fehler ebenfalls ähnlich gut, wobei Screened-Rutherford bei $E_0 \geq 5$ keV wieder leicht besser abschneidet, dafür aber unterhalb von 5 keV zunehmend stärker von den Messwerten abweicht als Cz-Mott. Ferner implizieren Simulationen eine Kontrastinversion bei ca. 3 keV, welche bei Extrapolation der Messwerte tatsächlich zwischen 2 keV und 2,5 keV zu erwarten ist, d.h. außerhalb des verfügbaren Messbereiches.

Eine weitere Erhöhung des Arbeitsabstandes auf 10 mm verändert die Situation nur noch geringfügig (Abbildung 6.10). Bei *ITO160* nimmt die Steigung der Kontrastkurve weiter ab und die gemessene Kontrastinversion verschiebt sich nach 10 keV, gleichwohl nimmt der negative Kontrast für kleine PE-Energien merklich zu im Vergleich zu $\text{WD} = 6$ mm (Abbildung 6.10a). Für PE-

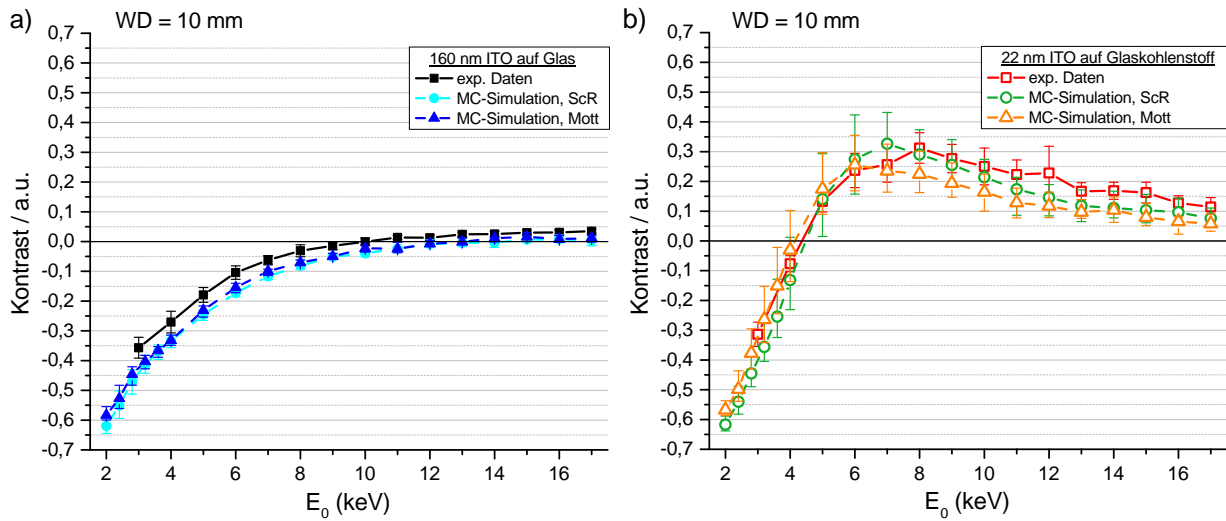


Abbildung 6.10. BSE-Kontrast von SiO_2 -NP auf (a) ITO160 und (b) ITO22 in Abhängigkeit von E_0 bei $WD = 10 \text{ mm}$. Es werden experimentelle Daten (quadratische Symbole, durchgezogene Linien) mit MC-Simulationen verglichen, welche entweder mit Screened-Rutherford (kreisförmige Symbole, gestrichelte Linien) oder Cz-Mott (dreieckige Symbole, gestrichelte Linien) Wirkungsquerschnitten berechnet wurden.

Energien $\geq 11 \text{ keV}$ ist der Kontrast jedoch weiterhin schwach positiv.

Auch bei *ITO22* verschiebt sich das Maximum weiter zu höheren Energien (8 keV) und der Kontrastverlauf flacht nochmals ab im Vergleich zu den beiden kleineren Arbeitsabständen, was in einer messbaren Kontrastumkehr zwischen 4 keV und 5 keV resultiert (Abbildung 6.10b).

Sowohl die deutliche Kontrastinversion beim dünnen Substrat als auch die kaum messbare Inversion auf *ITO160* werden auch bei konstantem 10 mm Arbeitsabstand von MC-Simulationen erfolgreich reproduziert. Generell sind berechnete und gemessene Kontrastwerte in guter Übereinstimmung, wobei bei *ITO22* abermals ScR-Wirkungsquerschnitte etwas besser passen als Mott.

Bei allen abgebildeten Graphen fällt auf, dass die berechneten Fehler der MC-Werte von *ITO22* deutlich größer sind als die von *ITO160*. Das ist eine unmittelbare Konsequenz der unterschiedlichen Schichtdicken im Zusammenhang mit der Methode, wie die Fehler berechnet werden (s. Abschnitt 4.5.1). Die durchgeführten Parametervariationen haben bei der Probe mit dünner ITO-Schicht eine prägnantere Auswirkung auf den Kontrast als bei der dickeren ITO-Schicht, insbesondere die Variation der Dicke um $\pm 5 \text{ nm}$. Die Empfindlichkeit der Simulation bezeugt die Notwendigkeit Materialparameter möglichst genau zu kennen, um präzise Berechnungen überhaupt zu ermöglichen.

Grundsätzlich lässt sich aber im Rahmen der Fehler eine gute Übereinstimmung der MC-Simulationen mit gemessenen Kontrastwerten festhalten. Im Spezialfall der in dieser Arbeit untersuchten komplexen Strukturen zeigen sich ScR-Wirkungsquerschnitte allgemein besser geeignet als Cz-Mott-Wirkungsquerschnitte, insbesondere beim Substrat mit der dünneren *ITO22*-Schicht. Auf dem *ITO160*-Substrat ist nur bei Arbeitsabständen $\leq 5 \text{ mm}$ ein merklicher Unterschied zugunsten von Screened-Rutherford feststellbar; ansonsten erscheint die Wahl des Wirkungsquerschnittes zweitrangig.

6.4 Diskussion des Ursprungs der Kontrastinversionen

Die beobachtete gute Übereinstimmung von berechneten Kontrastwerten mit Messergebnissen (Abbildungen 6.7 - 6.10) konstatiert die hervorragende Eignung von MC-Simulationen zur Modellierung von BSE-Bildern komplexer Strukturen. Gleichzeitig zeigen die untersuchten Kontrastinversionen, dass BSE-Kontrast nicht pauschal als Materialkontrast interpretiert werden kann. Obwohl zwischen SiO_2 -Nanopartikeln ($\bar{Z} = 10$) und ITO-Substraten ($\bar{Z} > 24$) negativer Kontrast zu erwarten ist, kann unter bestimmten Bedingungen auch positiver Kontrast vorliegen, wie Abbildungen 6.3 - 6.6 anschaulich zeigen. Im Folgenden werden die Ursachen hierfür diskutiert.

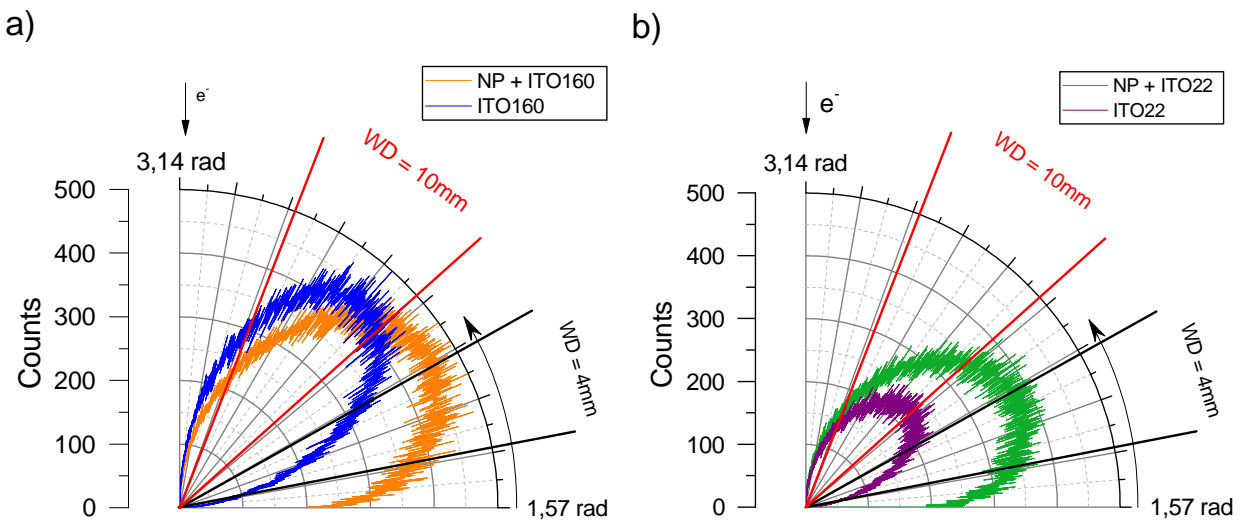


Abbildung 6.11. Polardiagramme der BSE-Winkelverteilungen bei $E_0 = 5 \text{ keV}$ auf (a) ITO160 mit (orange) und ohne (blau) NP, sowie auf (b) ITO22 ebenfalls mit (grün) und ohne (violett) NP. Die detektierten Winkelbereiche sind bei 4 mm WD schwarz und bei 10 mm WD rot markiert.

Bei 5 keV wird auf ITO160 eine vom Arbeitsabstand abhängige Kontrastinversion beobachtet (vgl. Abbildung 6.7a). Die Ursache hierfür liegt in der anisotropen Streuung von Elektronen und deren Beeinflussung durch das Platzieren eines Nanopartikels auf der flachen ITO-Oberfläche. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 6.11 anhand von Polardiagrammen berechneter Winkelverteilungen veranschaulicht. Gezeigt wird jeweils die Anzahl gezählter BSE in Abhängigkeit vom Streuwinkel zwischen 1,57 rad, d.h. $\pi/2$, und 3,14 rad, also π . Abbildung 6.11a zeigt den Fall eines 90 nm SiO_2 -NP auf ITO160 in orange sowie den Fall eines ITO160-Substrates allein, ohne NP, in blau. Die geraden schwarzen und roten Strahlen grenzen die vom Detektor abgedeckten Winkelbereiche bei 4 mm und 10 mm WD ein. In Abbildung 6.11b wird das gleiche für ITO22 gezeigt (grün mit NP, violett ohne NP). Es fällt auf, dass die Winkelverteilung bei beiden Modellen mit NP merklich zu kleineren Winkeln ausgerichtet ist im Vergleich zum reinen Substrat. Das Maximum liegt bei diesem nämlich zwischen 2,25 rad und 2,35 rad, während es mit vorhandenem NP bei nur ca. 2,15 rad liegt. Aus diesem Grund dominiert bei kleiner WD auf ITO160 das BSE-Signal des NP (positiver Kontrast). Bei großen Arbeitsabständen dominiert das BSE-Signal des ITOs, was zu einer Kontrastinversion führt (negativer Kontrast).

ITO22 ist deutlich dünner als ITO160. Der BSE-Beitrag des reinen Substrats ist daher nur etwa halb so groß im Vergleich zu 160 nm ITO (vgl. violett in Abbildung 6.11b und blau in Abbildung 6.11a), da deutlich mehr PE die dünne Beschichtung passieren ohne zurückgestreut zu werden. Aufgrund des geringeren BSE-Beitrag ist die BSE-Intensität mit NP auf dem Substrat trotz der Verschiebung der Verteilung zu größeren Winkeln über den gesamten Winkelbereich größer als

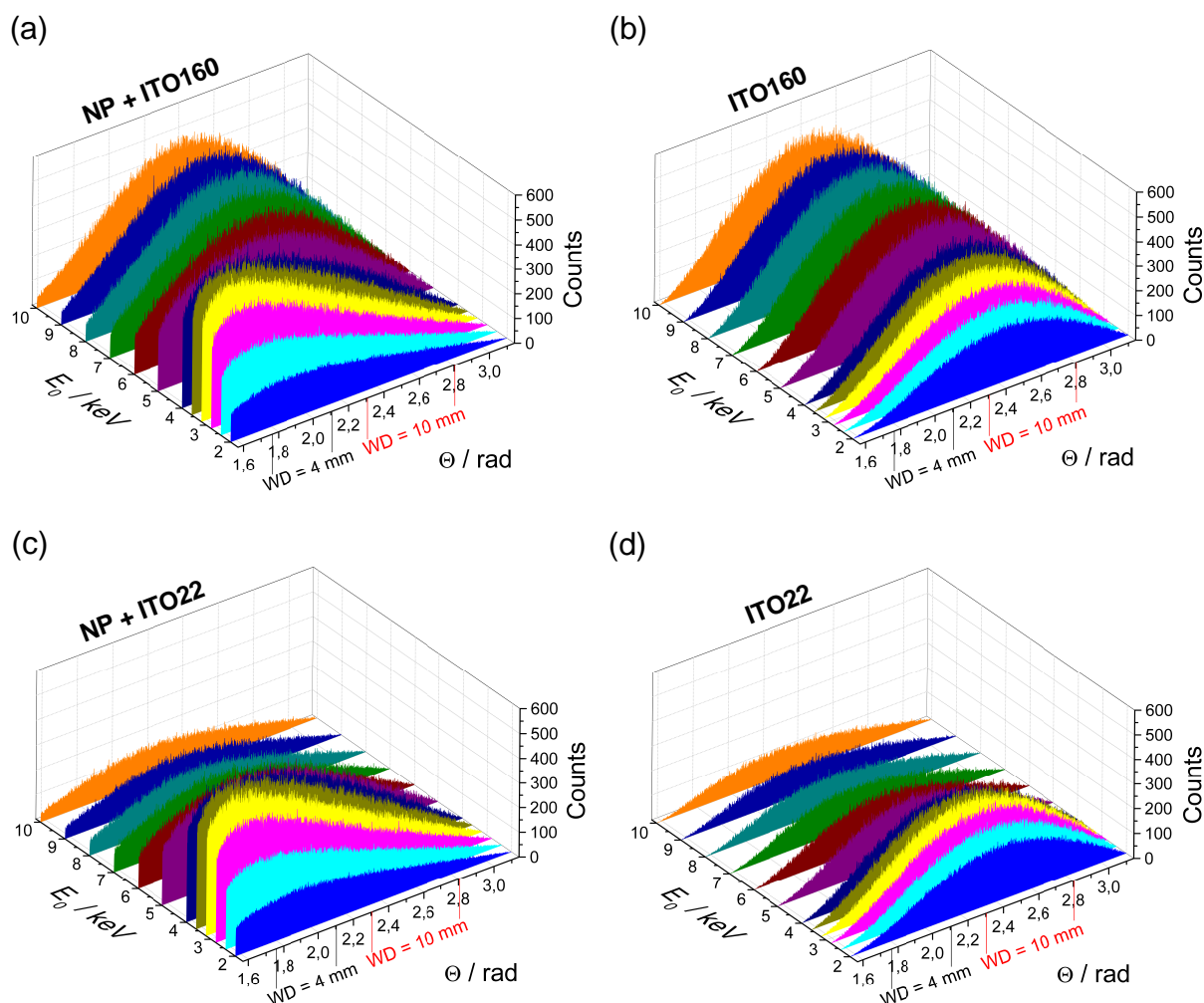


Abbildung 6.12. 3D-Graphen mittels MC-Simulationen berechneter BSE-Winkelverteilungen in Abhängigkeit von E_0 . Es werden die 4 hier diskutierten Fälle gezeigt: (a) NP auf 160 nm ITO auf Glas (NP + ITO160), (b) 160 nm ITO auf Glas (ITO160), (c) NP auf 22 nm ITO auf Glaskohlenstoff (NP + ITO22), und (d) 22 nm ITO auf Glaskohlenstoff (ITO22).

ohne NP, entsprechend ist der Kontrast stets positiv.

