

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Erythrozyten als Drug Carrier für schwerlösliche
Substanzen am Beispiel von Amphotericin B**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Verena Staedtke

aus Schwedt / Oder

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. H. Bäuml
 2. Prof. Dr. med. Pöhlmann
 3. Priv.-Doz. Dr. A. Skirtach

Datum der Promotion: 03.06.2012

Für meine Eltern

Danksagung

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Hans Bäumlner, Leiter der Forschungsabteilung des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité, für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie für die Möglichkeit, in einer ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre zu forschen und die Ergebnisse auf Fachkongressen zu präsentieren.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. rer. nat. Radostina Georgieva und Frau Dipl.-Biol. Myriam Brähler, deren methodische Anleitung, wissenschaftlicher Rat und Motivation eine unschätzbare Hilfe für mich waren.

Ich danke all den wissenschaftlichen Kooperationspartnern für die Hilfestellung und die freundschaftliche Zusammenarbeit, allen voran Drs. rer. nat. Jan Möschwitzer und Andreas Lemke (Institut für Pharmazie, Freie Universität, Berlin) für die Überlassung der Amphotericin B Nanosuspension, Dr. rer. nat. Steffen Bauer (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, CCM) für die Hilfe bei der HPLC, den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie am Institut für Anatomie (CCM) sowie des Mikrobiologischen Instituts Charite (CCM), hier insbesondere Frau Koch, für die Überlassung des Pilzstammes und Hilfe bei der Stammzucht.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Forschungsabteilung des Instituts für Transfusionsmedizin, die mich bereitwillig und tatkräftig unterstützt haben, unter Ihnen Dr. rer. nat. Paul Rösch und das Personal der Blutspende CCM. Sie alle haben durch viele Hilfestellungen und eine gute Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Eltern, Elke und Gerhard Staedtke, danke ich für die materielle und moralische Unterstützung, die die Entstehung dieser Arbeit erst ermöglicht hat. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABCD	Amphotericin B kolloidale Dispersion
ABLC	Amphotericin B-Lipid-Komplex
ACN	Acetonitril
AmB	Amphotericin B
AnxV	Annexin V
AmB-D	Amphotericin B Desoxycholat
AmB-NS	Amphotericin B-Nanosuspension
AmB-NS-RBC(s)	mit Amphotericin B beladene Erythrozyten
AmB-NS-RBC-PMN(s)	Neutrophile(r), die Amphotericin B beladene Erythrozyten internalisiert haben
AmB-NS-RBC-MNC(s)	Monozyt(en), die Amphotericin B beladene Erythrozyten internalisiert haben
AmB-NS-RBC-Leukozyten	Leukozyten, die Amphotericin B beladene Erythrozyten internalisiert haben
Aqua dest.	Aqua destillata
AUC	Area under curve
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>C. albicans</i>	Candida albicans
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
d	Tage
Da	Dalton
DDS	Drug Delivery System
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EEF	Einschlusseffizienz
FACS	Durchflusszytometrie
5-(6)-FAM SE	5-(6)-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat

FITC-BSA	Fluorescein isothiocyanate-konjugiertes bovines Serum Albumin
FCS	Fetales Kälberserum
fMLP	<i>Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin</i>
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht
RP-HPLC	Reverse Phase High-Pressure-Liquid-Chromatographie
i.v.	intravenös
hr	Stunden
KBE	Kolonie formende Einheiten
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MNC(s)	Monozyt(en)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propanesulfonische Säure
MW	Mittelwert
MRT	Magnetresonanztomographie
PAGGS-M	Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Natriumchlorid, Mannitol
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PAMPS	pathogen-associated molecular patterns
PMA	<i>Phorbol 13-Myristat 12-Acetat</i>
PMN(s)	Neutrophile(r) (engl.: <i>polymorphnuclear cells</i>)
PI	Propidiumiodid
RBC(s)	Erythrozyt(en)
RES	Retikulo-endotheliales System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI 1640	Medium Roswell Park Memorial Institute Medium, Zellkulturmedium
r_s	Spearman Korrelationsfaktor
SD	Standardabweichung
SDA	Sabouroud-Dextrose Agar
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronmikroskopie
Vr	Variationskoeffizient

Inhaltsverzeichnis

Widmung	i
Danksagung	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
Vorwort	viii
I Einleitung	1
I.1 <i>Candida</i> Spezies und deren Bedeutung als Humanpathogen	1
I.1.1 Übersicht der invasiven Mykosen	1
I.1.2 <i>Candida albicans</i> – Morphologie und Virulenzfaktoren	2
I.1.3 Rolle der Leukozyten bei der Immunabwehr von <i>C. albicans</i>	3
I.1.4 Therapie von <i>C. albicans</i> Infektionen	5
I.2 Aufbau und Wirkmechanismus von Amphotericin B	6
I.2.1 Struktur von Amphotericin B (AmB)	6
I.2.2 Wirkungsmechanismus und –spektrum von Amphotericin B	7
I.2.3 Lipid assoziierte Amphotericin B-Formulierungen	8
I.2.4 Kostenanalyse der verschiedenen AmB Therapien	10
I.3 Erythrozyten als Arzneistoffträger (<i>drug carrier</i>)	10
I.3.1 Erythrozyten	11
I.3.2 Arzneistoffeinschluss (Beladung) in Erythrozyten	12
I.3.3 Targeting von RBCs	14
II Aufgabenstellung	16
III Material und Methoden	17
III.1 Amphotericin B-Nanosuspension (AmB-NS)	17
III.2 Magnetitdispersion	17
III.3 Verwendete Substanzen, Chemikalien und Messlösungen	18
III.4 Verwendete Gerätschaften und Instrumentarien	19
III.5 Grundlagen der mikrobiologischen Methodik	20
III.5.1 <i>Candida albicans</i>	20
III.5.2 Stammhaltung	20
III.5.3 Opsonierung von <i>C. albicans</i>	20
III.5.4 Labeling von <i>C. albicans</i> mit 5-(6)-FAM SE	21
III.6 Blutentnahme	21
III.7 Zellseparationen	21

III.7.1	Erythrozytenisolierung	21
III.7.2	Isolierung von humanen Monozyten (MNC) und Granulozyten (PMN)	22
III.8	Vitalitätsbestimmung und Zellzählung	23
III.9	<i>in-vitro</i> Beladung der RBC mit AmB-NS und Magnetit	23
III.9.1	Grundlagen der Beladung – Herstellung von <i>Ghosts</i>	23
III.9.2	Beladung der RBC mit AmB-NS	24
III.9.3	Fluoreszenzmarkierung der AmB-NS-RBCs mit FITC-BSA	24
III.9.4	Kombinierte Beladung mit Magnetit	25
III.9.5	Bestimmung der <i>in-vitro</i> Effektivität der AmB-NS-RBCs	25
III.10	Phagozytose der AmB-NS-RBC und AmB Freisetzung	25
III.10.1	<i>In-vitro</i> Beladung der Leukozyten mit AmB-NS-RBCs	26
III.10.2	Bestimmung der AmB-Freisetzungskinetik aus den Leukozyten	26
III.10.3	Bestimmung der <i>C. albicans</i> Wachstumsinhibition	27
III.11	Auswirkungen der intrazellulären AmB-NS-RBC Aufnahme auf die Immunzellen	27
III.11.1	Bestimmung der zellulären Vitalität und Apoptose	28
III.11.2	Beurteilung der phagozytotischen Aktivität	28
III.11.3	Beurteilung des oxidativen Burst	29
III.12	Grundlagen der verwendeten Methodik	30
III.12.1	AmB-Bestimmung <i>via</i> HPLC	30
III.12.2	Durchflußzytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>)	32
III.12.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	33
III.13	Statistische Analyse	34
IV	Ergebnisse	35
IV.1	Charakteristika der HPLC-Messmethodik	35
IV.1.1	Linearität (<i>linearity</i>) und analytische Richtigkeit (<i>accuracy</i>)	35
IV.1.2	Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation)	35
IV.1.3	Präzision (intra-assay coefficient of variation)	35
IV.1.4	Nachweisgrenze (<i>detection limit</i>)	35
IV.1.5	Spezifität (cross reactivities)	36
IV.2	Beladung der Erythrozyten	37
IV.2.1	Beladung der Erythrozyten mit der AmB-NS	38
IV.2.2	Inkorporierung von Magnetit in AmB-NS-RBCs	40
IV.2.3	Kernspintomographische Visualisierung der Magnetit-AmB-NS-RBCs	43
IV.2.4	PS Exposition an AmB-NS-RBCs und Magnetit-AmB-NS-RBCs	44

