

3 Material

3.1 Arzneistoffe

3.1.1 Spiramycin

Beim Wirkstoff Spiramycin handelt es sich um ein Makrolid-Antibiotikum mit einem 16-gliedrigen Laktoring und glykosidisch gebundenen Zuckern (Sutter, 1992). Es wird aus *Streptomyces ambofaciens* gewonnen und besteht aus drei Hauptkomponenten: Spiramycin I, II und III.

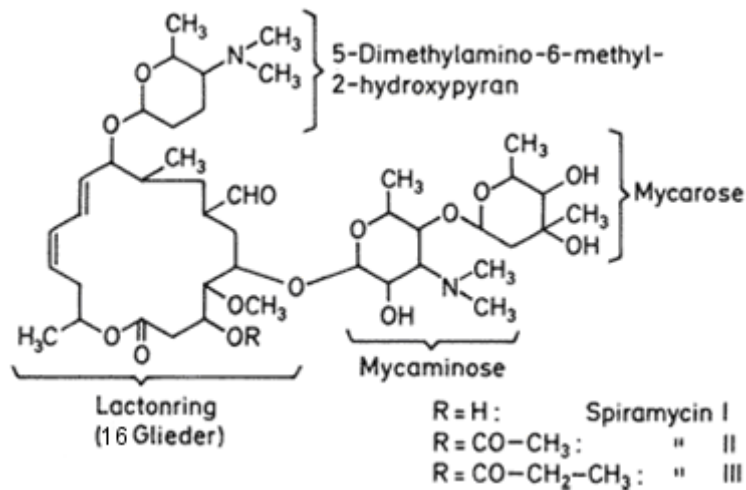


Abb. 3-1 Strukturformel von Spiramycin

Summenformel: C₄₃ H₇₄O₁₄

Molekulargewicht: 843,00

pH-Wert: 8,5 – 10,5

Spiramycin ist ein weißes, kristallines Pulver.

Löslichkeit:

Spiramycin ist leicht löslich in Ethanol, Aceton und anderen, organischen Lösungsmitteln. In Wasser ist es schwerlöslich.

3 Material

Pharmakodynamische Eigenschaften:

Wie auch andere Makrolide wirkt Spiramycin bakteriostatisch gegen grampositive sowie einige gramnegative Keime und auch gegen zellwandlose Bakterien wie Mycoplasmen, Neisseria und Chlamydien. Diese bakteriostatische Wirkung ist jedoch schwächer ausgeprägt als bei den anderen Makroliden, wie z.B. Erythromycin und Roxithromycin. Spiramycin besitzt jedoch als einziges Makrolid-Antibiotikum eine in Studien abgesicherte Wirkung gegenüber Toxoplasmen (Sutter, 1992).

Die antibakterielle Wirkung von Spiramycin beruht auf einer Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese, indem es an die 50S-Untereinheit des Bakterienribosoms bindet und dadurch die Translokation verhindert.

Pharmakokinetische Eigenschaften:

Spiramycin wird nach oraler Gabe nicht vollständig resorbiert. Die absolute Bioverfügbarkeit liegt danach bei 14% - 36%. Dadurch ist bei der oralen Gabe eine viermal höhere Dosis notwendig als bei parenterale Gabe (Kroker, 1999).

Spiramycin zeigt eine gute Gewebegängigkeit. So werden im Muskelgewebe, in der Prostata, in Nieren, Lungen und Leber Wirkstoffspiegel gefunden, die bis über 10fach höher liegen können als die korrespondierenden Serumkonzentrationen (Kroker, 1999).

Es wird durch Hydrolyse einer Mycarose-Seitenkette zu Neospiramycin verstoffwechselt. Die antibiotische Wirkung des Metaboliten entspricht ungefähr 88% derjenigen von Spiramycin (EMEA, 1995). Die Eliminationshalbwertszeit im Serum beträgt ca. 3 – 4 Stunden, während für einige Gewebe und Körperflüssigkeiten in Abhängigkeit von der Dosis längere Eliminationshalbwertszeiten gemessen wurden. So beträgt z.B. die Eliminationshalbwertszeit im Speichel 4 – 8 Stunden. Ausgeschieden wird Spiramycin vor allem über die Galle und nur zu 10% über die Niere.

