

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es ein Testsystem zu entwickeln, in welchem die Wirkung und Wechselwirkung von Nanopartikeln in infizierten Zellkulturen gemessen werden konnte.

Als Modellsystem dienten die Mäusemakrophagenlinie J774-A1 und GFP-transfizierte Toxoplasmen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Therapie der Toxoplasmose durch an Träger gekoppelte Arzneistoffe verbessert werden kann. Mit dem Einsatz von Makrophagen, die in der Lage sind, arzneistoffbeladene Partikel durch Phagozytose aufzunehmen, wurde erhofft, dass dies zu einer intrazellulären Anreicherung des Arzneistoffs führen würde.

Zur genauen Charakterisierung wurden einige wichtige physikochemische Parameter der Partikel untersucht. Ausgegangen wurde von nicht abbaubaren Polystyren-Nanopartikeln, die in der Literatur schon oft als Modellpartikel beschrieben wurden. Aus der Frage heraus, wie die Partikel als Arzneistoffträger fungieren sollten, wurde in dieser Arbeit mit Kern-Schale-Partikeln gearbeitet, bei denen der Arzneistoff (Spiramycin bzw. Pentamidin) in der Schale vorhanden sein sollte. Die ersten Kern-Schale-Partikel, die hergestellt wurden, bestanden aus einem Polystyren-Kern und einer Polybutylcyanoacrylat-Schale. Sie wurden als Standardpartikel betrachtet. Nachdem die Standardpartikel zu viel versprechenden Ergebnissen in der Zellkultur geführt hatten, wurden andere Nanopartikel als Referenzen hergestellt. Dazu gehörten Kern-Schale-Partikel mit einem Polystyren-Kern und einer Polymethylmethacrylat- bzw. einer Polystyren-Schale, sowie reine Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel.

Für die Untersuchungen in der Zellkultur wurden zwei verschieden große Partikel hergestellt, um die oft in der Literatur beschriebene Aussage: „je größer die Partikel, desto höher die Aufnahme in die Zellen“, zu untersuchen (Müller et al. 1997). Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte durch die Photonenkorrelationsspektroskopie.

Auch der Oberflächenladung, die durch die Messung des Zetapotentials bestimmt wurde, wird ein großer Einfluß auf die Aufnahme durch Zellen des RES beigemessen. Es wird beschrieben, dass kolloidale Partikel umso stärker phagozytiert werden, je höher der Wert des Zetapotentials ist (Müller, 1991). Die stark negativen Werte der Zetapotentialmessungen zeigten, dass es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikeln um Arzneistoffträger handelte, die bei Lagerung stabile Dispersionen darstellten und die in Bezug auf ihre Oberflächenladung für Versuche mit Makrophagen geeignet waren.

Neben der effektiven Ladung der Partikeloberfläche wurde auch ihre (grenzflächenchemische) Ladungsdichte bestimmt. Sie ist ein zusätzlicher Parameter für die Kenntnis der genauen Oberflächenzusammensetzung. So wurden Querbeziehungen zwischen effektiver Ladung

6. Zusammenfassung

bei der Bewegung im elektrischen Feld und chemischer Beschaffenheit der Partikelgrenzfläche sichtbar. Ein weiterer Parameter, der für die Aufnahme der Partikel durch Makrophagen des RES von Bedeutung ist, ist die Oberflächenhydrophobie. Hydrophobe Nanopartikel werden im Vergleich zu hydrophilen bevorzugt phagozytiert. Über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren hydrophobe Partikel mit Serumproteinen (Opsonisierung), was zu einer erhöhten Partikelaufnahme durch Makrophagen führt. Bei der Charakterisierung der Nanopartikel stellte sich heraus, dass die Beladung mit Arzneistoffen keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter hatte.

Während die Standardpartikel eine schnell biodegradierbare Polybutylcyanoacrylat-Schale besaßen, bestand die Schale der Referenz-Kern-Schale-Partikel aus einer nur langsam biodegradierbaren Polymethylmethacrylat- bzw. einer nicht abbaubaren Polystyren-Schale.