IV. 2.5	<i>In-vitro</i> Effektivität der AmB-NS-RBCs in <i>C. albicans</i> Kultur.....	45
IV.3	Intrazelluläre AmB-Akkumulation und Freisetzung aus Leukozyten.....	46
IV.3.1	Leukozytäre Aufnahme von AmB-NS-RBCs.....	46
IV.3.2	Leukozytäre Freisetzungskinetik von AmB.....	48
IV.3.3	Bestimmung der antifungalen Kapazität von AmB-NS-RBC-Leukozyten.....	50
IV.4	Auswirkungen von intrazellulärem AmB auf die Funktionen der PMN und MNC.....	52
IV.4.1	Untersuchungen zur Vitalität von AmB-NS-RBC-Leukozyten.....	52
IV.4.2	Phagozytose von AmB-NS-RBC-Leukozyten von <i>C. albicans</i>	54
IV.4.3	Untersuchungen zum oxidativen Stress.....	57
V	Diskussion	59
V.1	Erythrozyten als Arzneistoffträgersysteme für schwerlösliche Substanzen am Beispiel von AmB.....	60
V.1.1	Einsatz der Nanosuspension.....	60
V.1.2	Schwerlösliche Substanzen - am Beispiel von AmB - können als Nanosuspension in Erythrozyten geladen werden.....	61
V.1.3	Nachweismethoden der erythrozytären AmB Beladung.....	63
V.1.4	Markierung der AmB-NS-RBCs mit Eisenoxidnanopartikeln ermöglichte eine gesteigerte AmB-Beladung und Visualisierung der Zellen im MRT.....	64
V.2	Leukozytäre Aufnahme und Freisetzung von AmB.....	66
V.2.1	AmB-NS-RBC werden effizient von Leukozyten aufgenommen und erhöhen die antifungale Potenz.....	66
V.2.2	Die leukozytäre AmB Freisetzung folgt dem Diffusionsmodell.....	70
V.3	„Du bist, was du isst“ - Auswirkungen der phagozytären AmB-NS-RBC Aufnahme auf die Funktionalität der Leukozyten.....	73
V.3.1	Die Internalisierung der AmB-NS-RBCs hat keine Auswirkungen auf die leukozytäre Zellvitalität.....	74
V.3.2	Die Internalisierung der AmB-NS-RBCs führt zu transienten Einschränkungen der Phagozytose und Burst Produktion.....	74
V.4	Schlussfolgerung.....	78
VI	Zusammenfassung	79
VII	Literaturverzeichnis	80
	Curriculum vitae	90
	Publikationen	92
	Eidesstattliche Erklärung	93



Abb. i-1: Die Prozession des Trojanischen Pferdes von Giovanni Domenico Tiepolo, 1760.

„ [...] ἀλλ' ἄγε δὴ μετάβηθι καὶ ἵππου κόσμον ἄεισον
 δουρατέου, τὸν Ἐπειὸς ἐποίησεν σὺν Ἀθήνῃ,
 ὃν ποτ' ἐς ἀκρόπολιν δόλον ἤγαγε δῖος Ὀδυσσεὺς
 ἀνδρῶν ἐμπλήσας, οἳ Ἴλιον ἐξαλάπαξαν [...].“

Die griechische Belagerung Trojas trat in das 10. Jahr, als Odysseus die kriegsentscheidende List ersann und ein riesiges hölzernes Pferd bauen ließ, in dessen Bauch die tapfersten Krieger Griechenlands verborgen wurden. Scheinbar den Krieg aufgebend, zogen sich die Griechen zurück und hinterließen das Ross als Opfergabe für den Gott Poseidon vor den Toren der Stadt. Von Sinon wurden die Trojaner alldann bewogen, das Ross in ihre Stadt zu ziehen, um die Gottheit für sich einzunehmen. In der folgenden Nacht öffneten die griechischen Krieger das unerstürmbare Stadttor und besiegelten so das Schicksal von Troja.

[Aus der Odyssee, 8. Gesang, Homer, 8. Jhs v. Chr.]

I Einleitung

I.1 *Candida* Spezies und deren Bedeutung als Humanpathogen

I.1.1 Übersicht der invasiven Mykosen

Pilze sind in den letzten drei Jahrzehnten als wichtige Ursache humaner Erkrankungen identifiziert worden, insbesondere bei immungeschwächten Patienten und Patienten mit schweren Grunderkrankungen [1, 2]. Zu den Riskogruppen gehören Personen, die sich hämatopoetischen Stammzelltransplantationen, Organtransplantationen, größeren Operationen (vor allem abdominelle Chirurgie) oder einer immunsuppressiven Therapie unterziehen sowie Patienten mit AIDS, Tumorerkrankungen, fortgeschrittenem Alter und Frühgeborene [3]. Die Neutropenie ist dabei der wichtigste einzelne Risikofaktor, wobei der Neutropeniedauer eine entscheidende Bedeutung zukommt [4].

Pilzinfektionen sind in erster Linie opportunistisch, sie können aber auch endemisch (Ausbruch in einer Gemeinde) auftreten. Von zentraler Bedeutung bei opportunistischen Mykosen sind vor allem Erreger der *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii* und *Aspergillus spp.*, obwohl die Liste stetig anwächst [1, 5]. So stieg zwischen 1979 und 2000 der prozentuale Anteil von Pilz-assoziierten Sepsisfällen um 207%, mehr als bei jedem anderen Erreger [2]. Weiterhin wurden in der „Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance“ (SCOPE) Studie, einer 49-Zentren Studie von fast 25000 hämatogen-nosokomialen Infektionen, Pilze in 9.5% der Fälle als ursächliches Sepsispathogen identifiziert mit *Candida spp.* als den vierthäufigsten Erreger überhaupt, nur noch übertroffen von Koagulase negativen Staphylokokken, Staphylokokkus aureus und Enterokokken [1].

Insgesamt entfallen 75% aller invasiven Pilzinfektionen auf *Candida spp.* [1]. Dabei stellen insbesondere Candidämien, die mit einer Mortalität von 25 - 60% belegt sind [6], ein großes Problem dar [1]. Die Infektionsquelle ist der Patient meist selbst (endogen), in welcher die kommensale Pilzflora auf der Haut und im Magen-Darm-bzw. Urogenital-Trakt die Gelegenheit ergreift, eine Infektion zu verursachen, wenn das Immunsystem und die sog. Anti-*Candida*-Barriere schwach sind [1].

Candida spp. gehören taxonomisch dem Stamm der *Ascomycota* und der Familie der *Candidaceae* an. Obwohl mehr als 100 Arten von *Candida* bekannt sind, sind nur wenige humanpathogen, da der Großteil nicht zu einem Wachstum bei 37°C befähigt ist [7]. *De facto*

entfallen etwa 95 - 97% aller *Candida* assoziierten Infektionen auf nur 5 Spezies: *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* und *Candida krusei*; insgesamt sind lediglich 13 fakultativ humanpathogene *Candida* Spezies in der Literatur beschrieben [1]. *C. albicans* ist der mit Abstand am häufigsten identifizierte Erreger, obwohl in den letzten Jahren ein 7 - 10% iger Rückgang mit Verschiebung zu *non-albicans* Arten zu verzeichnen war [1]. Trotzdem ist er allein für 90 - 100% der mukosalen Infektionen und 40 - 70% der Candidämien verantwortlich [7]. Klinische Affektionen reichen von oraler Candidiasis, Ösophagitis über Infektionen des Urogenitaltraktes, die als sogenannte oberflächliche Candidiasis in der Regel nicht lebensbedrohlich sind; wenn das Pathogen jedoch in die Blutbahn gelangt, kann die Infektion disseminieren und Nieren, Herz oder Gehirn infizieren (invasive Candidiasis). Dabei kann das klinische Bild foudroyant mit den typischen Zeichen einer bakteriellen Sepsis – Fieber, septischer Schock, Vigilanzstörungen, Multi-Organversagen – einhergehen (z.B. disseminierte oder systemische Candidiasis) oder subakut/chronisch (z.B. chronische disseminierte Candidiasis) verlaufen [8]. Virulenzfaktoren spielen in allen Stadien der Infektion eine große Rolle. Dazu gehören unter anderem Adhäsine, sekretierte Proteasen und zytoplasmatische Proteine.