Spiramycin weist nur geringe Nebenwirkungen auf, die sich aus der Wirkung (bakteriostatisch) ableiten. Durch die Schädigung der Darmflora kann es zu gastrointestinalen Störungen, wie Übelkeit, Diarrhoe und Schmerzen im Oberbauch kommen (Mutschler, 2001).

Bezogen wurde das Spiramycin von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (D-Taufkirchen).

3.1.2. Pentamidin

Pentamidin ist ein Antiprotozoenmittel, das der Gruppe der aromatischen Diamidine angehört (Steuber und Kroker, 1999, Mutschler, 2001). Es besitzt eine Polymethylenedioxy-Brücke und ist in Form des Pentamidinisethionat-Salzes 4,4'-Diamidinophenoxy-pentan-di(beta-hydroxyethansulfat) im Handel.

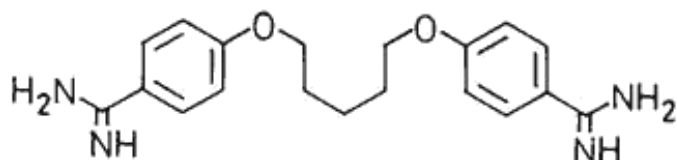


Abb. 3-2 Strukturformel von Pentamidin

Summenformel: $C_{19}H_{24}N_4O_2$

Molekulargewicht : 340,43

pH-Wert einer 5%igen wässrigen Lösung: 4,5-6,5

Der Schmelzpunkt liegt bei ca. 180°C. Pentamidin ist hygroskopisch und die sehr bitteren Kristalle riechen leicht nach Buttersäure (Windholz, 1983).

Löslichkeit:

Pentamidin ist löslich in Wasser, schwer löslich in Ethanol und praktisch unlöslich in Chloroform und Ether.

Als Antiprotozoenmittel findet es als Orphan Drug Anwendung in der Behandlung der *Pneumocystis-carinii*-Pneumonie. Ferner wird es auch angewandt gegen weitere parasitäre Einzeller sowie Trypanosomen- und Leishmanien-Infektionen angewandt. Ihm wird auch eine fungizide Eigenschaft zugeschrieben. Nach neueren Kenntnissen wird *Pneumocystis carinii* zu den Pilzen (*Pneumocystis jirovecii*) gerechnet, wodurch die Wirkung des Pentamidins erklärt werden kann.

Pharmakodynamische Eigenschaften:

Der Wirkmechanismus des Pentamidins ist noch nicht vollständig geklärt (Steuber und Kroker, 1999). Die kationische Struktur des Moleküls ist für diverse Interaktionen mit dem Parasiten und für die Toxizität gegenüber dem Wirt verantwortlich. Es wird vermutet, dass der Wirkmechanismus auf einer reversiblen Inhibierung der S-Adenosyl-L-Methionin-

3 Material

Decarboxylase beruht, wodurch es zu einer reduzierten Polyaminsynthese kommt (Bitonti et al., 1986). Weitere Wirkmechanismen sind jedoch nicht auszuschließen.

Pharmakokinetische Eigenschaften:

Da der Wirkstoff nach oraler Gabe kaum aus dem Gastrointestinaltrakt absorbiert wird, muss er auf anderem Wege verabreicht werden, um eine gute Absorption zu erreichen. So verteilt er sich nach intravenöser Infusion rasch im Gewebe und bei inhalativer Applikation befindet sich der Wirkstoff in hoher Konzentration in der Lunge. Die Rückdiffusion aus dem Gewebe in das Plasma und somit auch die Elimination erfolgt nur sehr langsam. Die Plasmahalbwertszeit von Pentamidin beträgt sechs Stunden. Pentamidin wird nur wenig metabolisiert, sondern hauptsächlich unverändert über die Niere ausgeschieden.