In Abbildung 6.12 wird der beschriebene Effekt nochmals in anderer Form veranschaulicht. 3D-Graphen zeigen mittels MC-Simulationen berechnete BSE-Winkelverteilungen für alle vier Fälle (ITO22 und ITO160, jeweils mit und ohne NP) in Abhängigkeit von E_0 . Beim Vergleich der BSE-Verteilungen mit vorhandenem NP (Abbildungen 6.12a und 6.12c) mit denen ohne NP (Abbildungen 6.12b und 6.12d), fällt auch in dieser Darstellung die Verschiebung zu kleineren Winkeln durch das Partikel auf. Ursache hierfür ist die starke Topografie der experimentellen Konfiguration (NP auf ITO-Substrat). Wie Robinson [146] und Joy [147] beschreiben, haben in niedrige Winkel gestreute BSE einen hohen topographischen Informationsgehalt. Demnach führt Topografie auf der Probe zu einer verstärkten BSE-Ausbeute im Kleinwinkelbereich und ist daher allgemein der Grund für den beobachteten positiven Partikelkontrast.

Darüber hinaus wird in Abbildung 6.12 deutlich, dass dieser Effekt energieabhängig ist: je kleiner E_0 , desto stärker ist die Verlagerung der BSE-Verteilung zu kleineren Streuwinkeln, da die Streu-

wahrscheinlichkeit innerhalb des Partikels zunimmt. Ab einer bestimmten Energie schwächt der Effekt aber wieder ab, da das Wechselwirkungsvolumen mit abnehmender Energie kleiner wird und die Partikeloberfläche zunehmend wie eine flache Oberfläche streut. Das Resultat sind Kontrastmaxima, wie sie beispielsweise in Abbildung 6.8a und 6.8b zu sehen sind. Hirsch et al. [11] haben einen ähnlichen Effekt bei BSE-Aufnahmen von Gold-NP auf Silizium-Substraten beobachtet: der Partikelkontrast wird maximal, wenn die Reichweite der Elektronen im Material dem Durchmesser der Partikel entspricht.

Neben den Kontrastmaxima führt die Energieabhängigkeit der topografiebedingten Verschiebung der BSE-Winkelverteilung auch zu den beobachteten energieabhängigen Kontrastinversionen. Wie weiter oben erwähnt ähnelt das Streuverhalten des Partikels bei sehr kleinen Energien dem einer ebenen, massiven Probe, sodass die Rückstreuung charakteristisch für das Material und negativer Materialkontrast theoretisch messbar ist. Ob er auch praktisch beobachtbar ist, ist dagegen abhängig vom verwendeten Arbeitsabstand, da die abnehmende Detektoreffizienz unterhalb von 3 keV den Messbereich stark einschränkt. Bei 4 mm WD ist der Einfluss der Topografie sehr ausgeprägt und die notwendigen Energien, um eine energieabhängige Kontrastinversion zu messen, liegen unterhalb des detektierbaren Bereiches (s. Abbildung 6.8). Erst bei Erhöhung der WD auf 6 mm reduziert sich der Einfluss der Topografie ausreichend (vgl. Abbildungen 6.12a und 6.12c), sodass der erwartete negative Materialkontrast bei Energien liegt, die messbar sind (Abbildung 6.9). Noch höhere Arbeitsabstände wie 10 mm vergrößern nochmals den Energiebereich, in dem negativer Materialkontrast vorliegt (Abbildung 6.10).

Im Allgemeinen nähern sich mit abnehmender E_0 die Kontrastwerte von *ITO22* und *ITO160* einander an (Abbildungen 6.8 - 6.10), da aufgrund des abnehmenden Wechselwirkungsvolumens die Streuung nur nahe der Oberfläche stattfindet und der Dickenunterschied zwischen beiden ITO-Schichten keine Rolle mehr spielt. Umgekehrt haben große PE-Energien allgemein den Effekt, dass die Elektronen aufgrund der zunehmenden mittleren freien Weglänge die Silika-Partikel vermehrt ungestreut passieren. Dies hat zur Folge, dass die BSE-Intensitäten selbst mit vorhandenem Partikel primär vom Substrat dominiert werden und dadurch mit und ohne Partikel nahezu identisch sind (s. Abbildung 6.12), was im Endeffekt den Kontrast auf beiden Proben verschwinden lässt.

Beim direkten Vergleich vom Kontrast auf *ITO22* und *ITO160* bei ansonsten identischen Bedingungen fallen vereinzelt Kontrastinversionen auf, die im ersten Moment auf die unterschiedlichen Substratmaterialien zurückführbar scheinen (beispielsweise bei $E_0 = 6$ keV und WD = 10 mm, Abbildung 6.6). Tatsächlich sind aber die unterschiedlich dicken ITO-Schichten Grund für die umgekehrten Vorzeichen der Kontraste. Während neben den bereits zuvor erwähnten Effekten der starke BSE-Beitrag der dicken ITO-Schicht (Abbildung 6.12b) zum negativen Materialkontrast auf *ITO160* führt, ist der Beitrag vom dünnen Substrat deutlich kleiner (Abbildung 6.12d), da die Elektronen ausreichend Energie haben, das dünne ITO zu passieren. Die Rückstreuung wird daher vom Kohlenstoffsubstrat dominiert, welche aufgrund der kleinen Ordnungszahl 6 viel schwächer ist, sodass topographiebedingter positiver Kontrast auf *ITO22* überwiegt.

Zur Bestätigung wurden ergänzende MC-Simulationen mit vertauschten ITO-Schichten durchgeführt, d.h. einem mit nur 22 nm ITO-beschichteten Glassubstrat und einem mit 160 nm ITO-beschichteten Glaskohlenstoffsubstrat. Abbildung 6.13 zeigt die Resultate energieabhängiger Berechnungen bei 10 mm WD. MC-Simulationen mit diesen hypothetischen Substraten werden in hellblau (160 nm ITO auf C) und orange (22 nm ITO auf SiO₂) dargestellt, während zum Vergleich Berechnungen mit den regulären Substraten in rot (*ITO22*) und blau (*ITO160*) abgebildet werden. Zusätzlich sind auch die entsprechenden Messergebnisse in dunkelrot (*ITO22*) und schwarz (*ITO160*) enthalten. Ein grüner Doppelpfeil markiert die Kontrastinversion aus Abbildung 6.6. Eine 160 nm ITO-Schicht auf einem Substrat aus amorphem Kohlenstoff würde demnach zu na-

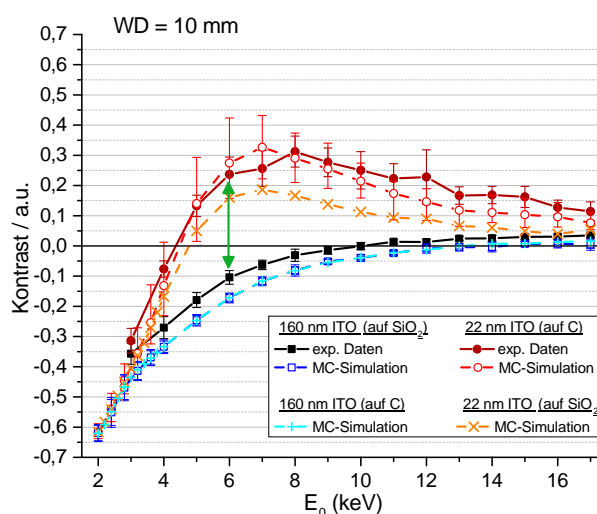


Abbildung 6.13. BSE-Kontrast von SiO_2 -NP in Abhängigkeit von E_0 bei $\text{WD} = 10 \text{ mm}$ auf unterschiedlichen Substraten. MC-Simulationen mit hypothetischen Substraten (160 nm ITO auf C, hellblau, und 22 nm ITO auf SiO_2 , orange) werden mit Simulationen mit realen Substraten (160 nm ITO auf SiO_2 , blau, und 22 nm ITO auf C, rot) verglichen. Ferner werden Messergebnisse auf ITO160 (schwarz) und ITO22 (dunkelrot) dargestellt.

hezu identischem Kontrast wie auf regulärem *ITO160* (mit Glassubstrat) führen, sodass keinerlei Kontrastumkehr zwischen diesen beiden beobachtbar wäre. Umgekehrt würde eine 22 nm dicke ITO-Schicht auf Glas einen ähnlichen Kontrastverlauf bewirken wie das reguläre *ITO22*-Substrat, sodass auch zwischen diesen beiden keine Kontrastinversion beobachtbar wäre. Folglich sind es – wie zuvor erläutert – die unterschiedlichen Dicken, die zum beobachteten invertierten Kontrast führen.

Basierend auf den diskutierten Ergebnissen lassen sich Empfehlungen für die Verwendung von Rückstreuelektroden bei der Untersuchung komplexer Strukturen im Nanobereich aufstellen.

Um Abbildungen mit bestmöglichem Materialkontrast zu erhalten, müssen folgende Bedingungen erfüllt werden:

- Es müssen kleine PE-Energien verwendet werden, sodass das Wechselwirkungsvolumen auf Areale nahe der Oberfläche beschränkt ist. Für Probengeometrien, wie sie in dieser Arbeit vorkommen, bedeutet dies $E_0 \leq 4 \text{ keV}$. Dabei gilt jedoch zu beachten, dass im Energiebereich unterhalb von 2 keV Rückstreukoeffizienten nicht mehr unabhängig von E_0 sind und daher nicht mehr zwangsläufig die Ordnungszahlen der Materialien widerspiegeln [97].
- Es sollten möglichst nur BSE detektiert werden, die in große Winkel zurückgestreut werden, um den Einfluss der Topografie zu minimieren. Bei einem ringförmigen Halbleiterdetektor unterhalb des Polschuhs bedeutet dies, dass große Arbeitsabstände verwendet werden müssen ($\text{WD} \geq 10 \text{ mm}$).

Falls dagegen das Ziel eine optimale Darstellung der Partikel mittels BSE ist, müssen sehr kleine Arbeitsabstände (hier 4 mm) eingesetzt werden. Dadurch wird Kontrastentstehung durch die vorhandene Topografie dominiert, was zu positivem Partikelkontrast und einer verbesserten Auflösung führt.

Bezüglich MC-Simulationen zeigen die Ergebnisse, dass es im untersuchten Energiebereich von 3 - 17 keV nur geringe bis moderate Unterschiede zwischen der Verwendung von ScR- oder Cz-Mott-Wirkungsquerschnitten gibt. Dies deckt sich mit Aussagen von Shimizu und Ze-Jun [148]

sowie Reimer [96], nach denen es bei Materialien von kleiner bis mittlerer Ordnungszahl und PE-Energien größer 5 keV kaum eine Rolle spielt, ob ScR- oder Cz-Mott-Wirkungsquerschnitte verwendet werden. Beide Bedingungen sind in dieser Arbeit erfüllt. Ungeachtet dessen zeigen MC-Simulationen mit ScR-Wirkungsquerschnitt generell eine geringfügig bessere Übereinstimmung mit Messergebnissen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass Rückstreuung in große Winkel vor allem am Kern des Zielatoms erfolgt und dies der Rutherford-Streuung zugrunde liegt. Aus diesem Grund empfehlen sich bei ähnlichen experimentellen Bedingungen wie in dieser Arbeit ScR-Wirkungsquerschnitte für MC-Simulationen des BSE-Kontrastes.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Depositionsverhalten von Siliziumdioxid-Nanopartikeln (NP) auf Zellen in Partikel/Zellkulturmedium-Suspensionen. Die Fragestellung ist motiviert durch nanotoxikologische *in-vitro*-Studien, in denen Zellen am Boden eines Reaktionsgefäßes einer Teilchen/Zellkulturmedium-Suspension mit definierter Teilchenkonzentration ausgesetzt werden, um Korrelationen zwischen aufgenommener Partikeldosis in den Zellen und biologischer Wirkung abzuleiten. Zur Bewertung der aufgenommenen Partikeldosis ist ein detailliertes Verständnis des Depositionsverhaltens der Partikel notwendig. Partikelgröße und Expositionsdauer sind entscheidende Parameter für die Deposition, die durch Diffusion und gravitationsgetriebene Sedimentation bestimmt wird.

Der zweite Aspekt dieser Arbeit behandelt die Optimierung des Partikelkontrastes auf den stark strukturierten Zelloberflächen sowie grundlegende Aspekte des Rückstreuelektronenkontrastes von kleinen Partikeln und dessen quantitative Beschreibung mit Monte-Carlo (MC) Simulationen.

In diesem Kontext wurden *in-vitro*-Experimente mit SiO₂-Partikel von 100, 200 und 500 nm Durchmesser durchgeführt. Nach der Exposition von Lungenepithelzellen (Zelllinie A549) mit Partikeln für 1 h bzw. 4 h bei unterschiedlichen Eingabekonzentrationen wurden die Proben fixiert, entwässert und getrocknet. Die deponierte Partikel-Flächendichte wurde mit Rasterelektronenmikroskopie (REM) bestimmt und mit berechneten Flächendichten verglichen. Da es im Rasterelektronenmikroskop bei Betrachtung nichtleitender Proben zu starker Aufladung kommt und damit zu Bildverzerrungen, wurden die Zellen auf Indium-Zinn-Oxid (ITO) beschichteten Glassubstraten kultiviert. ITO hat eine hohe elektrische Leitfähigkeit und reduziert somit deutlich die Aufladung der Proben.

Im Rasterelektronenmikroskop wurden REM-Aufnahmen von Zelloberflächen (sogenannte zelluläre Bereiche) und freien Substratflächen zwischen den Zellen (sogenannte interzelluläre Bereiche) erstellt. Die Auswertung dieser Bilder hinsichtlich der deponierten Partikel-Flächendichte erfolgte mit Hilfe einer semi-automatischen Zählsoftware, die mittels verschiedener Algorithmen Partikel identifiziert, zählt und im Bild markiert, sodass auch eine manuelle Kontrolle und Korrektur des Ergebnisses möglich ist. Die Resultate zeigten, dass unabhängig von Partikelgröße, Eingabekonzentration und Expositionsdauer in interzellulären Bereichen deutlich mehr SiO₂-Partikel deponieren als auf den Zelloberflächen.

Die naheliegendste Erklärung für diese Diskrepanzen ist eine Inkorporation von Partikeln durch die Zellen während der Exposition. Die Partikelaufnahme wurde deshalb mit einem kombinierten focused-ion-beam (FIB)/REM-System untersucht, indem Zellen sukzessive mit FIB aufgeschnitten und mit REM im Querschnitt abgebildet wurden. Zusätzlich wurden Dünnschnitte von in Epoxidharz eingebetteten Zellen mittels Rastertransmissionselektronenmikroskopie (STEM) auf Partikelaufnahme hin analysiert. Während die FIB-Tomografie nur eine geringe Partikelkonzentration in den Proben offenlegte, erbrachten STEM-Untersuchungen diesbezüglich keine eindeutigen

Ergebnisse. Die Quantifizierung der mittels STEM beobachteten Partikelaufnahme wurde aber als statistisch nicht signifikant eingestuft, da mit dieser Technik nur ein sehr kleiner Ausschnitt der Probe untersucht wird. Deshalb kommt diese Arbeit zu dem Schluss, dass grundsätzlich Aufnahme von SiO_2 -Partikeln durch A549-Zellen zwar existiert, sie jedoch als zu gering erachtet wird, um die Unterschiede zwischen zellulären und interzellulären effektiven Dosen zu erklären.