Die Gründe für die vergleichsweise schlechte Prognose von invasiven Mykosen werden kontrovers diskutiert. Entscheidend für die Prognose ist neben der Immunkompetenz des Patienten selbst, die frühzeitige Therapieinitiation. Jedoch erreichen derzeitige eingesetzte Therapeutika häufig keine ausreichend effektiven Gewebespiegel und sind in hohem Maße zytotoxisch [9]. Aus diesem Grund wäre es essentiell über Behandlungsstrategien mit einer verbesserten Wirkstoffakkumulation am Infektionsort zu verfügen.

I.1.2 *Candida albicans* – Morphologie und Virulenzfaktoren

Die ubiquitäre Präsenz von *C. albicans* basiert auf seiner Fähigkeit als Saprobium im humanen Organismus durch Adaptation der Morphologie und Physiologie zu überleben [10]. Einer besonderen Bedeutung kommt dabei der Zellwand zu, die nicht nur die Interaktion zwischen dem Mikroorganismus und der Umgebung vermittelt sondern auch die morphologische Plastizität des Pilzes ermöglicht.

C. albicans ist ein polymorpher Organismus, der zwischen einzelligen Hefeformen, mehrzelligen, filamentösen Wachstumsformen und Sporenbildung in Abhängigkeit von der Umgebung variieren kann [11, 12]. Hefezellen dienen insbesondere zur Besiedlung und

Verbreitung durch Knospung von der Mutterzelle (Blastospore) im Wirt. Bei den invasiven, filamentösen Wachstumsformen wird zwischen Pseudohyphen und echten Hyphen unterschieden, wobei echte Hyphen durch Septen voneinander abgetrennt sind und Pseudohyphen, im Gegensatz dazu, nach der Sprossung zwar ein Septum bilden, aber an der Mutterzelle befestigt bleiben [12, 13].

Der Morphotypenwechsel kann durch unterschiedliche Umgebungsfaktoren ausgelöst werden. So begünstigen beispielsweise Temperaturen $< 35^{\circ}\text{C}$ und pH Werte < 6.5 die Ausbildung von Hefen, während Temperaturen $> 35^{\circ}\text{C}$ bzw. pH Werte > 6.5 zur Induktion des Hyphenwachstums führen [14]. Gleichermassen fördern Stresssituationen, anaerobe Bedingungen und Serum- oder Makrophagenkontakt die Ausbildung von Filamenten [15]. Unter nährstoff- und sauerstoffarmen Bedingungen kann *C. albicans* in Form von sogenannten Chlamydosporen überdauern [11, 14].

Die zentrale Bedeutung dieses Polymorphismus für die Virulenz von *C. albicans* wird bei der Betrachtung unterschiedlicher Morphologiemutanten deutlich. Als Beispiel sei die *C. albicans* Doppelmutante *cph1/cph1 efg1/efg1* erwähnt, die aufgrund ihrer Unfähigkeit Filamente auszubilden im Mausmodell avirulent ist [16]. Überraschenderweise zeigen hyperfilamentöse Mutanten wie *pde2/pde2* ebenfalls eine verminderte Virulenz [17], obwohl unbestreitbar ist, dass die Hyphenbildung entscheidend für die Invasivität von *C. albicans* ist [18]. Demnach korreliert die Virulenz nicht mit der Wachstumsform *per se*, vielmehr scheint die Fähigkeit zum Morphotypenwechsel und den damit assoziierten Veränderungen essentiell für den Grad der Pathogenität zu sein [18]. Hierbei sind insbesondere Veränderungen der Adhäsionseigenschaften, die Expression von hydrophoben Zelloberflächenmolekülen und die Sekretion von Aspartylproteasen sowie Phospholipasen zu erwähnen, die mit dem Wechsel der Wachstumsform die Pathogenität von *C. albicans* beeinflussen [10, 19].

I.1.3 Rolle der Leukozyten bei der Immunabwehr von *C. albicans*

Wie in Kapitel I.1.2 bereits angedeutet, unterstützen vielfältige Virulenzfaktoren die Invasivität von *C. albicans* im humanen Organismus [13]. Bei der Erkennung und Bekämpfung einer solchen Infektion spielt das angeborene Immunsystem eine zentrale Rolle, indem es schnell auf die Pathogene reagiert und diese eliminiert [20]. Dazu zählen zirkulierende Immunzellen –

Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen –, Epithelbarrieren und verschiedene Proteine (Komplementsystem, Defensine, Kollektine etc.) [21].

Die phagozytäre Identifizierung von *C. albicans* erfolgt weitestgehend durch pathogen-spezifische Strukturen, sogenannte “pathogen-associated molecular patterns” (PAMPs). Zu den wichtigsten fungalen PAMPs gehören die Zellwandkomponenten Mannan und β -Glukan. Diese werden von verschiedenen Membran-gebundenen Rezeptoren auf den Phagozyten u. a. Lektine (Dectin-1), Integrine und Toll-like Rezeptoren (pattern recognition receptors; PRR) erkannt und ermöglichen somit die Einleitung der Phagozytose und Produktion von proinflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF- α) ohne dass der Pilz zuvor opsoniert sein muss [22]. Wie viele andere Pathogene verfügen auch Fungi über Strategien, sich der Erkennung durch Phagozyten effektiv zu entziehen (Immunevasion). Ein wesentlicher Mechanismus besteht in der Unkennbarmachung oder „Maskierung“ von PAMPs, die insbesondere bei filamentösen Wachstumsformen beobachtet wird. *C. albicans* kann weiterhin durch Sezernierung von Komplementproteasen und Rekrutierung von regulatorischen Proteinen wie C4 bindendes Protein und Faktor H das Komplementsystem inhibieren und somit einer Immunattacke entgehen [22, 23].

Nach der Erkennung von *C. albicans* folgt die Phagozytose und deren Aufnahme ins Phagosom. Durch die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom entsteht das sogenannte Phagolysosom, in dem der Fungus aufgrund der antimikrobiellen Umgebung zersetzt wird [24]. Dies beinhaltet u. a. die Azidifizierung des Phagolysosoms durch ATPasen und verschiedene oxidative bzw. nicht-oxidative Mechanismen mit dem Ziel der Einleitung einer adaptiven Immunantwort [22]. Der eigenen phagolysosomalen Abtötung kann *C. albicans* durch Ausbildung von Hyphen entgehen [25]. Interessanterweise wird dieses Phänomen nur in bestimmten Phagozyten, nämlich Monozyten, beobachtet, da Neutrophile die Hyphenbildung unterbinden können [15]. Zu den weiteren Taktiken zählen die fungale Inhibition der phagosomalen Ausreifung durch Veränderung des intraphagosomalen pH Wertes und die Sekretion von spezifischen Proteasen, die Apoptose der Immunzellen induzieren [22].