Die durchgeführten Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Polybutylcyanoacrylat zeigten, dass die Partikel innerhalb von 200 min abgebaut bzw. ausreichend verändert wurden, um die Arzneistoffe freizusetzen. Damit wurde sichergestellt, dass bei den Versuchen in der Zellkultur die Partikel innerhalb der dreitägigen Versuchsdauer die Arzneistoffe freigegeben. Der enzymatische Abbau mit Schweineleberesterase wurde mittels Absorptionmessungen verfolgt, während der Partikelabbau durch Hydrolyse mit der Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) untersucht wurde.

Eine Voraussetzung für den Einsatz von Nanopartikeln als Drug-Carrier-System ist eine hohe Beladungsrate mit Wirkstoffen. Damit lässt sich die für eine Applikation notwendige Nanopartikeldosis reduzieren.

Durch die Bestimmung der verbleibenden Wirkstoffmenge im Dispersionsmedium frisch präparierter Partikel ließ sich die relative Beladungsrate der Partikel ermitteln. Es wurde gezeigt, dass bei den Standardpartikeln mit einer PBCA-Schale sehr hohe Beladungsraten von über 95% erreicht wurden. Die Beladungsraten bei den Referenzpartikeln mit einer PMMA- und PS-Schale erreichten dagegen Werte von 65 - 80%.

Die Arzneistofffreisetzung durch enzymatischen Abbau erfolgte mit einem bimodalen Verlauf. Sie war mit 50 - 60% jedoch unvollständig. Eine Studie über den Wirkstoffverlust während der Lagerung zeigte, dass die Standardpartikel mit einer PBCA-Schale über ein Jahr lang stabil waren, und nach dieser Zeit der Wirkstoffgehalt noch über 90% lag.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *in-vitro* Modell ermöglichte es, die Infektion von Makrophagen mit *Toxoplasma gondii* und die Behandlung mit Nanopartikeln zu beobachten und auszuwerten. Ein infiziertes Zellkultursystem, in dem über mehrere Tage (das entspricht

6. Zusammenfassung

mehreren Zyklen der Parasitenvermehrung) die Wirkung von Nanopartikeln mit oder ohne Arzneistoff verfolgt werden kann, kommt einem Tiermodell schon sehr nahe und stellt somit eine wertvolle Ergänzung der Testsysteme dar. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS). Dadurch war es möglich, die Anzahlen der vorhandenen Makrophagen und extrazellulären Toxoplasmen zu bestimmen. Da sowohl die Toxoplasmen (grün) als auch die eingesetzten Nanopartikel (rot) fluoreszierten, konnte über die Auswertung der Fluoreszenzintensität der Zellen eine Zunahme oder Abnahme der intrazellulären Toxoplasmen oder Nanopartikel verfolgt werden. Zur Kontrolle, ob die mit der Durchflusszytometrie erhaltenen Daten auch mit dem wirklichen Geschehen in den Proben übereinstimmten, wurde zusätzlich auch die Mikroskopie eingesetzt. Mit dem etablierten Modell konnten reproduzierbare Ergebnisse gewonnen werden.

Bei den Versuchen mit Nanopartikeln, die mit Arzneistoffen beladen waren, zeigte sich, dass Pentamidin keinen Einfluß auf das System ausübte. Es wurde sogar das Gegenteil beobachtet, da Partikel ohne diese Substanz eine bessere Wirkung erzielten. Durch die Beladung der Nanopartikel mit dem in der Therapie der Schwangerschafttoxoplasmose eingesetzten Spiramycin konnten nur bei den kleineren MC81-PBCA-Partikeln eine geringe Verbesserungen der toxoplasmiziden Wirkung gegenüber den Partikeln ohne Spiramycin erhalten werden.