Aufgrund der Fixierung der Proben mit Paraformaldehyd konnte auch ein Abwaschen der Partikel von Zelloberflächen ausgeschlossen werden, weshalb eine Beeinflussung der deponierten Dosis durch die Zellen selbst untersucht wurde. Hierzu wurden Depositionsexperimente mit zellfreien ITO-Substraten durchgeführt, die unterschiedlichen Vorbeschichtungen unterzogen wurden. Zum einen wurden die Substrate mit regulärem Zellkulturmedium (CCM) vorbeschichtet, zum anderen mit konditioniertem CCM. Konditioniertes Medium wurde aus dreitägigen Zellkulturen entnommen, weshalb es zusätzlich zahlreiche, von den Zellen abgesonderte zellspezifische Proteine enthält. Abgesehen von der Vorbeschichtung verlief die Probenpräparation identisch wie in den Versuchen mit Zellen, sodass die Resultate vergleichbar sind. Die Auswertung der REM-Aufnahmen ergab eine stark verringerte Deposition aller Partikelgrößen auf beiden zellfreien Substraten, verglichen mit interzellulären Messungen in Anwesenheit von Zellen. Darüber hinaus konnte in fast allen Fällen eine größere Menge Partikel auf den mit konditioniertem CCM vorbeschichteten Substraten festgestellt werden als auf den mit regulärem CCM vorbeschichteten Substraten.

Unter Berücksichtigung dieser Resultate kommt diese Arbeit zu dem Schluss, dass die Bindung der Partikel an spezifische Dockingplätze erfolgen muss, sowohl auf den Zellen als auch in interzellulären Bereichen. Zellulär handelt es dabei vermutlich um Rezeptoren, die an spezielle Proteine in der Proteinkorona der Partikel binden. Interzellulär werden Defekte in der Proteinbeschichtung des Substrates vermutet. Da ein Weglassen der Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Deposition auf dem Substrat führt, müssen diese Defekte großteils durch die Zellen selbst erzeugt werden. Ferner verändern die im konditionierten CCM enthaltenen Moleküle, die von A549-Zellen abgesondert wurden, unweigerlich die Proteinbeschichtung des Substrates und führen so vermutlich zu einer weiteren Zunahme von Dockingplätzen auf dem Substrat. Die unterschiedlichen zellulären und interzellulären Flächendichten können deshalb durch unterschiedliche Dichten von Dockingplätzen in den jeweiligen Bereichen erklärt werden.

Allgemein wird der REM eine exzellente Eignung zur Quantifizierung von deponierten effektiven Dosen konstatiert. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und räumlichen Auflösung können sehr geringe Flächendichten von wenigen Partikeln pro $100 \mu\text{m}^2$ gemessen werden.

Die Abhängigkeit der gemessenen Partikel-Flächendichte von adhäsiven Eigenschaften der Substrate und Zellen, hier im Speziellen von der Konzentration von Dockingplätzen, stellt eine Schwierigkeit für die Simulation der Partikeldeposition dar. Das weitverbreitete *In vitro Sedimentation, Diffusion and Dosimetry* Modell, kurz ISDD, berücksichtigt in keiner Form derartige Effekte, weshalb es in den in dieser Arbeit gezeigten Fällen mit geringer Deposition versagt. Das neuere *Distorted Grid* (DG) Modell dagegen hat variable Adsorptionseigenschaften in Form der sogenannten *stickiness* implementiert. Beschrieben wird diese durch eine Langmuirsche Gleichgewichtskonstante K_D , welche bisher jedoch nicht messbar ist, sondern nur abgeschätzt werden kann. Ungeachtet dessen zeigten sich Simulationen unter *sticky* Bedingungen, d.h. mit einer starken Adhäsion, geeignet, die hohen interzellulär gemessenen Partikelmengen wiederzugeben. Unter *non-sticky* Randbedingungen, d.h. einer minimalen Adhäsion der Partikel an die Oberfläche, konnten auch recht erfolgreich sowohl die zellulär gemessenen als auch die auf zellfreien Substraten gemessenen Partikel-Flächendichten berechnet werden. Bei einer umfassenden Fehlerbetrachtung zeigte sich aber, dass die Berechnungen sehr empfindlich auf Messunsicherheiten des hydrodynamischen Durchmessers sind. Der hydrodynamische Durchmesser gilt als Maß für die effektive Größe von geladenen Teilchen in Suspensionen, die durch die Anlagerung von ionischen Molekülen aus dem CCM gegeben ist. Oft

wird der hydrodynamische Durchmesser mittels dynamischer Lichtstreuung gemessen, jedoch ist dieses Verfahren sehr fehleranfällig, was zu unrealistischen Ergebnissen führen kann. Daher sollten alternative Techniken zur Messung der Partikelgröße in Suspensionen gesucht werden.

Die Abbildung von SiO_2 -Nanopartikeln auf Zellen im Rasterelektronenmikroskop stellte aufgrund der Komplexität der zu untersuchenden Objekte eine besondere Herausforderung dar. Aus diesem Grund befasste sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Optimierung des Partikelkontrastes. Abbildungen mit Sekundärelektronen (SE), die guten Topografiekontrast zeigen, sind gut geeignet, die Partikel-Flächendichte auf ITO/Glas-Substraten zu bestimmen. Auf Zelloberflächen war dies mit SE jedoch nicht möglich, da die Topografie der sehr grobstrukturierten Zelloberfläche den NP-Kontrast überdeckt. Hohen Partikelkontrast liefern dagegen Materialkontrastabbildungen mit Rückstreuielektronen (BSE). Da die mittlere Ordnungszahl von SiO_2 ($\bar{Z} = 10$) etwas größer ist als von Zellmaterial (Hauptbestandteil Kohlenstoff, $\bar{Z} \approx 6$), heben sich die NP in BSE-Abbildungen vom zellulären Hintergrund mit hellem Kontrast ab. Eine Optimierung des Partikelkontrastes in BSE-Aufnahmen erfolgte basierend auf Erkenntnissen aus umfangreichen Untersuchungen zur Kontrastentstehung in BSE-Aufnahmen von komplexen Strukturen (s.u.). Die Verwendung eines ringförmigen Halbleiterdetektors, der mittig unter dem Polschuh angebracht wird, ermöglichte es, durch Variation des Abstandes der Probe zum Detektor, BSE aus unterschiedlichen Winkelbereichen zu detektieren. Besonders günstig erwiesen sich kleine Abstände, welche ein gemischtes Signal aus Materialkontrast und Topografiekontrast liefern. Eine zusätzliche Verstärkung des Kontrastes wurde durch das Anlegen einer Bremsspannung an die Probenbühne erzielt, wodurch austretende SE und BSE zum Detektor hin beschleunigt werden. Der so generierte Partikelkontrast von SiO_2 -NP ermöglichte auch auf den Zellen eine zuverlässige Partikeldetektion und Quantifizierung der Partikel-Flächendichten.

Bei der Abbildung von SiO_2 -NP auf ITO/Glas-Substraten mittels BSE wurden unerwartete Inversionen des NP-Kontrastes beobachtet. Aufgrund der kleineren mittleren Ordnungszahl von SiO_2 ($\bar{Z} = 10$) gegenüber ITO ($\bar{Z} > 24$, je nach Stöchiometrie) erwartet man dunklen Materialkontrast der NP. Dennoch wurde vereinzelt heller Partikelkontrast beobachtet. Aus diesem Grund wurden systematische Untersuchungen des BSE-Kontrastes von SiO_2 -NP auf zwei Substraten mit unterschiedlicher ITO-Schichtdicke in Abhängigkeit von Primärelektronen-Energie und Arbeitsabstand durchgeführt und mit MC-Simulationen verglichen. Durch die erfolgreiche Korrektur der spezifischen Eigenschaften des ringförmigen, zentral unter dem Polschuh befestigten Halbleiterdetektors konnte eine gute Übereinstimmung der mit MC-Simulationen berechneten Kontraste mit gemessenen Daten erzielt werden. Die Korrektur berücksichtigt, dass die Detektoreffizienz zu niedrigen Energien abnimmt. Dieser Effekt wird durch die metallische Schutzschicht des Halbleiters hervorgerufen. Ferner musste berücksichtigt werden, dass ein Halbleiterdetektor nicht die Anzahl der BSE misst, sondern deren Energie. Mit Hilfe der MC-Simulationen konnten die beobachteten Kontrastinversionen auf eine energieabhängige Verschiebung der BSE-Winkelverteilung zurückgeführt werden, die durch die Topografie der SiO_2 -NP auf dem flachen ITO-Substrat hervorgerufen wird. Hieraus ergibt sich die Empfehlung, bei BSE-Abbildung ähnlich komplexer Strukturen niedrige Primärelektronen-Energien $< 4 \text{ keV}$ und große Arbeitsabstände $\geq 10 \text{ mm}$ zu verwenden, um optimalen Materialkontrast zu erhalten. MC-Simulationen auf Basis von Screened-Rutherford- und Mott-Wirkungsquerschnitten haben gezeigt, dass unter den gegebenen Bedingungen nur geringe Unterschiede zwischen beiden Wirkungsquerschnitten auftreten. Da aber MC-Simulationen mit dem Screened-Rutherford-Wirkungsquerschnitt generell eine etwas bessere Übereinstimmung mit den Experimenten zeigten, wird empfohlen, bei vergleichbaren experimentellen Bedingungen (Materialien, Primärelektronen-Energien) auf diesen Wirkungsquerschnitt zurückzugreifen.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass REM-Abbildungen gut geeignet sind, die Deposition von 100 bis

500 nm großen SiO_2 -Partikeln auf Zellen zu quantifizieren. Für zukünftige Arbeiten wäre es interessant, dies auch für kleinere Partikel zu untersuchen, da Partikel mit 100 nm Durchmesser die Obergrenze für Nanomaterialien darstellen. Gegebenenfalls ist auch ein Wechsel des Partikelmaterials zu schwereren Materialien interessant, wie Titandioxid oder Eisenoxid. Um eine Beeinflussung des Depositionsprozesses durch das gewählte ITO-Substrat auszuschließen, kann auch ein Wechsel der Substratbeschichtung in Betracht gezogen werden. Als Alternative zum Halbleiter ITO kommen beispielsweise reine Metalle wie Gold in Betracht, sofern sie die nötige Biokompatibilität aufweisen.

Im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen der Kontrastentstehung bei BSE-Abbildungen von komplexen Strukturen besteht die Möglichkeit einen empfindlicheren Detektor zu verwenden, der auch bei sehr kleinen Elektronenenergien noch ausreichend Signal liefert. Damit ließe sich auch der von MC-Simulationen prognostizierte Verlauf des BSE-Kontrastes unterhalb von 3 keV bestätigen.

Literaturverzeichnis

- [1] D. B. Warheit, T. A. McHugh, and M. A. Hartsky, “Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts,” *Scandinavian journal of work, environment & health*, vol. 21 Suppl 2, pp. 19–21, 1995.
- [2] J. G. Teeguarden, P. M. Hinderliter, G. Orr, B. D. Thrall, and J. G. Pounds, “Particokinetics In Vitro: Dosimetry Considerations for In Vitro Nanoparticle Toxicity Assessments,” *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 95, no. 2, pp. 300–312, 2007.
- [3] M. Mason and W. Weaver, “The Settling of Small Particles in a Fluid,” *Physical Review*, vol. 23, no. 3, pp. 412–426, 1924.
- [4] A. Verma and F. Stellacci, “Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions,” *Small*, vol. 6, no. 1, pp. 12–21, 2010.
- [5] B. Halamoda-Kenzaoui, M. Ceridono, P. Colpo, A. Valsesia, P. Urban, I. Ojea-Jimenez, S. Gioria, D. Gilliland, F. Rossi, and A. Kinsner-Ovaskainen, “Dispersion Behaviour of Silica Nanoparticles in Biological Media and Its Influence on Cellular Uptake,” *PLoS one*, vol. 10, no. 10, p. e0141593, 2015.
- [6] G. Rischitor, M. Parracino, R. La Spina, P. Urban, I. Ojea-Jimenez, E. Bellido, A. Valsesia, S. Gioria, R. Capomaccio, A. Kinsner-Ovaskainen, D. Gilliland, F. Rossi, and P. Colpo, “Quantification of the cellular dose and characterization of nanoparticle transport during in vitro testing,” *Particle and fibre toxicology*, vol. 13, no. 1, p. 47, 2016.
- [7] P. M. Hinderliter, K. R. Minard, G. Orr, W. B. Chrisler, B. D. Thrall, J. G. Pounds, and J. G. Teeguarden, “ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies,” *Particle and fibre toxicology*, vol. 7, no. 1, p. 36, 2010.
- [8] G. M. DeLoid, J. M. Cohen, G. Pyrgiotakis, S. V. Pirela, A. Pal, J. Liu, J. Srebric, and P. Demokritou, “Advanced computational modeling for in vitro nanomaterial dosimetry,” *Particle and fibre toxicology*, vol. 12, p. 32, 2015.
- [9] H. Peuschel, T. Ruckelshausen, C. Cavelius, and A. Kraegeloh, “Quantification of Internalized Silica Nanoparticles via STED Microscopy,” *BioMed research international*, vol. 2015, p. 961208, 2015.
- [10] H. Pluk, D. J. Stokes, B. Lich, B. Wieringa, and J. Fransen, “Advantages of indium-tin oxide-coated glass slides in correlative scanning electron microscopy applications of uncoated cultured cells,” *Journal of Microscopy*, vol. 233, no. 3, pp. 353–363, 2009.
- [11] P. Hirsch, M. Kässens, L. Reimer, R. Senkel, and M. Spranck, “Contrast of colloidal gold particles and thin films on a silicon substrate observed by backscattered electrons in a low-voltage scanning electron microscope,” *Ultramicroscopy*, vol. 50, no. 3, pp. 263–267, 1993.

- [12] The European Commission, "Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial," *Official Journal of the European Union*, no. L 275, pp. 38–40, 2011.
- [13] L. L. Sohn, "Nanotechnology: A quantum leap for electronics," *Nature*, vol. 394, no. 6689, pp. 131–132, 1998.
- [14] G. Brumfiel, "Consumer products leap aboard the nano bandwagon," *Nature*, vol. 440, no. 7082, p. 262, 2006.
- [15] FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization], "FAO/WHO Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications: Meeting Report," pp. 1–134, 2010.
- [16] The European Commission, "Types and uses of nanomaterials, including safety aspects: Commission staff working paper," 2012.
- [17] Y. Liu, H. Miyoshi, and M. Nakamura, "Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles," *International journal of cancer*, vol. 120, no. 12, pp. 2527–2537, 2007.
- [18] N. Ahmed, H. Fessi, and A. Elaissari, "Theranostic applications of nanoparticles in cancer," *Drug discovery today*, vol. 17, no. 17-18, pp. 928–934, 2012.
- [19] W. Cai and X. Chen, "Multimodality molecular imaging of tumor angiogenesis," *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, vol. 49 Suppl 2, pp. 113S–128S, 2008.
- [20] K. Donaldson, L. Tran, L. A. Jimenez, R. Duffin, D. E. Newby, N. Mills, W. MacNee, and V. Stone, "Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure," *Particle and fibre toxicology*, vol. 2, p. 10, 2005.
- [21] R. D. Brook, B. Franklin, W. Cascio, Y. Hong, G. Howard, M. Lipsett, R. Luepker, M. Mittelman, J. Samet, S. C. Smith, and I. Tager, "Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association," *Circulation*, vol. 109, no. 21, pp. 2655–2671, 2004.
- [22] C. A. Pope, R. T. Burnett, G. D. Thurston, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, and J. J. Godleski, "Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease," *Circulation*, vol. 109, no. 1, pp. 71–77, 2004.
- [23] G. Oberdörster, E. Oberdörster, and J. Oberdörster, "Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles," *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, no. 7, pp. 823–839, 2005.
- [24] T. Xia, N. Li, and A. E. Nel, "Potential health impact of nanoparticles," *Annual review of public health*, vol. 30, pp. 137–150, 2009.
- [25] A. D. Maynard, R. J. Aitken, T. Butz, V. Colvin, K. Donaldson, G. Oberdörster, M. A. Philbert, J. Ryan, A. Seaton, V. Stone, S. S. Tinkle, L. Tran, N. J. Walker, and D. B. Warheit, "Safe handling of nanotechnology," *Nature*, vol. 444, no. 7117, pp. 267–269, 2006.
- [26] K. Donaldson, "The Quartz Hazard: A Variable Entity," *The Annals of Occupational Hygiene*, vol. 42, no. 5, pp. 287–294, 1998.