Bei der phagozytären Abtötung von *C. albicans* ist der oxidative Burst von essentieller Bedeutung. Die NADPH-Oxidase katalysiert die Generierung von Superoxidanionen (ROS), die aufgrund ihrer Instabilität in andere Oxidanzien wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), hypochlorige Säure (HOCl), Peroxynitrit (ONOO $^-$) oder Nitrylchloride (NO $_2$ Cl) dismutieren. ROS können sowohl intrazellulär, in das Phagosom, als auch extrazellulär freigesetzt werden [22, 26]. Diese Erkenntnis ist bedeutsam, da Pseudohyphen und Hyphen im Gegensatz zu Hefen

und Konidien aufgrund ihrer Größe nicht phagozytiert sondern extrazellulär abgetötet werden. Neben der NADPH-Oxidase existiert noch ein weiteres Enzym, die Myeloperoxidase (MPO), die die Bildung von HOCl aus H₂O₂ und Chloridionen katalysiert. Sie spielt bei der Bekämpfung von Pilzinfektionen jedoch nur eine untergeordnete Rolle, wie am Krankheitsbild der chronischen Granulomatose (CGD) gezeigt werden konnte [26].

Die Phagozyten unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, Fungi zu töten oder ihr Wachstum zu beschränken in Abhängigkeit von der jeweiligen Pilzart. Im Fall von *C. albicans* sind Neutrophile (PMN) die potentesten Effektorzellen, gefolgt von den Monozyten (MNC), Makrophagen und letztlich dendritischen Zellen [22]. PMN sind in der Lage sowohl Hefen als auch filamentöse Formen von *C. albicans* in gleichem Masse effektiv abzutöten. Im Durchschnitt ingestiert ein Neutrophiler zwei Hefezellen, jedoch können bis zu zehn Hefen pro Zelle aufgenommen werden, wovon ca. nur 20 - 30% erfolgreich abgetötet werden [8]. Dabei hochreguliert *C. albicans* in Gegenwart von ROS Gene zur Detoxifizierung wie z. B. Superoxiddismutasen (SOD1-6), Katalase, Glutathion-Peroxidase- bzw. Glutathion-Reduktase-Komplex sowie Thioredoxin-Peroxidase- bzw. Thioredoxin-Reduktase-Komplex und sichert somit sein Überleben [15]. MNC haben in etwa dieselbe Aufnahmekapazität für *C. albicans*, jedoch ist ihre Abtötungskapazität infolge der fungalen Adaptation der Proteinbiosynthese und Hyphenausbildung geringer [8, 15].

I.1.4 Therapie von *C. albicans* Infektionen

Die Behandlung von *C. albicans* Infektionen stützt sich im allgemeinen auf 3 Wirkstoffgruppen: Polyene (Amphotericin B), Azole (Ketoconazol, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol) und Echinocandine (Caspofungin, Micafungin) [27].

Derzeit stellen Amphotericin B (AmB) und neuerlich auch Echinocandine aufgrund ihres breiten Erregerspektrums den Goldstandard in der empirischen Therapie invasiver Mykosen dar [28]. Das Erregerspektrum beinhaltet neben *Candida spp.* auch andere Pilzarten, die zusammen für > 95% der Pilzinfektionen verantwortlich sind. Dies ist bedeutsam, da die Prognose von Patienten mit invasiven Mykosen, einschließlich Candidosen, von der zeitnahen Initiierung einer adäquaten Therapie abhängt, die Diagnostik dabei aber oft sehr zeitaufwändig ist und Verzögerungen in der Therapie mit einer erhöhten Mortalität verbunden sind [1].

Aus klinischer Sicht ist die Erreger gerichtete antimykotische Therapie bevorzugt. Die Auswahl der Therapie wird von der anatomischen Lokalisation der *C. albicans* Infektion, Grunderkrankungen, Immunstatus sowie patientenspezifischen Risikofaktoren bestimmt [3]. Für kutane lokalisierte Candidainfektionen stehen eine Vielzahl von topischen Antimykotika (z. B. Clotrimazol, Econazol, Ciclopirox, Miconazol, Ketoconazol, Nystatin) zur Verfügung [28]. Bei Intolerabilität, Versagen oder fortschgeschrittenem Krankheitsbild kann eine systemische Therapie mit Azolderivaten (Fluconazol, Itraconazol) durchgeführt werden. Invasive Candidosen wie z.B. Candidämien und disseminierte Candidiasis in immunokompetenten, nicht-neutropenischen Patienten erfordern Fluconazol (800 mg loading Dosis gefolgt von 400 mg/d) als Therapie erster Wahl für wenigstens zwei Wochen [28]. AmB wurde über viele Jahre als Alternative zu Fluconazol eingesetzt. Mit der Entwicklung der neueren Azole (z. B. Voriconazole) und Echinocandine (z. B. Caspofungin), die ein geringeres Nebenwirkungsprofil bei gleicher Prognose aufzeigen, wurde AmB jedoch in die tertiäre Therapielinie zurückgestuft [28]. Im Gegensatz dazu sollten immunsupprimierte, neutropenische Patienten bei invasiven Candidosen mit AmB oder Echinocandinen behandelt werden [28]. Die Dosis für AmB Desoxychoolat beträgt 0.5 - 1 mg/kg/d, wird liposomales AmB verwendet, werden höhere Dosen von 3 - 5 mg/kg/d bevorzugt [28].

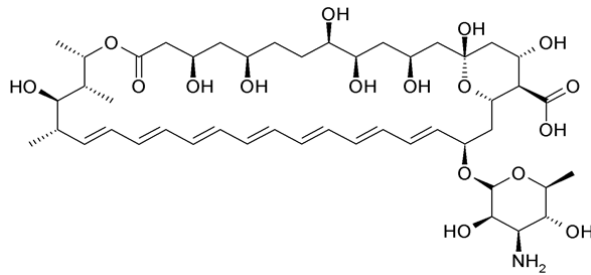
I.2 Aufbau und Wirkmechanismus von Amphotericin B

I.2.1 Struktur von Amphotericin B (AmB)

Amphotericin B ist ein makrozyklisches Heptaenantibiotikum bestehend aus einem Laktonring mit 7 konjugierten Doppelbindungen. Das zugleich namensgebende amphotere Verhalten dieser Substanz wird durch die Carboxylgruppe am Hauptring und die Aminogruppe am Mykosamin hervorgerufen (**Abb. I-1**) [29, 30]. AmB wurde 1955 erstmals aus Kulturfiltraten von *Streptomyces nodosus* in Venezuela isoliert [31]. Als natürliches Fermentationsnebenprodukt entstand dabei auch Amphotericin A, das sich aufgrund seiner geringeren antifungalen Potenz nicht als Therapeutikum durchsetzen konnte.

Angesichts seiner zwitterionischen Natur und der asymmetrischen Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Gruppen ist AmB in allen wässrigen und vielen organischen Lösungsmitteln nur schwer löslich, was unter anderem die Ursache für die niedrige Magen-Darm-Resorptionrate von < 5% bei oraler Verabreichung darstellt. Aufgründessen ist die intravenöse Therapie

obligat. Zur klinischen Anwendung wird AmB daher mit Natrium-Desoxycholat (AmB-D) dispergiert. Nach deren Administration verteilt es sich gemäß dem Mehrkompartimentenmodell vorwiegend in Leber, Milz und Knochenmark. Der im Serum verbleibende Teil wird überwiegend an β -Lipoproteine gebunden und zu 30 - 40% biliär ausgeschieden. Die initiale Halbwertszeit beträgt etwa 24 hr, gefolgt von einer terminalen Halbwertszeit von bis zu 15 Tagen (biphasische Ausscheidung) [30, 32].



<i>Molekulargewicht:</i>	924.079 g/mol
<i>Summenformel:</i>	$C_{47}H_{73}NO_{17}$
<i>Löslichkeit:</i>	Wasser < 1 mg/l (pH 6 - 7)
	Methanol 2000 mg/l
	Ethanol 500 mg/l
	Propylenglykol 1 mg/l

Abb. I-1: Amphotericin B-Struktur und chemische Eigenschaften

Im stark sauren oder basischem Milieu (< pH 2 und > pH 11) ist AmB mit ungefähr 0.1 mg/ml schwer löslich und bildet Salze aus, die einen geringeren therapeutischen Index aufweisen [29].