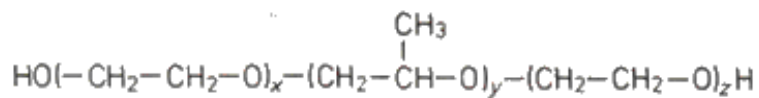
Bei intramuskulärer Verabreichung kommt es häufig zur Bildung von schweren Muskelnekrosen und Abszessen. Auch nach einer intravenösen Injektion treten vermehrt lokale Reizungen und Schmerzen an der Einstichstelle, sowie Thrombophlebitis auf (Steuber und Kroker, 1999). Als Nebenwirkungen können weiterhin, vor allem nach parenteraler Gabe, eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion (bei ca. der Hälfte der Patienten), Funktionsstörungen des Gastrointestinaltraktes, Erbrechen und Tachykardien sowie selten eine Pankreatitis mit Hypoglykämie und späterer Diabetes mellitus auftreten. Bei zu rascher, intravenöser Applikation treten Blutdruckabfall und Atemstörungen auf. Wegen der vielen Nebenwirkungen sollte die Behandlung nur unter klinischer Beobachtung vorgenommen werden (Steuber und Kroker, 1999).

Bezogen wurde das Pentamidin von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (D-Taufkirchen).

3.2. Hilfsstoffe und Fluoreszenzmarker

3.2.1 Poloxamer 188

Poloxamer 188, synonym für Pluronic F68, ist ein nichtionisches Tensid. In dem Molekül sind die beiden Monomerbausteine blockweise verknüpft. Man spricht daher auch von einem Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymer (Bauer, 1999).



$$x, z = 75, y = 30$$

Abb. 3-3 Strukturformal von Poloxamer 188 ((EO)_x- (PO)_y - (EO)_z)

Das mittlere Molekulargewicht des Ethylenoxid-Blocks beträgt 6600 und der des Propylenoxid-Blocks 1740 (Douglas et al., 1984).

Poloxamer 188 ist ein wachsartig-weißer Feststoff und schmilzt bei einer Temperatur von 52-57°C. Er ist sowohl in Wasser, wie auch in Alkohol löslich. Sein HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance)-Wert liegt bei 29. Der hydrophile Anteil beträgt 80% und sein mittleres Molekulargewicht liegt bei etwa 8000. Die Polypropylengruppen machen den hydrophoben, die Polyethylengruppen den hydrophilen Anteil des Tensides aus.

Poloxamer 188 findet eine breite pharmazeutische Anwendung und ist auch für parenterale Zubereitungen geeignet.

Bezogen wurde das Poloxamer 188 von der Firma Fluka (Buchs / Schweiz).

3.2.2 Dextran 70.000

Dextranmoleküle sind Polysaccharide, bei denen die Glukosemonomere zu 90% über α -1,6 Brücken glykosidisch verbunden sind. Einige Glucoseseitenketten sind hauptsächlich über 1,3- aber teilweise auch durch 1,4- und 1,2-Bindungen mit der Hauptkette verknüpft.

Dextran 70.000 wird ebenfalls als Stabilisator bei der Herstellung von PACA-Nanopartikeln verwendet. Es kann allein oder zusammen mit Poloxamer 188 eingesetzt werden. Während des Polymerisationsprozesses wird Dextran in die sich bildende Matrix eingebaut.

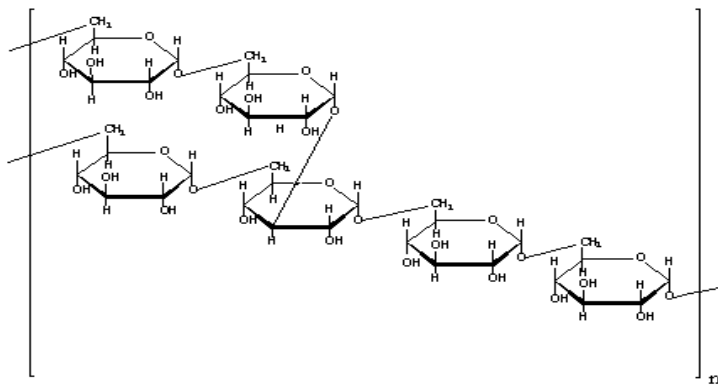


Abb. 3-4 Strukturformel von Dextran

Dextran 70.000 wird in der Medizin als Blutersatzmittel verwendet (Mutschler, 2001). Im Lebensmittelbereich kommt Dextran als Verdickungsmittel und Stabilisator bei Backwaren und Süßwaren sowie bei Getränken und Speiseeis zum Einsatz.

Bezogen wurde Dextran 70.000 von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (D-Taufkirchen).