- [27] D. Dutta and B. M. Moudgil, "Crystalline Silica Particles Mediated Lung Injury," *KONA Powder and Particle Journal*, vol. 25, no. 0, pp. 76–87, 2007.
- [28] S. Dekkers, P. Krystek, R. J. B. Peters, D. P. K. Lankveld, B. G. H. Bokkers, P. H. van Hoeven-Arentzen, H. Bouwmeester, and A. G. Oomen, "Presence and risks of nanosilica in food products," *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 3, pp. 393–405, 2011.
- [29] S. Dekkers, H. Bouwmeester, P. M. J. Bos, R. J. B. Peters, A. G. Rietveld, and A. G. Oomen, "Knowledge gaps in risk assessment of nanosilica in food: evaluation of the dissolution and toxicity of different forms of silica," *Nanotoxicology*, vol. 7, no. 4, pp. 367–377, 2013.
- [30] J. Lu, M. Liong, S. Sherman, T. Xia, M. Kovoichich, A. E. Nel, J. I. Zink, and F. Tamanoi, "Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy: Energy-Dependent Cellular Uptake and Delivery of Paclitaxel to Cancer Cells," *Nanobiotechnology : the journal at the intersection of nanotechnology, molecular biology, and biomedical sciences*, vol. 3, no. 2, pp. 89–95, 2007.
- [31] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, and V. S.-Y. Lin, "Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, no. 11, pp. 1278–1288, 2008.
- [32] D.-M. Huang, Y. Hung, B.-S. Ko, S.-C. Hsu, W.-H. Chen, C.-L. Chien, C.-P. Tsai, C.-T. Kuo, J.-C. Kang, C.-S. Yang, C.-Y. Mou, and Y.-C. Chen, "Highly efficient cellular labeling of mesoporous nanoparticles in human mesenchymal stem cells: implication for stem cell tracking," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 19, no. 14, pp. 2014–2016, 2005.
- [33] H. Shi, X. He, Y. Yuan, K. Wang, and D. Liu, "Nanoparticle-based biocompatible and long-life marker for lysosome labeling and tracking," *Analytical chemistry*, vol. 82, no. 6, pp. 2213–2220, 2010.
- [34] W. Stöber, A. Fink, and E. Bohn, "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 26, no. 1, pp. 62–69, 1968.
- [35] C. Boissière, A. van der Lee, A. E. Mansouri, A. Larbot, and E. Prouzet, "A double step synthesis of mesoporous micrometric spherical MSU-X silica particles," *Chemical Communications*, no. 20, pp. 2047–2048, 1999.
- [36] A. Kühn, "Über die Wirkung intravenöser Kieselsäureinjektionen bei Arteriosklerose, Stenokardie und verwandten Zuständen.," *Muenchener medizinische Wochenschrift*, 1921.
- [37] M. Roth, "Zur Frage der Kieselsäurebehandlung bei Lungentuberkulose.," *Therapie der Gegenwart*, 1921.
- [38] J. D. Harley and J. Margolis, "Hæmolytic Activity of Colloidal Silica," *Nature*, vol. 189, no. 4769, pp. 1010–1011, 1961.
- [39] W.-S. Cho, M. Choi, B. S. Han, M. Cho, J. Oh, K. Park, S. J. Kim, S. H. Kim, and J. Jeong, "Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles," *Toxicology letters*, vol. 175, no. 1-3, pp. 24–33, 2007.
- [40] E.-J. Park and K. Park, "Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro," *Toxicology letters*, vol. 184, no. 1, pp. 18–25, 2009.

- [41] W. Lin, Y.-W. Huang, X.-D. Zhou, and Y. Ma, "In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells," *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 217, no. 3, pp. 252–259, 2006.
- [42] D. Lison, L. C. J. Thomassen, V. Rabolli, L. Gonzalez, D. Napierska, J. W. Seo, M. Kirsch-Volders, P. Hoet, C. E. A. Kirschhock, and J. A. Martens, "Nominal and effective dosimetry of silica nanoparticles in cytotoxicity assays," *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 104, no. 1, pp. 155–162, 2008.
- [43] D. Napierska, L. C. J. Thomassen, D. Lison, J. A. Martens, and P. H. Hoet, "The nanosilica hazard: another variable entity," *Particle and fibre toxicology*, vol. 7, no. 1, p. 39, 2010.
- [44] X. Yang, J. Liu, H. He, L. Zhou, C. Gong, X. Wang, L. Yang, J. Yuan, H. Huang, L. He, B. Zhang, and Z. Zhuang, "SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells," *Particle and fibre toxicology*, vol. 7, p. 1, 2010.
- [45] H. Gehrke, A. Frühmesser, J. Pelka, M. Esselen, L. L. Hecht, H. Blank, H. P. Schuchmann, D. Gerthsen, C. Marquardt, S. Diabaté, C. Weiss, and D. Marko, "In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells," *Nanotoxicology*, vol. 7, no. 3, pp. 274–293, 2013.
- [46] H. Liang, C. Jin, Y. Tang, F. Wang, C. Ma, and Y. Yang, "Cytotoxicity of silica nanoparticles on HaCaT cells," *Journal of applied toxicology : JAT*, vol. 34, no. 4, pp. 367–372, 2014.
- [47] L. Shang, K. Nienhaus, and G. U. Nienhaus, "Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters," *Journal of nanobiotechnology*, vol. 12, p. 5, 2014.
- [48] O. Okoturo-Evans, A. Dybowska, E. Valsami-Jones, J. Cupitt, M. Gierula, A. R. Boobis, and R. J. Edwards, "Elucidation of toxicity pathways in lung epithelial cells induced by silicon dioxide nanoparticles," *PLoS one*, vol. 8, no. 9, p. e72363, 2013.
- [49] D. Docter, C. Bantz, D. Westmeier, H. J. Galla, Q. Wang, J. C. Kirkpatrick, P. Nielsen, M. Maskos, and R. H. Stauber, "The protein corona protects against size- and dose-dependent toxicity of amorphous silica nanoparticles," *Beilstein journal of nanotechnology*, vol. 5, pp. 1380–1392, 2014.
- [50] C. D. Walkey and W. C. W. Chan, "Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment," *Chemical Society reviews*, vol. 41, no. 7, pp. 2780–2799, 2012.
- [51] M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati, and K. A. Dawson, "Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials," *Nature nanotechnology*, vol. 7, no. 12, pp. 779–786, 2012.
- [52] K. Wittmaack, "Excessive delivery of nanostructured matter to submersed cells caused by rapid gravitational settling," *ACS nano*, vol. 5, no. 5, pp. 3766–3778, 2011.
- [53] L. C. J. Thomassen, D. Napierska, K. Masschaele, L. Gonzalez, V. Rabolli, M. Kirsch-Volders, J. Vermant, P. H. Hoet, J. A. Martens, and D. Lison, "Letter to the editor regarding the article by Wittmaack," *Chemical research in toxicology*, vol. 25, no. 1, pp. 4–6; author reply 7–10, 2012.
- [54] K. Wittmaack, "Reply to the Letter to the Editor Regarding My Article on Dose Metrics in Nanotoxicity Studies (Wittmaack, 2011)," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 25, no. 1, pp. 7–10, 2012.

- [55] I. Stayton, J. Winiarz, K. Shannon, and Y. Ma, "Study of uptake and loss of silica nanoparticles in living human lung epithelial cells at single cell level," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 394, no. 6, pp. 1595–1608, 2009.
- [56] K. O. Yu, C. M. Grabinski, A. M. Schrand, R. C. Murdock, W. Wang, B. Gu, J. J. Schlager, and S. M. Hussain, "Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 11, no. 1, pp. 15–24, 2009.
- [57] M. Al-Rawi, S. Diabaté, and C. Weiss, "Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells," *Archives of toxicology*, vol. 85, no. 7, pp. 813–826, 2011.
- [58] M. Gualtieri, T. Skuland, T.-G. Iversen, M. Lag, P. Schwarze, D. Bilanicova, G. Pojana, and M. Refsnes, "Importance of agglomeration state and exposure conditions for uptake and pro-inflammatory responses to amorphous silica nanoparticles in bronchial epithelial cells," *Nanotoxicology*, vol. 6, no. 7, pp. 700–712, 2012.
- [59] A. Lesniak, F. Fenaroli, M. P. Monopoli, C. Aberg, K. A. Dawson, and A. Salvati, "Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells," *ACS nano*, vol. 6, no. 7, pp. 5845–5857, 2012.
- [60] G. Oberdörster, A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit, and H. Yang, "Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy," *Particle and fibre toxicology*, vol. 2, p. 8, 2005.
- [61] L. K. Limbach, Y. Li, R. N. Grass, T. J. Brunner, M. A. Hintermann, M. Muller, D. Gunther, and W. J. Stark, "Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations," *Environmental Science & Technology*, vol. 39, no. 23, pp. 9370–9376, 2005.
- [62] E. C. Cho, Q. Zhang, and Y. Xia, "The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles," *Nature nanotechnology*, vol. 6, no. 6, pp. 385–391, 2011.
- [63] G. DeLoid, J. M. Cohen, T. Darrah, R. Derk, L. Rojanasakul, G. Pyrgiotakis, W. Wohlleben, and P. Demokritou, "Estimating the effective density of engineered nanomaterials for in vitro dosimetry," *Nature communications*, vol. 5, p. 3514, 2014.
- [64] A. Bruinink, J. Wang, and P. Wick, "Effect of particle agglomeration in nanotoxicology," *Archives of toxicology*, vol. 89, no. 5, pp. 659–675, 2015.
- [65] J. S. Gebauer, M. Malissek, S. Simon, S. K. Knauer, M. Maskos, R. H. Stauber, W. Peukert, and L. Treuel, "Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure," *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 28, no. 25, pp. 9673–9679, 2012.
- [66] K. Wittmaack, "Novel dose metric for apparent cytotoxicity effects generated by in vitro cell exposure to silica nanoparticles," *Chemical research in toxicology*, vol. 24, no. 2, pp. 150–158, 2011.
- [67] J. M. Cohen, J. G. Teeguarden, and P. Demokritou, "An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials," *Particle and fibre toxicology*, vol. 11, p. 20, 2014.

- [68] J. T. Rashkow, S. C. Patel, R. Tappero, and B. Sitharaman, "Quantification of single-cell nanoparticle concentrations and the distribution of these concentrations in cell population," *Journal of the Royal Society, Interface*, vol. 11, no. 94, p. 20131152, 2014.
- [69] S. W. Hell and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Optics Letters*, vol. 19, no. 11, p. 780, 1994.
- [70] T. A. Klar and S. W. Hell, "Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy," *Optics Letters*, vol. 24, no. 14, p. 954, 1999.
- [71] D. Wildanger, B. R. Patton, H. Schill, L. Marseglia, J. P. Hadden, S. Knauer, A. Schöngle, J. G. Rarity, J. L. O'Brien, S. W. Hell, and J. M. Smith, "Solid immersion facilitates fluorescence microscopy with nanometer resolution and sub-ångström emitter localization," *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, vol. 24, no. 44, pp. OP309–13, 2012.
- [72] H. Gehrke, J. Pelka, C. G. Hartinger, H. Blank, F. Bleimund, R. Schneider, D. Gerthsen, S. Bräse, M. Crone, M. Türk, and D. Marko, "Platinum nanoparticles and their cellular uptake and DNA platination at non-cytotoxic concentrations," *Archives of toxicology*, vol. 85, no. 7, pp. 799–812, 2011.
- [73] H. Blank, R. Schneider, D. Gerthsen, H. Gehrke, K. Jarolim, and D. Marko, "Application of low-energy scanning transmission electron microscopy for the study of Pt-nanoparticle uptake in human colon carcinoma cells," *Nanotoxicology*, vol. 8, no. 4, pp. 433–446, 2014.
- [74] N. K. Weller, "VISUALIZATION OF CONCANAVALIN A-BINDING SITES WITH SCANNING ELECTRON MICROSCOPY," *The Journal of cell biology*, vol. 63, no. 2, pp. 699–707, 1974.
- [75] L. K. Trejdosiewicz, M. A. Smolira, G. M. Hodges, S. L. Goodman, and D. C. Livingston, "Cell surface distribution of fibronectin in cultures of fibroblasts and bladder derived epithelium: SEM-immunogold localization compared to immunoperoxidase and immunofluorescence," *Journal of Microscopy*, vol. 123, no. 2, pp. 227–236, 1981.
- [76] E. de Harven, "A novel approach for scanning electron microscopy of colloidal gold-labeled cell surfaces," *The Journal of cell biology*, vol. 99, no. 1, pp. 53–57, 1984.
- [77] A. K. Gupta and A. S. G. Curtis, "Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 15, no. 4, pp. 493–496, 2004.
- [78] A. L. Koh, C. M. Shachaf, S. Elchuri, G. P. Nolan, and R. Sinclair, "Electron microscopy localization and characterization of functionalized composite organic-inorganic SERS nanoparticles on leukemia cells," *Ultramicroscopy*, vol. 109, no. 1, pp. 111–121, 2008.
- [79] S. Schädler, C. Burkhardt, and A. Kappler, "Evaluation of Electron Microscopic Sample Preparation Methods and Imaging Techniques for Characterization of Cell-Mineral Aggregates," *Geomicrobiology Journal*, vol. 25, no. 5, pp. 228–239, 2008.
- [80] L. Hartsuiker, P. van Es, W. Petersen, T. G. van Leeuwen, L. W. M. M. Terstappen, and C. Otto, "Quantitative detection of gold nanoparticles on individual, unstained cancer cells by scanning electron microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 244, no. 2, pp. 187–193, 2011.

- [81] A. Goldstein, Y. Soroka, M. Frušić-Zlotkin, I. Popov, and R. Kohen, “High resolution SEM imaging of gold nanoparticles in cells and tissues,” *Journal of Microscopy*, vol. 256, no. 3, pp. 237–247, 2014.
- [82] L. W. McDonald and T. L. Hayes, “Correlation of scanning electron microscope and light microscope images of individual cells in human blood and blood clots,” *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 10, no. 2, pp. 186–198, 1969.
- [83] V. N. E. Robinson, “The elimination of charging artefacts in the scanning electron microscope,” *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, vol. 8, no. 8, pp. 638–640, 1975.
- [84] A. M. Donald, “The use of environmental scanning electron microscopy for imaging wet and insulating materials,” *Nature materials*, vol. 2, no. 8, pp. 511–516, 2003.
- [85] N. de Jonge, D. B. Peckys, G. J. Kremers, and D. W. Piston, “Electron microscopy of whole cells in liquid with nanometer resolution,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 7, pp. 2159–2164, 2009.
- [86] J. E. McGregor and A. M. Donald, “The application of ESEM to biological samples,” *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 241, p. 012021, 2010.
- [87] Y. Shen, M. R. Ahmad, M. Nakajima, S. Kojima, M. Homma, and T. Fukuda, “Evaluation of the single yeast cell’s adhesion to ITO substrates with various surface energies via ESEM nanorobotic manipulation system,” *IEEE transactions on nanobioscience*, vol. 10, no. 4, pp. 217–224, 2011.
- [88] D. B. Peckys and N. de Jonge, “Gold nanoparticle uptake in whole cells in liquid examined by environmental scanning electron microscopy,” *Microscopy and Microanalysis*, vol. 20, no. 1, pp. 189–197, 2014.
- [89] J. Seiter, E. Müller, H. Blank, H. Gehrke, D. Marko, and D. Gerthsen, “Backscattered electron SEM imaging of cells and determination of the information depth,” *Journal of Microscopy*, vol. 254, no. 2, pp. 75–83, 2014.
- [90] J. Pelka, H. Gehrke, M. Esselen, M. Türk, M. Crone, S. Bräse, T. Muller, H. Blank, W. Send, V. Zibat, P. Brenner, R. Schneider, D. Gerthsen, and D. Marko, “Cellular uptake of platinum nanoparticles in human colon carcinoma cells and their impact on cellular redox systems and DNA integrity,” *Chemical research in toxicology*, vol. 22, no. 4, pp. 649–659, 2009.
- [91] C. Greulich, J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Epple, and M. Köller, “Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells,” *Acta biomaterialia*, vol. 7, no. 1, pp. 347–354, 2011.
- [92] E. Guehrs, M. Schneider, C. M. Günther, P. Hessian, K. Heitz, D. Wittke, A. López-Serrano Oliver, N. Jakubowski, J. Plendl, S. Eisebitt, and A. Haase, “Quantification of silver nanoparticle uptake and distribution within individual human macrophages by FIB/SEM slice and view,” *Journal of nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, p. 21, 2017.
- [93] J. A. W. Heymann, D. Shi, S. Kim, D. Bliss, J. L. S. Milne, and S. Subramaniam, “3D imaging of mammalian cells with ion-abrasion scanning electron microscopy,” *Journal of structural biology*, vol. 166, no. 1, pp. 1–7, 2009.
- [94] L. Reimer and C. Tollkamp, “Measuring the backscattering coefficient and secondary electron yield inside a scanning electron microscope,” *Scanning*, vol. 3, no. 1, pp. 35–39, 1980.