I.2.2 Wirkungsmechanismus und –spektrum von Amphotericin B

AmB spielt aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums nach wie vor eine zentrale Rolle bei der Behandlung von lebensbedrohlichen Organ- und Systemmykosen. Das AmB-Wirkungsspektrum beinhaltet Candidosen, Aspergillosen, Kryptokokkosen, Histoplasmosen, Kokzidioidomykosen und Infektionen mit Blastomyces- und Mucor-Arten bei einer fungistatischen Konzentration von 0.03 bis 1.0 μ g/ml [30, 32]. Darüber hinaus werden Resistenzentwicklungen nur selten beobachtet [33]. Neben Pilzinfektionen wird AmB auch bei Protozoen-Infektionen durch Trichomonas, Leishmania, Trypanosoma und Entamoeba erfolgreich eingesetzt.

Der Wirkungsmechanismus beruht auf die Interaktion des AmB Moleküls mit Ergosterol, einem wichtigen Bestandteil der fungalen Zellmembran. Derzeit wird angenommen, dass AmB-Moleküle mindestens zwei verschiedene Membrankanaltypen in der fungalen Zellmembran ausbilden können, die sich in ihrer Permeabilität unterscheiden (**Abb. I-2A**) [34]. Monomere AmB-Moleküle in der Lipiddoppelschicht formen zunächst *via* Komplexbildung mit den Phospholipiden nicht-wässrige AmB-Poren. Dies führt vorerst zu einem Verlust von monovalenten Kationen, hauptsächlich K^+ , später auch von Mg^{2+} , Ca^{2+} und PO_4^{3-} , Aminosäuren, kleinen Peptiden sowie Nukleinsäurederivaten [35]. In diesem Zustand wird die Pilzzelle nur in

ihrem Wachstum gehemmt (fungistatisch), bleibt jedoch lebensfähig. Ab einer „kritischen“ AmB-Konzentration ($> 1 \mu\text{M}$) kommt es durch Interaktion des Ergosterols mit der hydrophoben Einheit der nicht-wässrigen AmB-Poren zur Ausbildung von transmembranen, wässrigen AmB-Kanälen [36], die durch den Anstieg des intrazellulären pHs infolge der erhöhten H^+ bzw. OH^- Permeabilität den fungalen Exitus hervorrufen (Fungizidie) [34, 37].

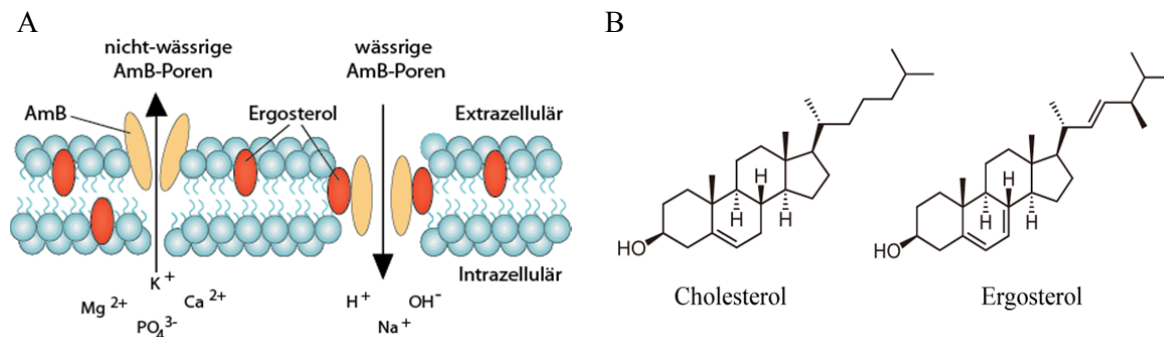


Abb. I-2: Antifungaler Wirkungsmechanismus von AmB.

(A) Durch die Interaktion von AmB mit den Phospholipiden und Ergosterin wird die osmotische Integrität der fungalen Zellmembran zerstört: es entstehen nicht-wässrige und wässrige AmB-Poren, die zu einem Verlust von diversen Ionen und Anstieg des intrazellulären pHs führen. (B) Strukturhomologie von Cholesterin und Ergosterin.

Der Wirkungsmechanismus steht aufgrund der hohen Affinität von AmB zum strukturhomologen humanen Cholesterin in unmittelbarem Zusammenhang mit den Nebenwirkungen, die bei ca. 80% aller behandelten Patienten auftreten (Abb. I-2B) [29, 30]. Dabei ist das Ausmaß der Nebenwirkungen bei jedem dritten Patienten so schwerwiegend, dass die Dosis reduziert oder im ungünstigsten Fall die Therapie sogar abgebrochen werden muss [30]. Im Rahmen der Infusionstherapie treten vor allem Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Myalgien, Hepatotoxizität, Blutbildveränderungen und Thrombophlebitiden an der Injektionsstelle auf, ferner kommt es zu Appetitlosigkeit, Erbrechen oder Durchfall [30, 32]. Die klinische Hauptgefahr besteht in der ausgeprägten Nephrotoxizität im Sinne einer Azotämie, die mit einer hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrate einhergeht. Ab einer kumulativen Gesamtdosis von 4 - 5 g muss bei 80% der Patienten mit irreversiblen Nierenschäden gerechnet werden [38].

I.2.3 Lipid assoziierte Amphotericin B-Formulierungen

Die schwerwiegenden Nebenwirkungen des „klassischen“ AmBs, geben seit Jahrzehnten Anlass, nach besser verträglichen Applikationsformen mit gleicher therapeutischer Effektivität zu

suchen. Schließlich gelang Lopez-Berenstein 1984 die erste erfolgreiche Herstellung von AmB-haltigen Liposomen, deren Markteinführung in den 90iger Jahre zu einer deutlichen Steigerung der Verträglichkeit führte. Dies ermöglichte die Verabreichung höherer Dosierungen, die sich jedoch trotz einer gesteigerten Gewebepenetration nur teilweise in einer verbesserten Prognose widerspiegeln [39]. Dennoch hat das Auftreten nephrotoxischer Effekte noch immer relevanten Einfluss auf die Mortalität und Dauer des Klinikaufenthalts [1]. Weitere Details und ein Vergleich der drei kommerziell erhältlichen lipidbasierten AmB Formulierungen sind **Tabelle I-1** zu entnehmen.

AmBisome®, zugelassen seit 1997, ist die einzige echte liposomale AmB-Zubereitung und hat in der Klinik aufgrund der überragenden pharmakokinetischen Eigenschaften mit einer deutlich verbesserten AUC eine bedeutende Rolle eingenommen. Aufgrund der Biomembran destabilisierenden Eigenschaften wurde die eingeschlossene AmB-Menge mit 10 mol% relativ gering gehalten verglichen zu anderen lipidbasierten Formulierungen [40]. Akute infusionsbedingte Nebenwirkungen treten im Vergleich zu konventionellem AmB mit verminderter Häufigkeit auf [41, 42]. Das Auftreten der Nephrotoxizität kann in Abhängigkeit von der applizierten Dosis auf 10 - 15% reduziert werden [41, 42].

	AmB-D	AmBisome	ABL C	ABCD
AmB-Gehalt [mol% AmB]	34	10	33	50
Konfiguration	Micellen	Liposomen	Gerippt	Scheibenförmig
Partikelgröße [nm]	300 – 400 [45, 46]	60 – 80	1600 – 6000	120 – 140
Dosis [mg/kg/d]	0.6	5	5	5
C_{max} [µg/ml]	1.1	83	1.7	3.1
AUC [µg x hr/ml]	17.1	555	9.5 - 14	43
Plasmakonzentration [mg/l] [43]	1.82 ± 0.07	62.9 ± 0.99	0.93 ± 0.03	0.85 ± 0.01
Halbwertszeit [hr]	27–39	8.6	16	28
Verteilungsvolumen [l/kg]	5.1	0.11	131	4.3
Clearance [ml/hr/kg]	38	11	436	117
Nephrotoxizität [%]	25 – 50	10 – 15	10 – 15	20
Preis [\$/50 mg] [31]	12	188	135	93
Tagespreis [\$/70 kg]	10 – 17	790 – 1316	805 – 945	336 – 448

Tabelle I-1: Vergleich der Charakteristika von AmB und seinen Formulierungen [31, 39, 40, 43-46]

Amphotericin B-Lipid-Komplex (ABLC, Abelcet®) wurde 1995 als erste Lipidformulierung zugelassen. Der molare prozentuale AmB-Anteil ist im Gegensatz zu Ambisome auf 33% angestiegen (**Tab. I-1**). Im infizierten Gewebe wird das eingeschlossene AmB durch vom Pilz gebildete Lipasen freigesetzt [47], was niedrigere AmB-Plasmakonzentrationen, höhere AmB-Ansammlungen in der Lunge, Leber und Milz sowie die Halbierung der Nephrotoxizität bei gleicher Effektivität im Vergleich zu AmB-D ermöglichte [30, 48]. Trotzdem verringerte sich die Häufigkeit von akuten, infusionsbedingten Komplikationen nur minimal [49] oder gar nicht [48].