Der Vergleich zwischen den mit Arzneistoff beladenen Nanopartikeln ergab, dass Spiramycin effektiver war als Pentamidin. Die Therapieerfolge der Partikel ohne Arzneistoff wurde mit einer Stimulation der Makrophagen durch die aufgenommenen Nanopartikel begründet. Erkennbar war dieses an der starken Zunahme der unspezifischen Eigenfluoreszenz der Zellen nach der Partikelaufnahme. Die Toxoplasmen bewirkten nach dem Eindringen in die Zellen eine Hemmung der Makrophagen-Aktivität, die aber durch Zugabe von Nanopartikeln offensichtlich wieder aufgehoben wurde.

Ein Versuch, der darlegen sollte, ob die Nanopartikel auch zur Prophylaxe (Gabe vor der Infektion) eingesetzt werden könnten, zeigte, dass dieses nicht der Fall ist. Die Infektion konnte nicht verhindert werden. Des Weiteren konnte kein Unterschied in der Partikelphagozytose durch infizierte oder nicht-infizierte Zellen gefunden werden.

Der Vergleich der Standardpartikel (Polystyren-Kern und Polybutylecyanoacrylat-Schale) mit den Referenzpartikeln aus einem Polystyren-Kern und einer Polystyren- oder Polymethylmethacrylat-Schale ergab, dass die toxoplasmiziden Effekte von der Menge der aufgenommenen Partikeln abhingen. So wiesen die Referenzpartikel, obwohl sie stärker von den Makrophagen phagozytiert wurden als die Standardpartikel, einen geringeren toxoplasmiziden Effekte auf. Ebenso verhielt es sich bei dem Vergleich der größeren und kleineren Nanoparti-

6. Zusammenfassung

kel. Während die größeren MC80cs-Partikel insgesamt stärker von den Zellen aufgenommen wurden als die kleinen MC81cs-Partikel, zeigten die kleineren die besseren toxoplasmiziden Effekte. Demnach wurde die stimulierende Wirkung, die die Nanopartikel auf die Zellen ausübten durch eine zu große Partikelaufnahme vermindert. Interessant dabei war, dass bei den kleineren Nanopartikeln eine schnelle Aufnahme am ersten Tag auftrat während die größeren Partikel kontinuierlich über die drei Versuchstage aufgenommen wurden. Dadurch wurde von den größeren Partikeln kumulativ über den Versuchszeitraum ein größeres Volumen phagozytiert, was sich dann jedoch auf die toxoplasmizide Wirkung negativ ausübte.

In weiteren Versuchen wurde der Effekt einer Proteinbeladung auf die Aufnahme der Nanopartikel untersucht. Dazu wurden die Nanopartikeln vor ihrem Einsatz in der Zellkultur mit Proteinen abgesättigt. Es stellte sich heraus, dass dadurch keine verbesserte Wirkung gegenüber den nicht abgesättigten Standardpartikeln erzielt werden konnte.

Bei Bestimmung der Proteinadsorptionsmuster der Nanopartikel konnten nur geringe Unterschiede zwischen den mit Arzneistoff beladenen und nicht-beladenen Partikeln gefunden werden. Diese reichten aber aus, um eine unterschiedliche Aufnahme durch die Zellen zu erreichen. Es konnte z.B. ein Unterschied in der Adsorption des Opsonins IgM gefunden werden.

Mit dem vorgestellten Modell können Effekte von Nanopartikeln auf intrazelluläre Parasiten gemessen werden und vielfältige Untersuchungen der Wirkung und Wechselwirkung von Nanopartikeln auf infizierte Zellkulturen untersucht werden. Damit ist das System in der Lage einen Beitrag zur Charakterisierung/Optimierung therapeutisch interessanter Nanopartikel im Hinblick auf z.B.

- Größe
- Ladung (Zetapotential)
- und Beladung (z.B. mit Arzneistoff) zu leisten

sowie als Ersatz zum Tiermodell zu dienen.