- [95] H. Niedrig, "Electron backscattering from thin films," *Journal of Applied Physics*, vol. 53, no. 4, pp. R15–R49, 1982.
- [96] L. Reimer, *Scanning electron microscopy: Physics of image formation and microanalysis*, vol. 45 of *Springer series in optical sciences*. Berlin: Springer, 3rd ed., 2011.
- [97] J. Cazaux, "Electron back-scattering coefficient below 5 keV: Analytical expressions and surface-barrier effects," *Journal of Applied Physics*, vol. 112, no. 8, p. 084905, 2012.
- [98] J. Cazaux, N. Kuwano, and K. Sato, "Backscattered electron imaging at low emerging angles: a physical approach to contrast in LVSEM," *Ultramicroscopy*, vol. 135, pp. 43–49, 2013.
- [99] V. Morandi, P. G. Merli, and M. Ferroni, "Dopant regions imaging in scanning electron microscopy," *Journal of Applied Physics*, vol. 99, no. 4, p. 043512, 2006.
- [100] E. Sánchez, M. Torres Deluigi, and G. Castellano, "Mean atomic number quantitative assessment in backscattered electron imaging," *Microscopy and Microanalysis*, vol. 18, no. 6, pp. 1355–1361, 2012.
- [101] E. Müller and D. Gerthsen, "Composition quantification of electron-transparent samples by backscattered electron imaging in scanning electron microscopy," *Ultramicroscopy*, vol. 173, pp. 71–75, 2017.
- [102] B. Alberts and L. Nover, *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Weinheim: Wiley-VCH, 4. ed., 2012.
- [103] H. Plattner and J. Hentschel, *Zellbiologie*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 4. ed., 2011.
- [104] "[https://de.wikipedia.org/wiki/Zelle_\(Biologie\)#/media/File:Biological_cell.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Zelle_(Biologie)#/media/File:Biological_cell.svg) (heruntergeladen am 16.10.2017)."
- [105] D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, and W. P. Parks, "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 51, no. 5, pp. 1417–1423, 1973.
- [106] R. H. Davis and A. Acrivos, "Sedimentation of Noncolloidal Particles at Low Reynolds Numbers," *Annual Review of Fluid Mechanics*, vol. 17, no. 1, pp. 91–118, 1985.
- [107] A. Einstein, "On the motion of small particles suspended in liquids at rest required by the molecular-kinetic theory of heat," *Annalen der Physik*, vol. 17, pp. 549–560, 1905.
- [108] P. J. Goodhew, *Electron Microscopy and Analysis, Third Edition*. Hoboken: Taylor and Francis, 3rd ed., 2014.
- [109] D. B. Williams and C. B. Carter, *Transmission electron microscopy: A textbook for materials science*. New York and London: Springer, 2nd ed., 2009.
- [110] E. Rutherford, "LXXIX. The scattering of α and β particles by matter and the structure of the atom," *Philosophical Magazine Series 6*, vol. 21, no. 125, pp. 669–688, 1911.
- [111] G. Wentzel, "Zwei Bemerkungen über die Zerstreung korpuskularer Strahlen als Beugungserscheinung," *Zeitschrift für Physik*, vol. 40, no. 8, pp. 590–593, 1926.
- [112] N. F. Mott, "The Scattering of Fast Electrons by Atomic Nuclei," *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 124, no. 794, pp. 425–442, 1929.

- [113] Z. Czyżewski, D. O. MacCallum, A. Romig, and D. C. Joy, “Calculations of Mott scattering cross section,” *Journal of Applied Physics*, vol. 68, no. 7, p. 3066, 1990.
- [114] H. Bethe, “Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie,” *Annalen der Physik*, vol. 397, no. 3, pp. 325–400, 1930.
- [115] H. A. Bethe and J. Ashkin, “Passage of radiation through matter,” in *Experimental Nuclear Physics* (E. Segrè, ed.), p. 166, New York: Wiley, 1953.
- [116] D. C. Joy and S. Luo, “An empirical stopping power relationship for low-energy electrons,” *Scanning*, vol. 11, no. 4, pp. 176–180, 1989.
- [117] F. A. Lukiyanov, E. I. Rau, and R. A. Sennov, “Depth range of primary electrons, electron beam broadening, and spatial resolution in electron-beam studies,” *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, vol. 73, no. 4, pp. 441–449, 2009.
- [118] W. Williamson, A. J. Antolak, and R. J. Meredith, “An energy-dependent electron backscattering coefficient,” *Journal of Applied Physics*, vol. 61, no. 9, pp. 4612–4618, 1987.
- [119] P. F. Schmidt, *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*, vol. 444 of *Kontakt & Studium*. Renningen-Malmsheim: Expert Verlag, 1994.
- [120] F. Arnal, P. Verdier, and P. D. Vincensini, “Coefficient de retrodiffusion dans de cas d’électrons monocinetiques arrivant sur la cible sous une incidence oblique,” *Comptes rendus de l’Académie des Sciences*, no. 268, pp. 1526–1529, 1969.
- [121] A. Rose, “Television Pickup Tubes and the Problem of Vision,” vol. 1 of *Advances in Electronics and Electron Physics*, pp. 131–166, Elsevier, 1948.
- [122] L. A. Giannuzzi and F. A. Stevie, *Introduction to Focused Ion Beams: Instrumentation, Theory, Techniques and Practice*. SpringerLink: Springer e-Books, Boston, MA: Springer Science+Business Media, Inc, 2005.
- [123] R. M. Langford and C. Clinton, “In situ lift-out using a FIB-SEM system,” *Micron*, vol. 35, no. 7, pp. 607–611, 2004.
- [124] W. S. Rasband, “ImageJ,” 1997-2016.
- [125] M. Simon, E. M. Wülfers, A. Tavernier, S. Fritsch-Decker, Müller, E., J. Seiter, C. Weiss, O. Dössel, D. Gerthsen, and G. Seemann, “Cross-correlation based detection of nanoparticles in SEM images from sedimentation cell experiments,” *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 59, no. s1, pp. s510–513, 2014.
- [126] N. W. M. Ritchie, “A new Monte Carlo application for complex sample geometries,” *Surface and Interface Analysis*, vol. 37, no. 11, pp. 1006–1011, 2005.
- [127] R. K. Iler, *The chemistry of silica: Solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry*. New York, N.Y. [u.a.]: Wiley, ca. 2004.
- [128] K. F. J. Heinrich, *Electron beam x-ray microanalysis*. New York: Van Nostrand Reinhold Co, 1981.
- [129] B. J. Berne and R. Pecora, *Dynamic light scattering: With applications to chemistry, biology and physics*. Mineola, N.Y.: Dover Publications, 2000.
- [130] M. Al-Rawi, *Untersuchung der biologischen Aktivität von Metalloxid-Partikeln in Säugerzellen mittels Hochdurchsatzmethoden*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2013.

- [131] G. U. Nienhaus, P. Maffre, and K. Nienhaus, "Studying the protein corona on nanoparticles by FCS," *Methods in enzymology*, vol. 519, pp. 115–137, 2013.
- [132] G. L. Thompson, V. V. Reukov, M. P. Nikiforov, S. Jesse, S. V. Kalinin, and A. A. Vertegel, "Electromechanical and elastic probing of bacteria in a cell culture medium," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 24, p. 245705, 2012.
- [133] G. W. Doorley and C. K. Payne, "Cellular binding of nanoparticles in the presence of serum proteins," *Chemical communications*, vol. 47, no. 1, pp. 466–468, 2011.
- [134] C. C. Fleischer and C. K. Payne, "Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes," *Accounts of chemical research*, vol. 47, no. 8, pp. 2651–2659, 2014.
- [135] A. Lesniak, A. Salvati, M. J. Santos-Martinez, M. W. Radomski, K. A. Dawson, and C. Aberg, "Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, no. 4, pp. 1438–1444, 2013.
- [136] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, and S. Seal, "Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential," *Biomaterials*, vol. 28, no. 31, pp. 4600–4607, 2007.
- [137] V. Forest and J. Pourchez, "Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona," *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, vol. 70, no. Pt 1, pp. 889–896, 2017.
- [138] E. C. Cho, J. Xie, P. A. Wurm, and Y. Xia, "Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant," *Nano letters*, vol. 9, no. 3, pp. 1080–1084, 2009.
- [139] J. Wang, J. D. Byrne, M. E. Napier, and J. M. DeSimone, "More effective nanomedicines through particle design," *Small*, vol. 7, no. 14, pp. 1919–1931, 2011.
- [140] A. Albanese, C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, and W. C. W. Chan, "Secreted biomolecules alter the biological identity and cellular interactions of nanoparticles," *ACS nano*, vol. 8, no. 6, pp. 5515–5526, 2014.
- [141] M. Wiemann, U. G. Sauer, A. Vennemann, S. Bäcker, J.-G. Keller, L. Ma-Hock, W. Wohlleben, and R. Landsiedel, "In Vitro and In Vivo Short-Term Pulmonary Toxicity of Differently Sized Colloidal Amorphous SiO₂," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 3, 2018.
- [142] Y. Zhu, W. Li, Q. Li, Y. Li, Y. Li, X. Zhang, and Q. Huang, "Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles," *Carbon*, vol. 47, no. 5, pp. 1351–1358, 2009.
- [143] D. Guarnieri, A. Guaccio, S. Fusco, and P. A. Netti, "Effect of serum proteins on polystyrene nanoparticle uptake and intracellular trafficking in endothelial cells," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 13, no. 9, pp. 4295–4309, 2011.
- [144] D. Cantu-Crouch, W. E. Howe, and M. D. McCartney, "Comparison of SEM processing methods for cultured human lens epithelial cells grown on flat and microcarrier bead substrates," *Microscopy research and technique*, vol. 30, no. 5, pp. 419–426, 1995.
- [145] M. Dass, *Elektronenmikroskopische Studien über polymere Nanopartikel und ihr Potential für biomedizinische Anwendungen*. Dissertation, Universität Ulm, Ulm, 2010.

-
- [146] V. N. E. Robinson, "Discriminating between Atomic Number and Topographic Contrast Using a Wide-Angle Backscattered Electron Detector in Scanning Electron Microscopy," *Journal of Electron Microscopy*, vol. 38, no. 5, pp. 389–393, 1989.
- [147] D. C. Joy, "Contrast in high-resolution scanning electron microscope images," *Journal of Microscopy*, vol. 161, no. 2, pp. 343–355, 1991.
- [148] R. Shimizu and D. Ze-Jun, "Monte Carlo modelling of electron-solid interactions," *Reports on Progress in Physics*, vol. 55, no. 4, pp. 487–531, 1992.

Publikationsliste

Artikel in Fachzeitschriften

- Thomas Kowoll, Erich Müller, Susanne Fritsch-Decker, Simon Hettler, Heike Störmer, Carsten Weiss and Dagmar Gerthsen. „Contrast of Backscattered Electron SEM Images of Nanoparticles on Substrates with Complex Structure“, *Scanning*, vol. 2017, Article ID 4907457, 12 pages, 2017. doi:10.1155/2017/4907457

Konferenzbeiträge

- Thomas Kowoll, Erich Müller and Dagmar Gerthsen. „Backscattered-electron SEM contrast of SiO₂ nanoparticles“ (Poster), European Microscopy Congress, August 2016
- Thomas Kowoll, Susanne Fritsch-Decker, Erich Müller, Carsten Weiss and Dagmar Gerthsen. „Quantification of SiO₂ nanoparticle sedimentation on A549 cells“ (Vortrag), European Microscopy Congress, August 2016
- Thomas Kowoll, Erich Müller and Dagmar Gerthsen. „Backscattered-electron SEM contrast of SiO₂ nanoparticles“ (Poster), Microscopy Conference, Göttingen, September 2015

Anhang

A.1 Zellkultivierung

A.1.1 Langzeitkultivierung und Auftauen von Zellen

A549-Zellen werden langfristig bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu werden sie in DMEM, ergänzt mit 10 % Dimethylsulfoxid, in ein Kryogefäß ($3\text{--}5 \times 10^6$ pro mL) überführt und in einen mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer des Typs *Cryo 1°C Freezing Container* (Relags GmbH, Tuntenhausen) gegeben. In diesem werden die Zellen mit einer Abkühlrate von $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und so eingefroren. Anschließend wird das Kryogefäß mit den Zellen in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt und dort gelagert.

Der Auftauprozess wird zügig bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Der aufgetauten Zellsuspension wird 1 mL mit einer Pasteurpipette entnommen und tropfenweise in 10 mL auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühltes Zellkulturmedium gegeben. Um das Dimethylsulfoxid zu entfernen, wird die verdünnte Suspension bei 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur in einer Minifuge ($r = 15\text{ cm}$) pelletiert. Die pelletierten Zellen werden in 10 mL auf Raumtemperatur erwärmtes Kulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm^2 übertragen, welche wiederum bereits 10 mL vorgewärmtes (37 °) Medium enthält. Die Zellen werden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO_2 kultiviert. Alle zwei Tage muss das Zellkulturmedium gewechselt werden. Nach Erreichen einer Dichte von 80–90 % werden die Zellen wie nachfolgend beschrieben passagiert. Nach zwei Wochen Kultivierung sind die Zellen bereit in Versuchen verwendet zu werden.

A.1.2 Passagieren von Zelllinien und Bestimmung der Zellzahl

Erreichen Zelllinien eine Konfluenz von 80–90 %, werden sie passagiert, das heißt die adhärennten Zellen werden gelöst und auf neue Kulturgefäße verteilt. Hierzu wird zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen werden mit 5 mL warmen $\text{PBS}^{-/-}$ gewaschen. Um ein Ablösen der Zellen hervorzurufen, werden sie mit 2 mL warmen Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Trypsin ist ein Verdauungsenzym, welches Zell–Zell- und Zell–Matrix-Verbindungen spaltet. EDTA bildet mit gewissen Ionen, die die Wirkung von Trypsin unterbinden können, wie Kalzium und Magnesium, Chelatkomplexe. Durch Hinzugabe von 8 mL Zellkulturmedium wird die Trypsin-Aktivität gestoppt. Die restlichen adhärennten Zellen werden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Glaspipette vereinzelt und die erhaltene Zellsuspension wird in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt.