AmB als kolloidale Dispersion (ABCD) wird über das retikulo-endotheliale System relativ schnell aus dem Blut eliminiert und anschließend von der Leber in die Zirkulation freigesetzt (Zweikompartiment-Pharmakokinetik) [30]. Dabei werden in der Milz, Leber und im Knochenmark hohe Wirkstoffkonzentrationen erreicht während die Konzentrationen in der Niere, Lunge und im Herz vergleichbar mit konventionellem AmB-D sind [49]. Obwohl klinische Daten auf eine geringere Nephrotoxizität hindeuten [30], führten gehäuft auftretende infusionsbedingte Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost und Kopfschmerzen zu Anwendungslimitierungen [48].

I.2.4 Kostenanalyse der verschiedenen AmB Therapien

Tabelle I-1 führt die geschätzten Behandlungskosten der verschiedenen AmB-Formulierungen pro Tag bei einem Durchschnittspatienten von 70 kg Körpergewicht auf [31]. Es ist offensichtlich, dass die Therapie mit konventionellem AmB-D die weitaus kostengünstigste Therapieform darstellt, jedoch auch mit dem höchsten Toxizitätsrisiko assoziiert ist. Anhand der Therapiekosten und -komplikationen wird deutlich, dass eine große Nachfrage nach AmB-Darreichungsformen mit geringerem Nebenwirkungsprofil besteht, die die Vorteile der Lipid-basierenden Formulierungen bei günstigeren Produktionskosten aufweisen.

I.3 Erythrozyten als Arzneistoffträger (*drug carrier*)

Ein systemisch applizierter Arzneistoff verteilt sich entsprechend seines Verteilungskoeffizienten in den verschiedenen Kompartimenten des Organismus und verursacht dabei Nebenwirkungen. Ideal wäre es deshalb Wirkungsort und -dauer eines Pharmakons gezielt steuern zu können (*drug targeting*), ohne gesundes Gewebe zu beeinflussen. Die ersten Ideen zum Konzept des *drug targeting* stammten von Paul Ehrlich, der die Vision einer sogenannten

„ZauberKugel“ verfolgte. Demnach sollte ein Medikamententrägersystem folgende Bedingungen erfüllen:

1. kontrollierte Freisetzung in der Zirkulation oder im Zielgewebe
2. nicht toxisch, nicht immunogen
3. chemisch und physikalisch stabil
4. biodegradierbar
5. günstige und einfache Herstellung

I.3.1 Erythrozyten

Erythrozyten (RBCs) bilden mit 4.5-5.5 Mio Zellen/mm³ die größte Blutzellpopulation. Nach ihrer Ausreifung im Knochenmark und der anschließenden Ausschleusung in die Blutbahn sind sie maßgeblich für den Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport im menschlichen Organismus zuständig (**Abb. I-3A**). Die Sauerstoffbindung erfolgt reversibel an den Eisenkomplex des Protoporphyrins IX (Häm), das zusammen mit Globin das sauerstoff-transportierende Protein Hämoglobin bildet. Hämoglobine bestehen aus 4 Untereinheiten (2 α , 2 β) und repräsentieren mit 90% den Hauptbestandteil der RBCs. Der ausgereifte Erythrozyt stellt sich als organellenloses, bikonkaves Diskoid mit einem Durchmesser von ca. 7.8 μ m und einem Volumen von 85-93 fl dar. Ihre Lebensdauer beträgt ca. 100 bis 120 Tage [50].

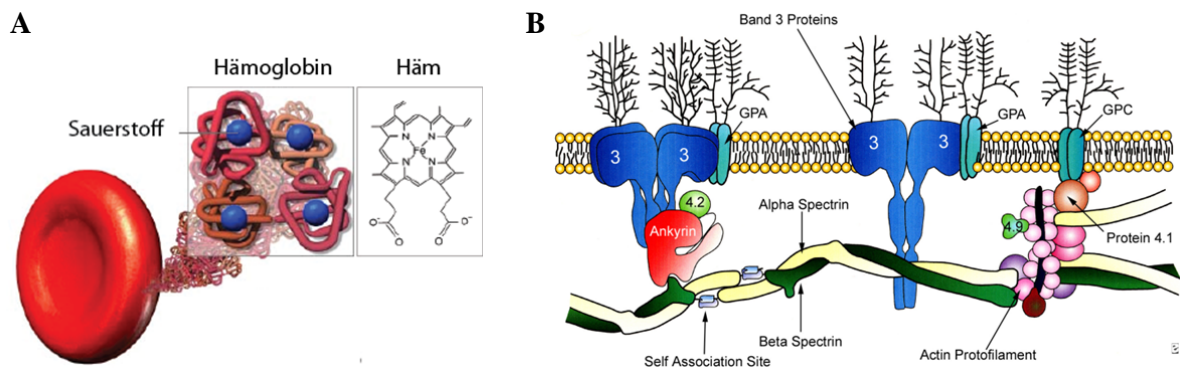


Abb. I-3: Aufbau des RBC. (A) RBC bestehen zu 90% aus dem Sauerstoff-bindenden Protein Hämoglobin, das zum Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport dient (modifiziert nach [51]). (B) Aufbau der erythrozytären Zellmembran [52].

Die Scheibenform verdankt der RBC seinem Membranskelett, das eine außerordentliche Flexibilität und Verformbarkeit aufweist. Dieses besteht aus einem flächigen Netz von Spektrin-Filamenten, die durch kurze Aktin-Filamente zusammen gehalten werden und in der

Zellmembran verankert sind (**Abb. I-3B**) [53]. Die Zellmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die sich aus 20% Wasser, 35% Lipiden, 40% Proteinen und 6% Kohlenhydraten zusammensetzt [54]. In der Lipiddoppelschicht befinden sich integrale, transmembrane und amphiphile Proteine, die sich durch laterale Diffusion in der Membran bewegen können (*Flipflop*) oder durch nicht-kovalente Bindungen mit peripheren Proteinen in der Membran immobilisiert sind [53]. Diese biochemische Komposition garantiert die mechanische Flexibilität der RBCs.

I.3.2 Arzneistoffeinschluss (Beladung) in Erythrozyten

Erythrozyten eignen sich aufgrund ihres Beladungsvolumens, Biokompatibilität und Lebensdauer als exzellente *drug carrier*. Die erste erfolgreiche erythrozytäre Beladung gelang Gardos 1953 mit den Enzymen β -glucosidase und β -galactosidase; bereits 14 Jahre später erfolgten die ersten Beladungen mit Arzneimitteln [55]. Seitdem sind zahlreiche Beladungsverfahren im Bereich der erythrozytären Trägersysteme etabliert worden, um sie für verschiedenste Substanzen nutzbar zu machen. Heutzutage dehnt sich das Beladungsspektrum auf diverse Arzneistoffe, Nanopartikel, Magnetite, Peptide, Proteine, Enzyme, Nukleotide und Vakzine aus [56, 57]. **Tabelle I-2** gibt einen Auszug über bisher inkorporierte Arzneistoffe und deren Anwirkungsgebiete. Obwohl theoretisch jede Substanz in RBCs inkorporiert werden kann, eignen sich insbesondere solche für die Beladung, die ausreichend wasserlöslich sind, unempfindlich gegenüber Inaktivierung im Zellinneren und keine Interaktion mit der Zellmembran eingehen [56]. Dabei kann der Arzneistoff abhängig von seinen physiko-chemischen Eigenschaften entweder über Liganden (ir)re-versibel an die Zelloberfläche gebunden oder bevorzugterweise im Zellinneren eingeschlossen werden. Dies bietet folgende Vorteile: (a) Schutz vor Abbau, (b) Möglichkeit des Drug Targetings, (c) verzögerte Wirkstofffreisetzung und (d) Reduzierung von Nebenwirkungen [56, 58, 59].