3.2.3 Rhodamin B

Rhodamin B (B=Brilliantrosa) bildet grüne Kristalle oder ein rötlich-violettes Pulver. Es ist leicht löslich in Wasser und bewirkt dabei eine bläulichrote Farbe mit starker Fluoreszenz. Chemisch ist es zusammengesetzt aus Diethyl-m-aminophenol und Phthalsäureanhydrid. Bei den mit Rhodamin gefärbten Materialien wird die grüne Komplementärfarbe des Tageslichts absorbiert und zum Teil in langwelligere, orangefarbene Strahlen umgewandelt. Rhodamin B ist ein Mutagen und steht im Verdacht, Krebs auszulösen.

3 Material

Die Anregungswellenlänge von Rhodamin B liegt bei 560 nm, die Emissionswellenlänge beträgt 584 nm.

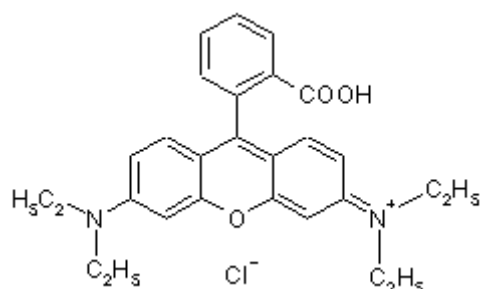


Abb. 3-5 Strukturformel von Rhodamin B

Summenformel: $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$

Bezogen wurde Rhodamin B von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (D-Taufkirchen).

3.3 Weitere Materialien und Geräte zur Herstellung der Nanopartikel

Styren	Fluka
Butylcyanoacrylat (BCA) (Sicomet [®] 6000)	Sichel- Werke GmbH
Methylmethacrylat (MMA)	Fluka
Methylcoumarin	Fluka
Coumarin	Fluka
Apparatur	Doppelmantel-Glasreaktor, HWS Mainz (250 und 500 ml Volumen), mit Schliffdeckel, Ankerrührer, Rückflußkühler, Bodenventil, Stickstoffeinleitung und Tropftrichter
Rührantriebe	RW 20 DZM, IKA Labortechnik EUROSTARdigital, IKA Labortechnik
Dialyseschlauch	Visking [®] dialysis tubing 36/32, Serva Electrophoresis GmbH

3.4. Toxoplasmenstamm

Zum Einsatz kamen Tachyzoiten des Stammes *Toxoplasma gondii* RH clone CAT-GFP (T. Soldati, Medizinische Fakultät Heidelberg, Deutschland).

Die Stammhaltung erfolgte in J774-A1-Zellen als Wirtszellen mit seriellem Passagieren in Dulbecco's MEM- Medium (Biochrom KG) jeweils nach zwei Tagen. Dabei war dem Dulbecco's MEM- Medium 10% fetales Kälberserum (FCS) Penicillin / Streptomycin zugesetzt.

3.5 Zelllinie

Das Toxoplasmen-Infektions-Modell wurde mit der Zelllinie J 774-A1 ACC 170 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) durchgeführt.

Bei J 774 A1 – Zellen handelt es sich um Monozyten-Makrophagen von BALB/c- Mäusen. Die Zelllinie geht zurück auf Tumorzellen einer weiblichen BALB/c-Maus im Jahre 1968. Sie exprimieren Immunglobulin- und Komplementrezeptoren und sind in der Lage, Interleukin 1 und Lysozym zu synthetisieren. Die Generationszeit der Zellen beträgt 35 Stunden.

Die Makrophagen wurden im Dulbecco's MEM- Medium mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum FCS (Biochrom AG, Deutschland) und Penicillin/Streptomycin, bei 37°C und unter 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert.

3.6 Zellkulturmedium für die Kultivierung der Zellen und Toxoplasmen

Dulbecco's MEM (Modified Eagle Medium) (PAA Laboratories GmbH):

Dem Medium wurde zugesetzt:

- 10% Fetales Kälberserum (Hitze-inaktiviert) (Biochrom AG)
- 100 µg/ml Penicillin (Gibco BRL)
- 100µg/ml Streptomycin (Gibco BRL)

3.7 Weitere Materialien für die Zellkulturversuche

Perfect-Counting Beads	Caltag Laboratories (USA-Burlingame)
LIVE/DEAD® BacLight™	Molecular Probes (USA-Eugene)