Zum weiteren Kultivieren werden 2×10^5 Zellen in eine neue Kulturflasche (Wachstumsfläche 75 cm^2) mit 20 mL frischem Zellkulturmedium überführt. Für Sedimentationsexperimente werden die Zellen wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben ausgesät. Die benötigten Zellzahlen werden wie folgt bestimmt.

Zunächst wird eine 1 : 1000 Verdünnung der Zellsuspension mit CASY®ton (isotone Salzlösung)

erstellt, welche mit einem vollautomatischen Durchflusszytometer (*CASY®1 Cell Counter Model TT*) mittels Stromausschlussverfahren analysiert wird. Die Zellen werden hierzu mit einer hochpräzisen Kapillare einzeln eingesaugt und gezählt. Durch Anlegen einer Spannung wird dabei zwischen lebenden Zellen und toten Zellen unterschieden, denn vitale Zellen haben eine unbeschädigte Membran und sind daher elektrisch nichtleitend, während tote Zellen mit beschädigter Zellmembran aufgrund der Leitfähigkeit des Cytoplasmas Strom leiten.

A.2 Fixierlösungen zum Einbetten von Zellen in EPON

A.2.1 Zusammensetzung Erstfixierung

Ansatz für 50 mL Erstfixierung:

- 25 mL 0,2 M Pipes
- 2,5 mL 25 % Glutaraldehyd
- 5 mL 20 % Paraformaldehyd
- 5 mL 1 % NaN_3
- 12,5 mL H_2O

A.2.2 Zusammensetzung Zweitfixierung

Ansatz für 16 mL Zweitfixierung:

- 8 mL 0,2 M Pipes
- 2 mL 4 % OsO_4
- 4 mL 3,2 % $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
- 2 mL H_2O

A.3 Zusammenfassung der beim DG-Modell verwendeten Parameter

Tabelle A.3.1. Eingabeparameter für DG-Modell

	Parameter	Wert	Einheit
solvent properties	solvent dynamic viscosity	0,00074	Pa s
	density of solvent	1,0	g/cm ³
	temperature of solvent	37,0	°C
particle properties	density of raw material	2,0	g/cm ³
	diameters (dH) of particle / agglomerate species	122 / 198 / 501	nm
	fraction of agglomerate species	1,0	
	agglomerate effective density	2,0	g/cm ³
experimental parameters	height of suspension column	3,118137	mm
	initial total concentration of material	variabel	µg/mL
	total time of simulation $N \times g$ (for centrifugation)	1,0 / 4,0 1	h
model parameters	height of subcompartment (simulation element)	0,005	mm
	time interval for simulation	0,5	s
output data parameters	output data/graph report time interval	1	min
	output compartment height	0,01	mm
	plot / do not plot bottom output only	1 0	
advanced model parameters	sed. coeff. concentration dependence	0,0	
	diff. coeff. concentration dependence	0,0	
	initial dissolution fraction	0,0	
	method for modeling dynamic dissolution	1	
	type of dissolution rate	0	
	rate of dissolution	0,048	
	times for dissolution fraction data	[0.0, 12.0]	h
	dissolution fractions corresponding to specified times	[0.0, 0.163 – 0.163]	h
stickiness	0 / 1		
adsorption dissociation constant	1.0E – 09		

A.4 DLS Partikel-Größenverteilungen

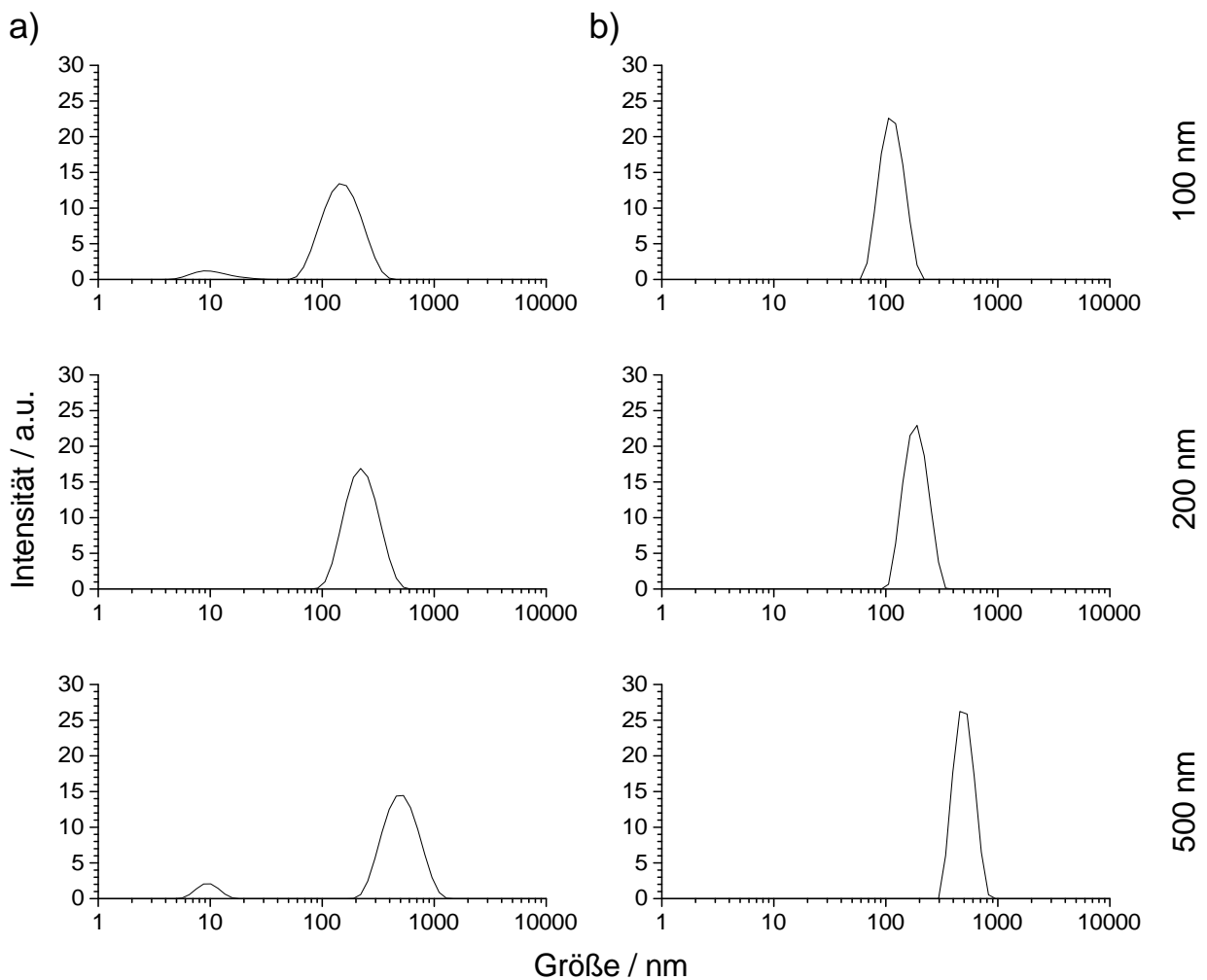


Abbildung A.4.1. Repräsentative intensitäts-basierte DLS-Größenverteilungen von 100, 200 und 500 nm Partikeln gemessen in CCM (a) und H_2O (b). Messungen wurden 0 h nach Präparation der Suspensionen bei Raumtemperatur durchgeführt. Der kleine Peak bei ca. 10 nm rührt vom FBS im CCM her.

A.5 Ergebnisse weiterer Sedimentationsversuche

A.5.1 Interzelluläre und zelluläre Flächendichten nach vierstündiger Exposition

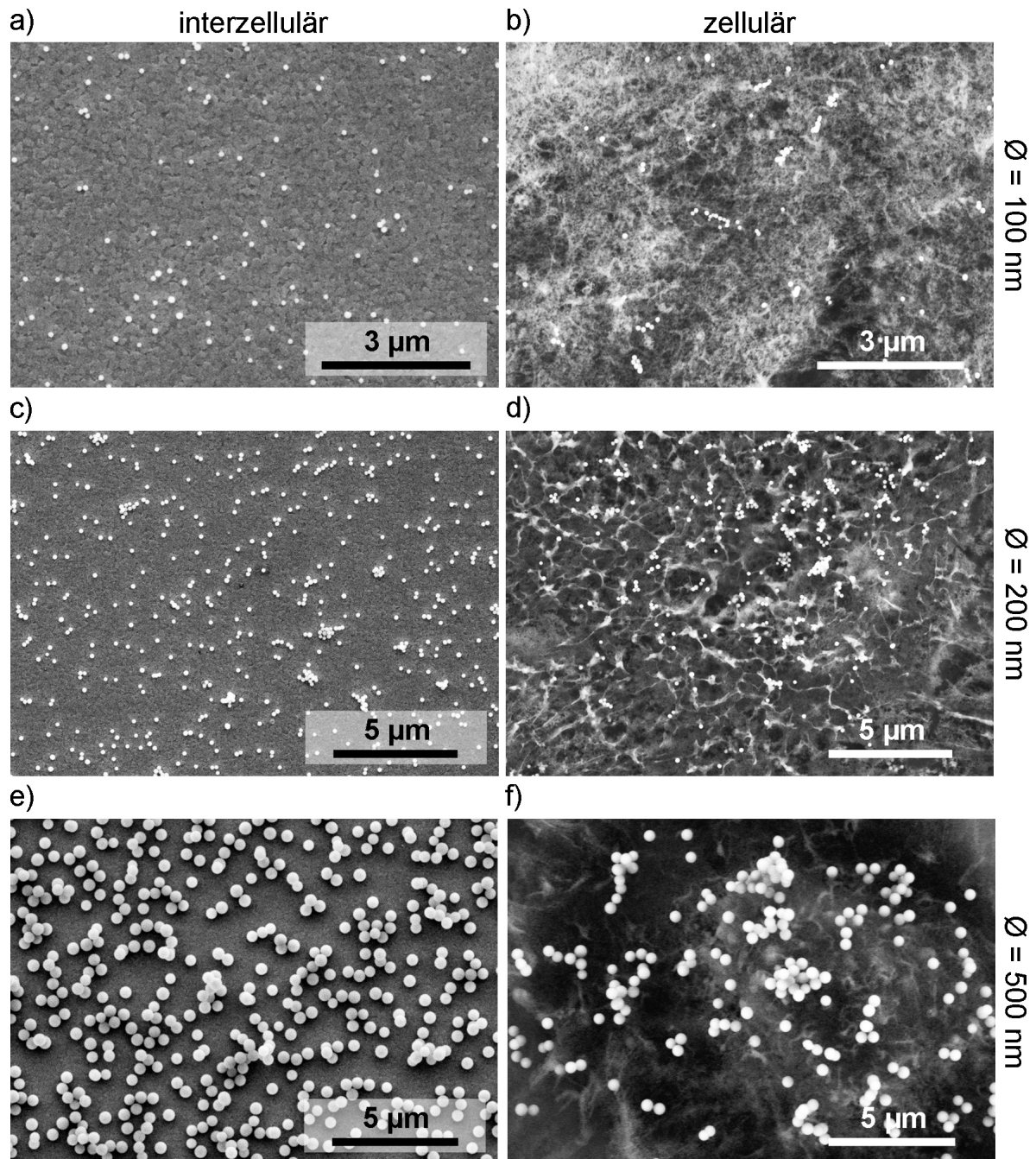


Abbildung A.5.1. Repräsentative REM-Aufnahmen von interzellulär (a,c,e) und zellulär (b,d,f) gemessenen Flächendichten nach vierstündiger Exposition von (a,b) 100 nm NP mit einer Eingabekonzentration von $50 \mu\text{g}/\text{mL}$, (c,d) 200 nm SMP mit einer Eingabekonzentration von $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ und (e,f) 500 nm SMP mit einer Eingabekonzentration von $109 \mu\text{g}/\text{mL}$. (a,c,d) SE-REM-Bilder, aufgenommen mit 5 keV PE-Energie, (b,d,f) BSE-REM-Bilder aufgenommen mit 5 keV PE-Energie und 1,9 kV (d) bzw. 4 kV (e,f) Bremsspannung. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

A.5.2 Zellfreie Experimente

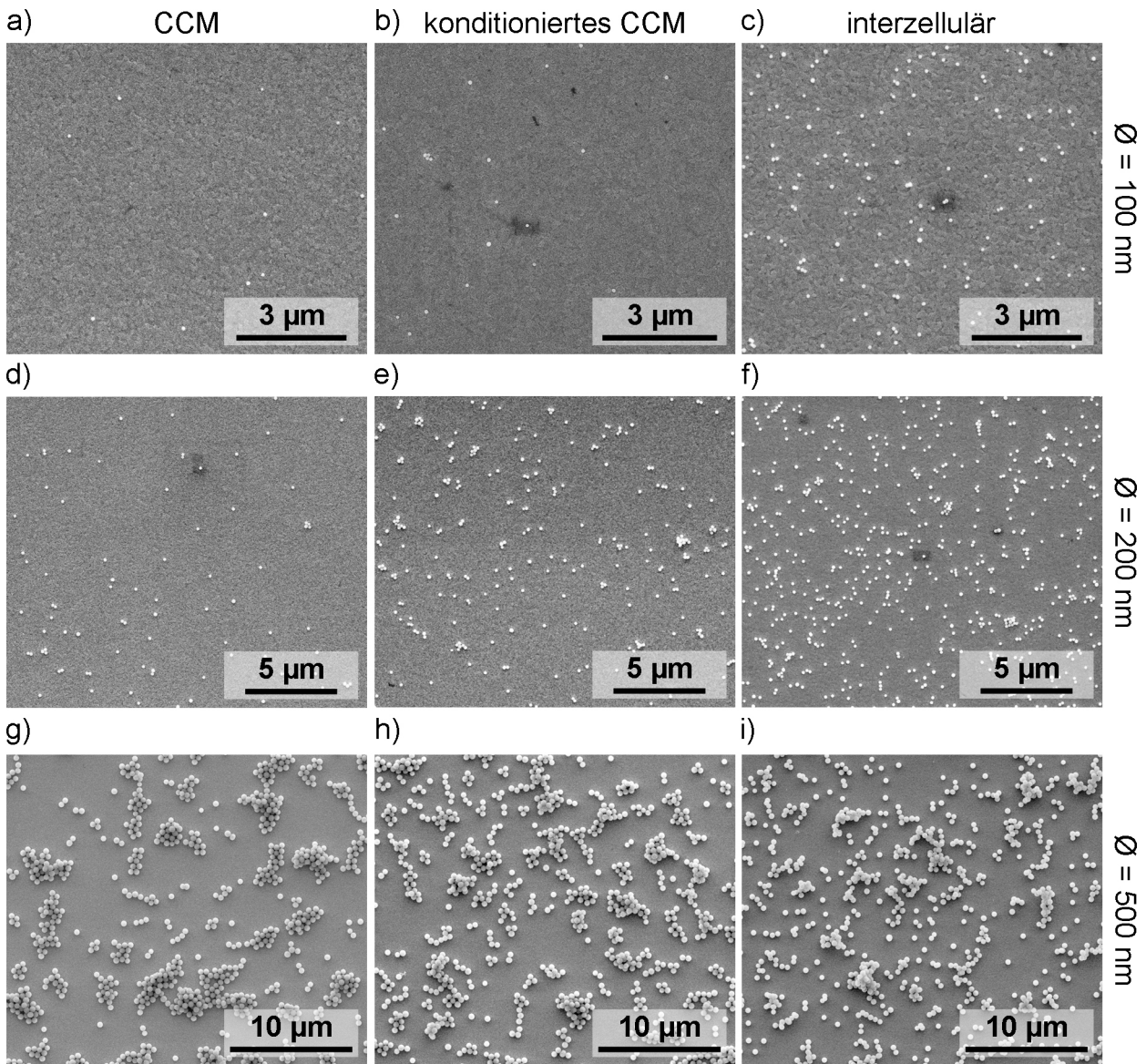


Abbildung A.5.2. Repräsentative SE-REM-Aufnahmen von 100 nm SiO_2 -NP (a-c), 200 nm SiO_2 -SMP (d-f) und 500 nm SiO_2 -SMP (g-i) auf Substraten unterschiedlicher Vorbeschichtung nach 4 h Exposition. (a,d,g) Zellfreies Substrat, im Vorfeld der Sedimentation mit gewöhnlichem CCM vorbeschichtet. (b,e,h) Zellfreies Substrat, vorbeschichtet mit konditioniertem CCM. (c,f,i) Interzelluläre Fläche eines regulären in-vitro-Experimentes mit Zellen. Eingangskonzentrationen betragen bei zellfreien Versuchen mit 100 nm NP $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ (a,b), mit 200 nm SMP $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ (d,e) und mit 500 nm SMP $109 \mu\text{g}/\text{mL}$ (g,h). In allen anderen Fällen mit Zellen (c,f,i) betrug die Eingangskonzentration $50 \mu\text{g}/\text{mL}$.