Zur intrazellulären Beladung von RBCs stehen drei Verfahren zur Verfügung [56]:

1. auf hypotone Hämolyse basierende Verfahren
 - a. hypotone Verdünnung (*hypotonic dilution*)
 - b. hypotone Dialyse (*hypotonic dialysis*)
 - c. hypotones Vorschwellen (*hypotonic preswelling*)
2. Elektroporation
3. chemische Membranzerstörung

Die am häufigsten verwendete Methode ist die hypotone Hämolyse, die erstmals von Dodge 1962 beschrieben wurde. Sie macht sich die Eigenschaft von Erythrozyten zunutze bei reduziertem osmotischen Druck das Volumen um bis zu 25 - 50% zu vergrößern [60, 61]. Durch die dabei entstehenden Poren von 200 - 500Å kann das Hämoglobin ungehindert entweichen (Hämolyse) und die zu inkorporierende Substanz aufgenommen werden. Sobald der Tonizitätsgradient wieder ausgeglichen wird, fusionieren die Membranbruchstücke (*resealing*) und bilden eine intakte Membran um die aufgenommene Substanz herum [62]. Basierend auf dieser Methode existieren drei Varianten, die sich in Bezug auf die Einschlusseffizienz und Zirkulationseigenschaften der RBCs unterscheiden (**siehe 1. a-c**). Unter ihnen ist die hypotone Dialyse die vorteilhafteste Methode, da biochemische und physiologische Eigenschaften der RBCs gewahrt bleiben und darüberhinaus die höchste Substanzeinschlussrate (30 - 50%) und Zellrecovery (70 - 80%) erzielt wird [50, 61]. Beschrieben wurde diese Methode erstmals 1959 von Klibansky; 1977 wurde sie von Deloach *et al.* als Beladungsverfahren für Erythrozyten etabliert [63]. Eine weitere Methode ist das hypotone Vorschwellen, bei dem durch schrittweise Erniedrigung der Tonizität ebenfalls ein zellschonender Wirkstoffeinschluss in die Erythrozyten mit einer exzellenten Zellrecovery erreicht wird. Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Verfahren weist die hypotone Verdünnungsmethode neben einer relativ niedrigen Substanzeinschlussrate auch eine kurze Zirkulationsdauer auf, da die RBCs aufgrund der extensiven Membranschädigung schnell vom retikulo-endothelialen System (RES) eliminiert werden [56, 61].

Eine weitere Methode ist die Elektroporation, bei der durch Anlegen eines elektrischen Impulses mikroskopisch kleine Löcher in die Zellmembran erzeugt werden; sie wird jedoch eher selten zur Medikamentenbeladung angewendet [50].

Neben der Beladung ist die Freisetzung des Arzneistoffs aus den RBCs von ebenso großer Bedeutung. Die Freisetzungsgeschwindigkeit wird insbesondere von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der eingeschlossenen Substanz bestimmt. Unterschieden werden (a) Diffusion durch die RBC Membran z.B. Phenytoin, Dexamethason; (b) Ruptur der Membran z.B. Gentamicin, Enalapril und (c) Mischform, abhängig von Polarität und Molekülgröße kann das Medikament langsam durch die Membran diffundieren, Restmengen werden bei Ruptur freigesetzt z. B. Erythropoeitin, Isoniazid [56].

Eingeschlossene Substanz	Methodik	Anwendungsbereich
Amikacin	Hypotone Verdünnung	Tumor
Rubomycin	-	Tumor
Daunomycin	Hypotone Verdünnung, chemisch	Leukämie
Actinomycin D	Hypotone Verdünnung	Tumor
Adriamycin	Hypotone Dialyse	Tumor
Etoposid	Hypotone Dialyse	Tumor
Bleomycin	Hypotone Verdünnung	Tumor
Ara-C	Hypotone Verdünnung, Dialyse	Leukämie
Methotrexat	Hypotones Verdünnung, Elektroporation	Tumor
L-Asparaginase	Hypotone Dialyse, hypotone Verdünnung	Leukämie, Tumor
Indolyl-3alkan- α -hydroxylase	Hypotone Verdünnung	Tumor
Interleukin-2	Hypotone Dialyse, Elektroporation	Tumor
Gentamicin	Hypotone Dialyse	Infektion
Metronidazol	Hypotones Vorschwellen	Infektion
Isoniazid	Hypotones Vorschwellen	Tuberkulose
Primaquinphosphat	Hypotones Vorschwellen	Malaria
Glutathion	Hypotone Dialyse	Retrovirale Infektion
9(2-phosphonylmethoxyethyl)Adenin	Hypotone Dialyse	Retrovirale Infektion
Anti-sense PNA	Hyptonone Dialyse	Retrovirale Infektion
K48R ubiquitin	Hypotone Dialyse	Immunomodulation
Propranolol	Hypotones PVorschwellen	Hypertonus
Enalapril	Hypotones Vorschwellen	Hypertonus
Salbutamol	Hypotone Verdünnung	Asthma
Dexamethason	Hypotone Dialyse	COPD, Zystische Fibrose
γ -Aminolevulinatdehydratase	Hypotone Verdünnung	Porphyrie
Arginase	Hypotone Verdünnung und Dialyse	Hyperargininämie
Factor IX	Hypotone Dialyse	Hemophilie B
Desferrioxamin	Hypotone Verdünnung, Dialyse	RES/Hämosiderose
Erythropoietin	Hypotone Dialyse	Anämie
Insulin	Hypotone Dialyse	Diabetes mellitus

Tabelle I-2: Zusammenstellung von in Erythrozyten eingeschlossener Wirkstoffe, Peptide, Enzyme und deren Anwendungsspektrum [50, 56, 57, 64]

I.3.3 Targeting von RBCs

Wie bei anderen angewendeten Trägersystemen z. B. Liposomen und Nanopartikeln ist Targeting auch bei RBCs ein wichtiger Aspekt des DDS. Dabei kann das Targeting entweder durch Phagozyten (RES-targeting) oder andere, nicht phagozytäre Strukturen (Non-RES targeting) erfolgen [56].

Im RES-targeting macht man sich die Eigenschaft von Leukozyten zunutze, alternde Erythrozyten infolge des Verlusts ihrer Membranintegrität und Flexibilität zu erkennen und diese zu phagozytieren. Dabei führen Verschiebungen in der Membranzusammensetzung, vor allem die extrazelluläre Anreicherung von Phospholipiden wie Phosphatidylserine (PS), zur phagozytären Erkennung der RBCs. Ähnliche Membranveränderungen werden im Rahmen des Beladungsverfahrens hervorgerufen; die größten strukturellen Veränderungen werden bei der hypotonen Verdünnungsmethode beobachtet, während die hypotone Dialyse und das sogenannte Vorschwellen relativ membranschonend sind [56]. Somit kann in Abhängigkeit vom Grad der Membranschädigung beeinflusst werden, ob der Wirkstoff innerhalb weniger Minuten oder Stunden *via* Phagozytose aus der Zirkulation eliminiert wird oder über einen längeren Zeitraum zirkuliert. Leber und Milz sind die primären Akkumulationsorte der Arzneistoffträger. Dies macht man sich insbesondere bei der Therapie von Lebertumoren [65], parasitären Erkrankungen [56, 65] und lysosomalen Speichererkrankungen zunutze [56]. Darüberhinaus sind Methoden etabliert worden, um das RES-targeting zu intensivieren. Dazu gehören u. a. die Applikation von diversen Membranstabilisatoren wie z. B. Glutaraldehyd, Bis(sulphosuccinimidyl)suberat und 3,3'-Dithiobis(sulphosuccinimidyl)-propionat, die eine Verringerung der RBC Verformbarkeit bewirken sowie die Beschichtung mit verschiedenen Antikörpern [56].