A.5.3 Ergänzende Focused-Ion-Beam-Untersuchungen

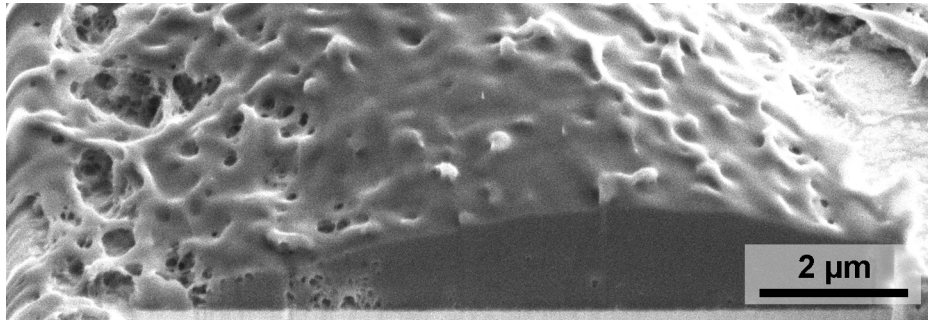
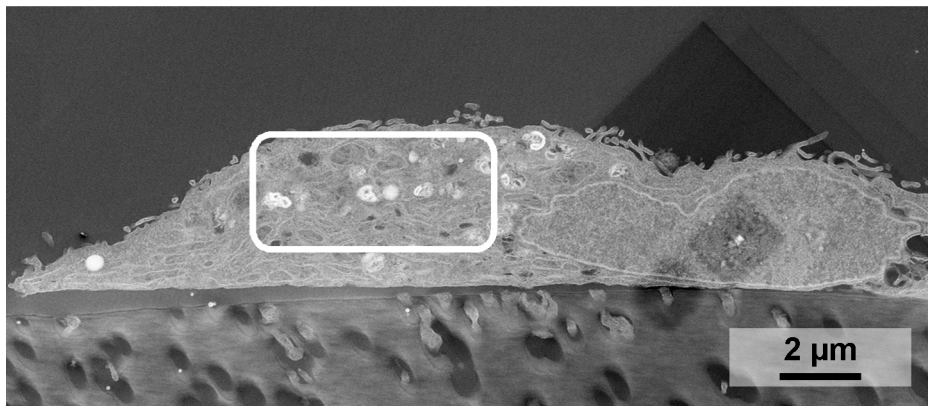


Abbildung A.5.3. SE-REM-Aufnahme des einer dichten A549-Zelle von einer Kontrollprobe, d.h. einer Probe, die keinen Silika-Partikeln ausgesetzt war, mit glatter Oberfläche. Am unteren Rand ist das ITO-Substrat anhand des helleren Kontrastes erkennbar.

A.5.4 Ergänzende STEM Aufnahmen von Dünnschnitten

a)



b)

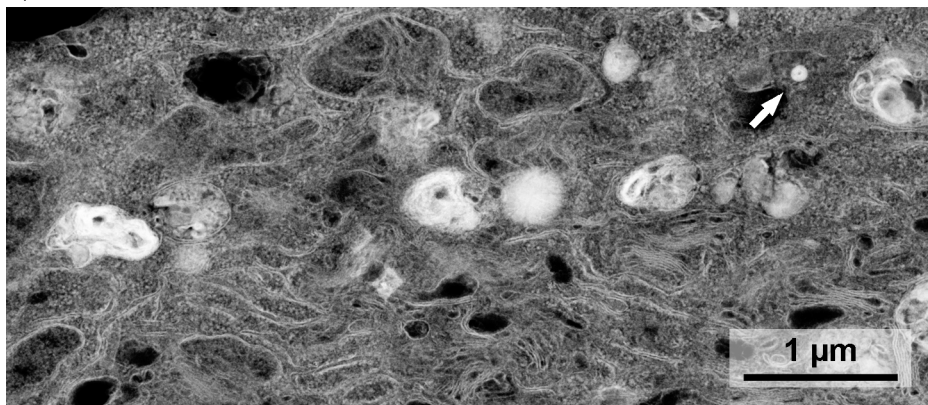


Abbildung A.5.4. (a) 30 keV HAADF-STEM-Aufnahme eines Dünnschnittes einer A549-Zelle mit lediglich einem inkorporierten 100 nm SiO₂-Nanopartikel. (b) Vergrößerungen des weiß umrandeten Ausschnitts in (a). Weißer Pfeil markiert die Positionen des Partikels innerhalb einer Zelle.

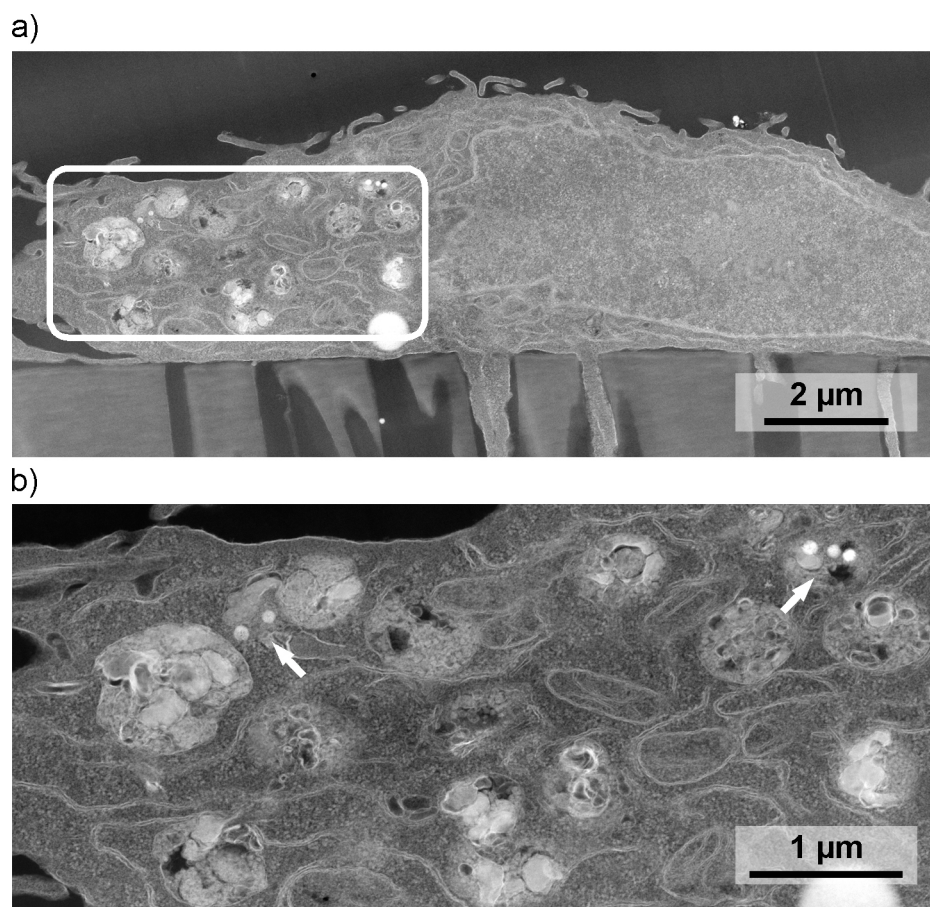


Abbildung A.5.5. (a) 30 keV HAADF-STEM-Aufnahme eines Dünnschnittes einer A549-Zelle mit fünf inkorporierten 100 nm SiO_2 -Nanopartikel. (b) Vergrößerungen des weiß umrandeten Ausschnitts in (a). Weiße Pfeile markieren die Positionen der Partikel innerhalb einer Zelle.

A.6 Ergänzende Simulationen

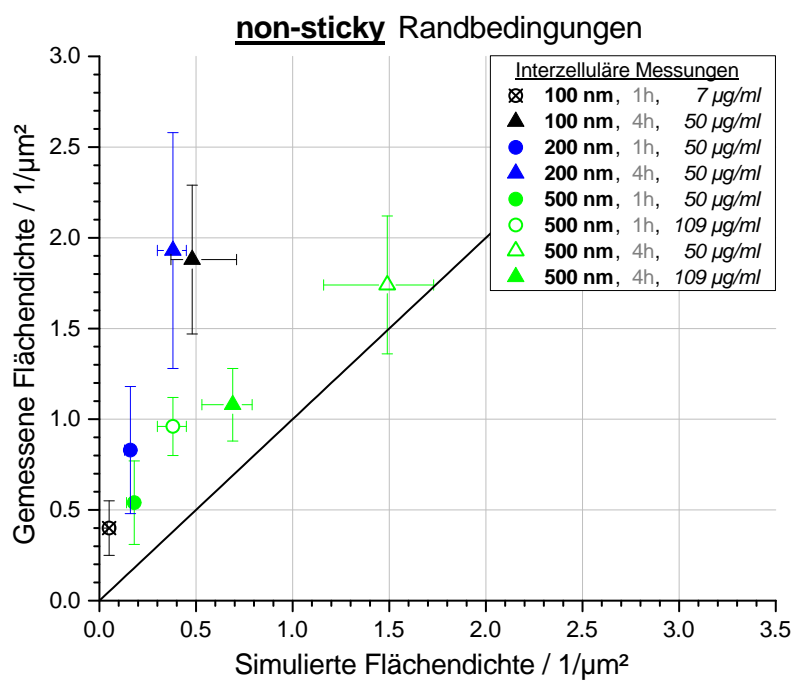


Abbildung A.6.1. Vergleich von interzellulär gemessenen Flächendichten mit unter non-sticky Randbedingungen simulierten Flächendichten. Gegenstand sind Depositionsexperimente mit 100 nm, 200 nm und 500 nm SiO_2 -Partikel bei verschiedenen Eingabekonzentrationen (s. Legende) und 1 h bzw. 4 h Expositionsdauer. Die diagonale Linie kennzeichnet eine Übereinstimmung gemessener und berechneter Werte.

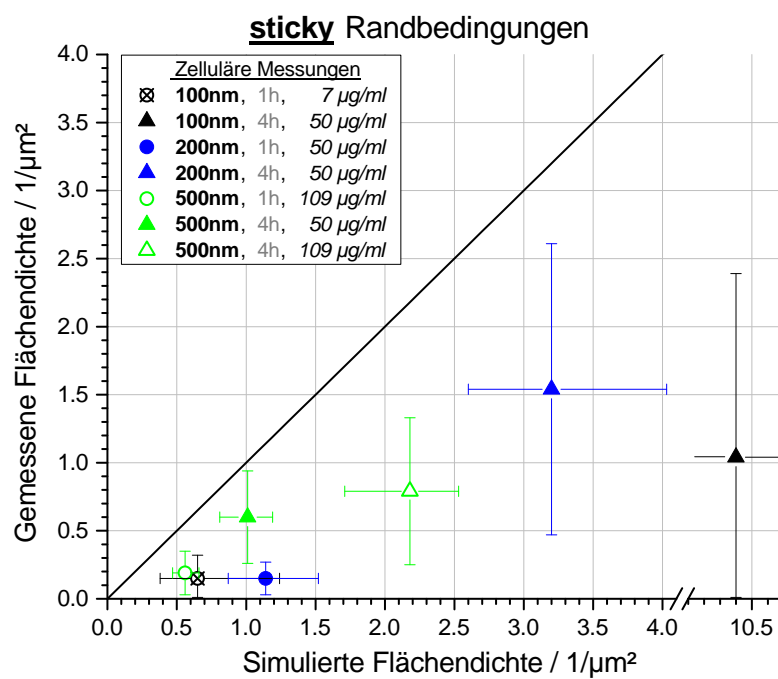


Abbildung A.6.2. Vergleich von zellulär gemessenen Flächendichten mit unter sticky Randbedingungen simulierten Flächendichten. Gegenstand sind Depositionsexperimente mit 100 nm, 200 nm und 500 nm SiO₂-Partikel bei verschiedenen Eingabekonzentrationen (s. Legende) und 1 h bzw. 4 h Expositionsdauer. Man beachte die Unterbrechung der x-Achse zwischen 4,1 und 10¹/µm². Die diagonale Linie kennzeichnet die theoretische Übereinstimmung beider Werte.

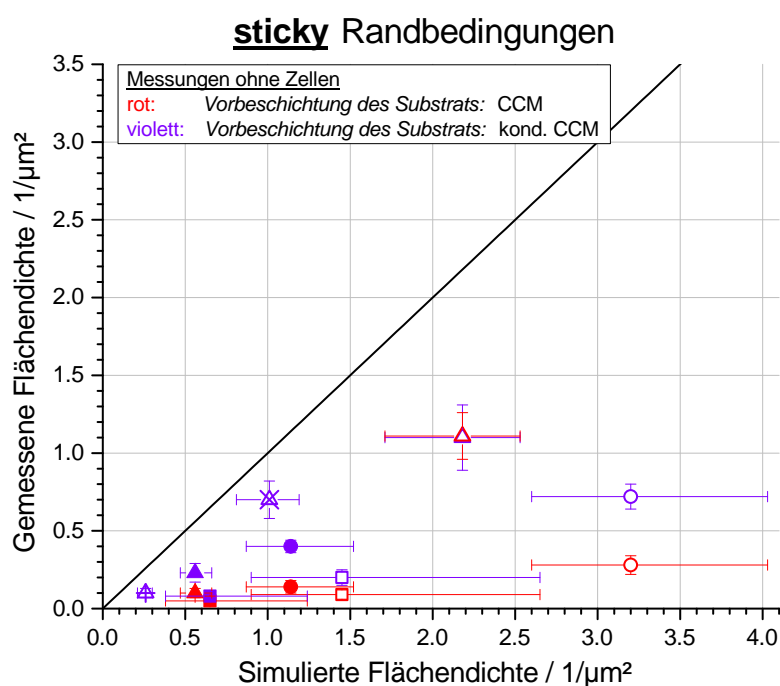


Abbildung A.6.3. Vergleich von bei zellfreien Depositionsexperimenten gemessenen Flächendichten mit unter sticky Randbedingungen simulierten Flächendichten. Gegenstand sind Versuche mit 100 nm (quadratische Symbole), 200 nm (kreisrunde Symbole) und 500 nm (dreieckige Symbole) SiO₂-Partikel bei verschiedenen Eingabekonzentrationen und 1 h (geschlossene Symbole) bzw. 4 h (leere Symbole) Expositionsdauer. Experimente mit CCM-Vorbeschichtung des Substrats sind rot dargestellt, Versuche mit konditioniertem CCM als Vorbeschichtung violett. Die diagonale Linie kennzeichnet eine Übereinstimmung gemessener und berechneter Werte.

A.7 Ergebnisse weiterer Kontrastmessungen

A.7.1 Arbeitsstandabhängigkeit

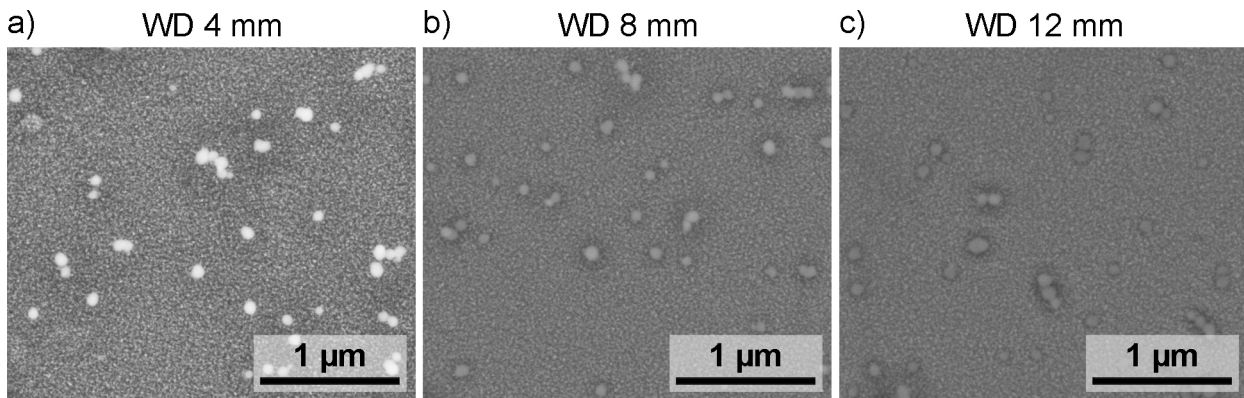


Abbildung A.7.1. 5 keV BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf ITO22 bei unterschiedlichen Arbeitsabständen: (a) 4 mm, (b) 8 mm und (c) 12 mm. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

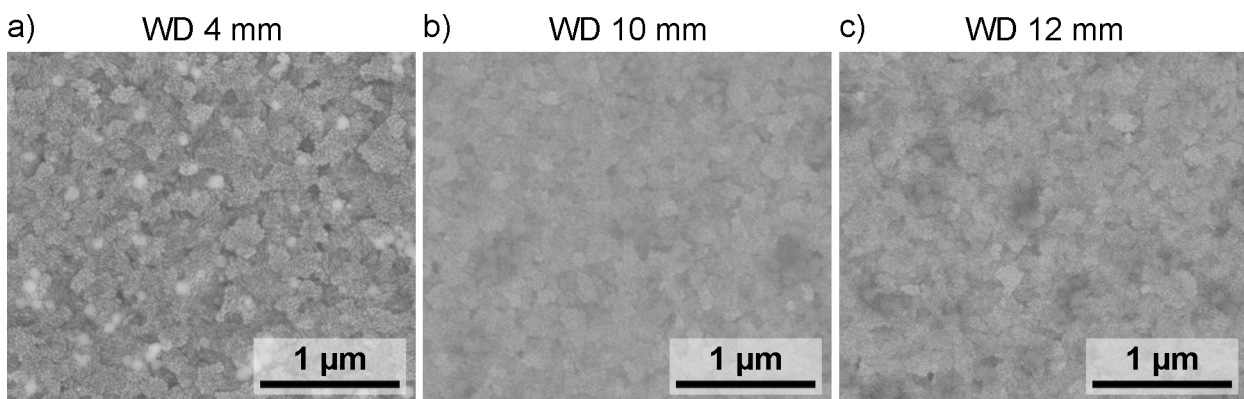


Abbildung A.7.2. 10 keV BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf ITO160 bei unterschiedlichen Arbeitsabständen: (a) 4 mm, (b) 10 mm und (c) 12 mm. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

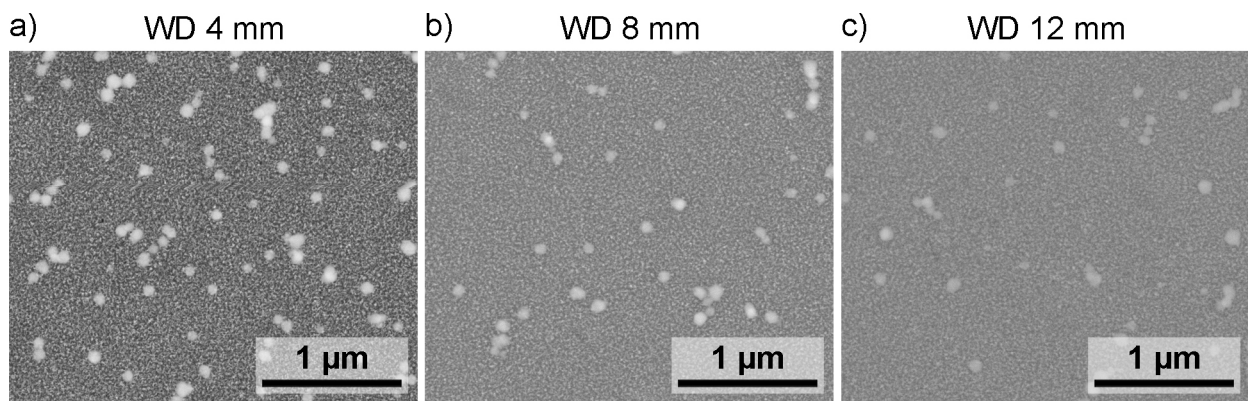


Abbildung A.7.3. 10 keV BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf ITO22 bei unterschiedlichen Arbeitsabständen: (a) 4 mm , (b) 8 mm und (c) 12 mm. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

A.7.2 Energieabhängigkeit

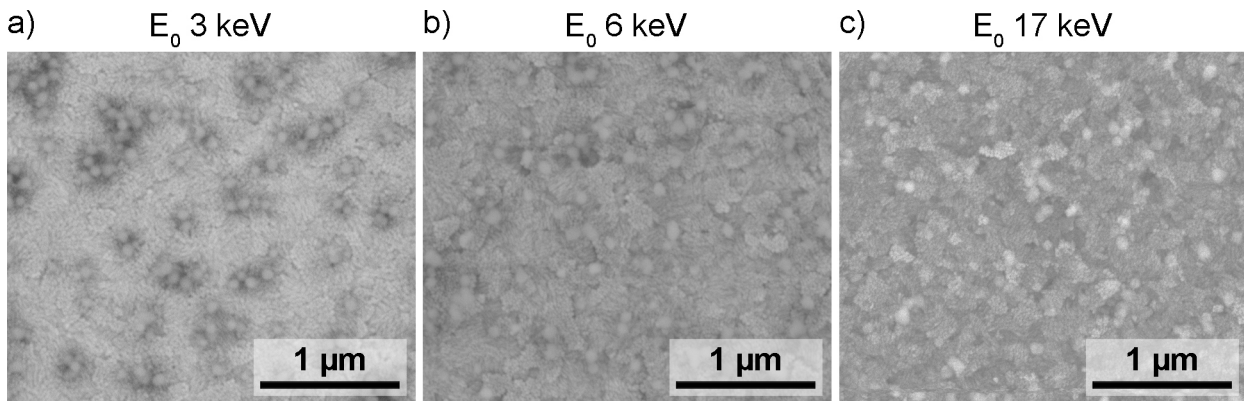


Abbildung A.7.4. BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf ITO160 bei $\text{WD} = 6 \text{ mm}$. Die verwendete PE-Energie beträgt bei (a) 3 keV, (b) 6 keV und (c) 17 keV. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

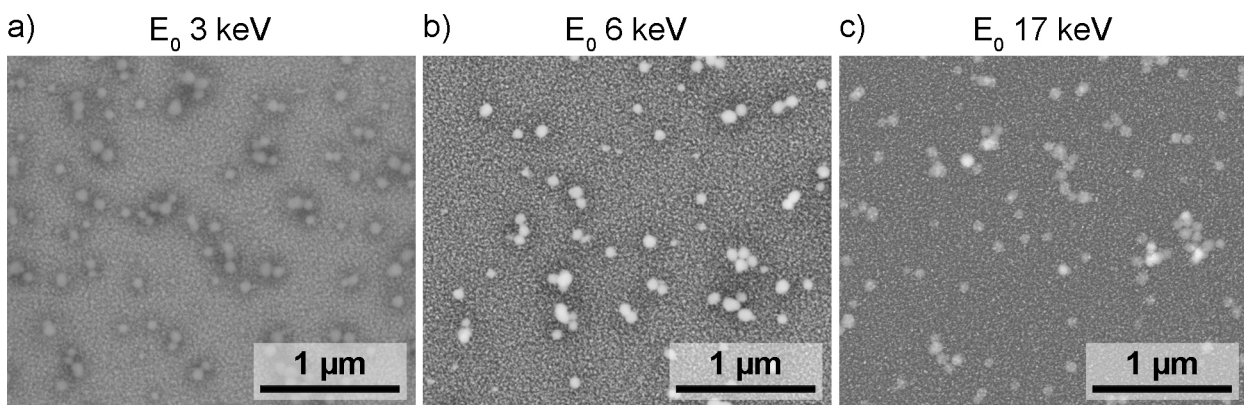


Abbildung A.7.5. BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf ITO22 bei $\text{WD} = 6 \text{ mm}$. Die verwendete PE-Energie beträgt bei (a) 3 keV, (b) 6 keV und (c) 17 keV. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

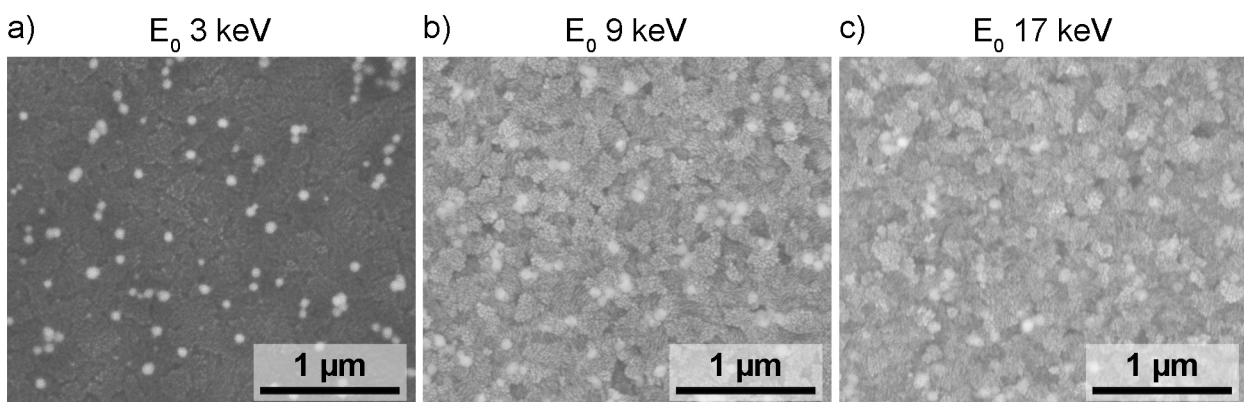


Abbildung A.7.6. BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf ITO160 bei $\text{WD} = 4 \text{ mm}$. Die verwendete PE-Energie beträgt bei (a) 3 keV, (b) 9 keV und (c) 17 keV. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

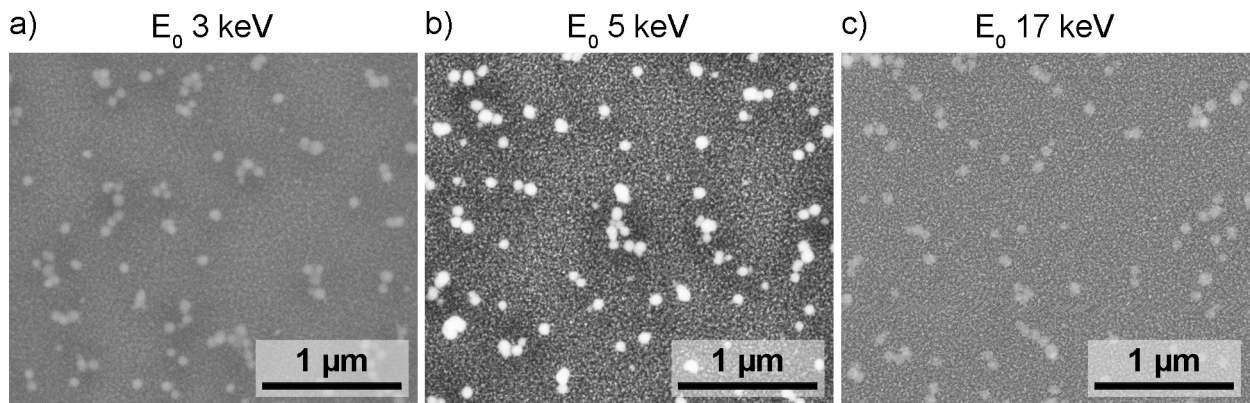


Abbildung A.7.7. BSE-Aufnahmen von SiO_2 -NP auf ITO22 bei $\text{WD} = 4 \text{ mm}$. Die verwendete PE-Energie beträgt bei (a) 3 keV, (b) 5 keV und (c) 17 keV. Bildkontrast und Helligkeit wurden zur Verbesserung der Sichtbarkeit nachträglich angepasst.

Danksagung

Mein tiefster Dank gebührt Frau Gerthsen für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, die Übernahme des Referats und die hervorragende Betreuung während der letzten Jahre. Sie hatten stets ein Auge darauf, dass bei aller Toxikologie die Physik nicht zu kurz kam. Mein Aufrichtiger Dank gilt auch Herrn Nienhaus für die Übernahme des Koreferats und die Teilnahme an den TAC-Meetings, wo Sie mir Zuversicht gegeben haben, dass diese Arbeit gelingen wird.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinem langjährigen Bürokollegen und direkten Betreuer in Sachen REM, Erich, bedanken. Ohne dich hätte meine Zeit am LEM nur halb so viel Freude gemacht. Und auch Volker gilt mein herzlichster Dank, für die Einarbeitung ins ESEM, die viele Hilfe und dein stets offenes Ohr. Vielen Dank an Michael für die geleistete Vorarbeit zum Thema dieser Arbeit. Ein großes Dankeschön an Simon für die Unterstützung bei den Beschichtungen und vor allem deinen unermüdlichen Einsatz für das Institut und ein heiteres Miteinander. Danke auch an Heike für die Untersuchungen am Osiris. Und Patrice möchte ich für die unbürokratische Hilfe bei der Suche nach Nanopartikeln danken.

Mein Dank gilt ferner den Kollegen vom ITG am Campus Nord für die fruchtbare Zusammenarbeit. Ganz besonders dir, liebe Susanne, für die tolle Betreuung von Seiten der Toxikologie, ein herzliches Dankeschön. Besonderen Dank möchte ich auch Silvia D. aussprechen, für die Möglichkeit nach Tallinn zu reisen. Danke an Silvia A. für die STEM Präparation und die Einführung in die Ultramikrotomie. Und vielen Dank an Carsten für deinen wertvollen Input bei unseren zahlreiche Meetings und TACs.

Darüber hinaus möchte ich mich bei jedem einzelnen am LEM bedanken, der mich in den letzten Jahren in irgendeiner Form unterstützt hat. Ein großer Dank gilt dabei Frau Sauter, ohne die der Laden einfach nicht laufen würde.

Danke an die Kaffeerunde, für wahrlich einzigartige Pausen. Danke an CUS für die Unmengen abgerauchter Gehirnzellen. Und danke an die Mensa-Fraktion für die nette Gesellschaft in der Mittagspause.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die stets an mich geglaubt und mich unterstützt hat, allen voran meiner Mutter und meinem Vater. Es lässt sich nicht in Worte fassen, wie glücklich ich bin, euch zu haben. Und zu guter Letzt möchte ich Julia dafür danken, dass sie in mein Leben getreten ist. Kocham cię!

„Everything is going to be fine in the end. If it's not fine, it's not the end.“
(Oscar Wilde, zugeschrieben)