Neben dem RES können auch Organe außerhalb des RES mittels RBCs gezielt angesteuert werden. Dazu stehen drei unterschiedliche Methoden zur Verfügung: 1. Co-Einschluss von paramagnetischen Partikeln in RBCs (magnetisches Targeting); 2. Anwendung von Ultraschallwellen; und 3. spezifische Antikörper an der Erythrozytenmembran wie z. B. α -Thy-1.2 zum Targeting der zytotoxischen T-Zellen [56]. RBCs, die neben einem Wirkstoff auch paramagnetische Partikel wie Magnetite beinhalten, können durch ein äußeres Magnetfeld an die gewünschten Stellen im Körper dirigiert werden. Erfolgreich angewandt wurde dieser Effekt bereits bei Therapie von entzündlichen Geschehen mit Diclofenac und Ibuprofen sowie bei der Therapie von Tumoren [56, 65].

II Aufgabenstellung

Das Spektrum der humanen *C. albicans* Kolonisierung reicht von symbiotischer Koexistenz bis hin zu schwerwiegenden, systemischen Infektionen, die insbesondere bei immungeschwächten Patienten mit einer hohen Mortalität verbunden sind. Dabei spielen die Zellen des angeborenen Immunsystems, MNC und PMN, eine bedeutende Rolle in der Begrenzung und Ausbreitung einer fungalen Infektion. Das Polyen-Antibiotikum AmB gehört zum therapeutischen Standard, das jedoch trotz hoher Effektivität aufgrund eines fulminanten Nebenwirkungsprofils im klinischen Bereich nur noch eingeschränkt angewendet wird. Stattdessen werden AmB Analoga wie AmB Ester und Liposomen sowie neuere antifungale Substanzen eingesetzt, die oft weniger effizient oder sehr kostspielig sind. Daher ist die Entwicklung alternativer AmB *Delivery* Strategien dringend erforderlich.

Erythrozyten scheinen aufgrund ihrer vielseitigen *Carrier*-Eigenschaften zum Transport von schwerlöslichen Substanzen wie AmB geeignet. Mehr noch, Targeting der AmB transportierenden RBCs zu den Leukozyten mit anschließender intrazellulärer Aufnahme stellt einen idealen Ansatz zur gezielten Verstärkung der intra- und extrazellulären Pilzabwehr sowie zur Erhöhung der Wirkstoffakkumulation an den Orten der aktiven Infektion dar – im Sinne eines trojanischen Pferdes.

Hauptziele der vorliegenden Arbeit sind daher zum einen die Untersuchung von Erythrozyten als *drug carrier* für schwerlösliche Arzneistoffe am Beispiel von AmB und zum anderen die Beurteilung des phagozytären Systems als Arzneistofftransporter und -reservoir.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Methodik der AmB-Inkorporierung in Erythrozyten etabliert werden. Daneben sollte eine zusätzliche Beladung mit Magnetit weitere Targetingmöglichkeiten schaffen, die die Möglichkeit eines therapeutischen Monitoring mittels MRTs eröffnet.

Im zweiten Teil wird die Effizienz der phagozytären Aufnahme der AmB beladenen RBCs sowie deren Wirkstofffreisetzung und intra- bzw. extrazelluläre antifungale Potenz untersucht. Darüber hinaus werden kurz- und langfristige Auswirkungen der intrazellulären AmB-Akkumulation auf die Funktionalität der MNC und PMN beurteilt.

III Material und Methoden

III.1 Amphotericin B-Nanosuspension (AmB-NS)

Die AG Prof. Dr. Müller (Institut für Pharmazie, Freie Universität, Berlin) stellte eine 1%ige Amphotericin B-Nanosuspension (AmB-NS) mit einer Teilchengröße von durchschnittlich \varnothing 65 nm und einem Polydispersitätsindex von 0.454 als Ausgangsbasis für die Experimente zur Verfügung.

Unter Nanosuspensionen (NS) versteht man kolloiddisperse fest-flüssig Systeme mit Partikelgrößen im Submikronbereich. Die in dieser Arbeit verwendete AmB-NS wurde mithilfe der im Patent DE 10 2005 017 777.8 beschriebenen rekombinanten Technologie hergestellt [66]. Dazu wurden 400 mg pulverförmiges AmB in 10 g DMSO gelöst, schockgefroren und danach lyophilisiert (Christ Alpha, Osthall am Harz, Deutschland). Die gewonnenen Lyophilisate wurden in 40 g einer 1% igen wässrigen Gallsäurelösung aufgenommen und anschließend mit 8 Homogenisierungszyklen bei 1500 bar weiterbehandelt, wobei die Arzneistoffkristalle von den Kavitationskräften [67], Scherkräften [68] sowie durch Kollisionen der Arzneistoffpartikel untereinander zerkleinert werden. Die Reduktion der Partikelgröße trägt erheblich zur Verbesserung des pharmakokinetischen Profils von AmB bei, wodurch die Partikeloberfläche vergrößert, die Sättigungslöslichkeit bzw. die Lösungsgeschwindigkeit deutlich erhöht und Diffusionsvorgänge beschleunigt werden [69]. Um eine spätere Aggregation der AmB-Kristalle zu verhindern wurde die NS zusätzlich mit Surfactant stabilisiert und so eine Haltbarkeit von einem Monat bei 4°C Lagertemperatur erreicht [70].

III.2 Magnetitdispersion

Die in dieser Arbeit verwendete Magnetitdispersion (*sog. Ferrofluid, magnetic fluids*) wurde von Dr. rer. nat. Norbert Buske bezogen.

Dabei handelt es sich um sogenannte *superparamagnetic iron oxide particles* (SPIONs), d. h. zitratbeschichtete superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (Fe_3O_4) von \varnothing 5-15 nm Größe, die mit einem zentralen Kalium-Ion ausgestattet sind [71]. Für die Experimente wurde Magnetit in einer 4% igen Volumenkonzentration mit einem pH von 7.2 verwendet.

III.3 Verwendete Substanzen, Chemikalien und Messlösungen

In **Tabelle III-1** wird die Herkunft der verwendeten Substanzen, Farbstoffe und Testkits aufgelistet. Diese wurden unmittelbar vor den Experimenten wie in **Tabelle III-2** geschildert in entsprechenden Proben- bzw. Messlösungen frisch angesetzt.

<u>Chemikalien, Medien und Zusätze</u>	<u>Formel</u>	<u>Hersteller</u>
Acetonitril (ACN)	C ₂ H ₃ N	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat	C ₂ H ₇ NO ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Amphotericin B (AmB)	C ₄₇ H ₇₃ NO ₁₇	Fährhaus GmbH, Hamburg, Deutschland
Aqua destillata (Aqua dest.)	H ₂ O	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Buffer Solution, pH 4	-	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	-	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
FACS Lysing Solution®	-	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	-	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Histopaque 1119	-	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Histopaque 1077	-	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Methanol	CH ₃ OH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
3-(N-Morpholino)-Propanesulfonische Säure (MOPS)	C ₇ H ₁₅ NO ₄ S	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Natriumhydrogenkarbonat	NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Olivener Öl extravirgin, Lucece	-	LIDL Stiftung, Neckarsulm, Deutschland
PAGGS-M	-	Blutspende, Charité, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (PBS)	-	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	-	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Penicillin	R-C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₄ S	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
RPMI 1640 (mit L-Glutamin, ohne Bikarbonat)	-	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Streptomycin	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
<u>Farbstoffe</u>		
Albumin Fluoresceinisothiocyanat, bovin (FITC-BSA)	C ₂₀ H ₁₂ O ₅	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
5-(6)-Carboxyfluorescein SE (5,6 FAM SE)	C ₂₅ H ₁₅ NO ₉	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Trypan Blau, Color Index 23850	C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
<u>Testkits</u>		
Annexin V-FITC Test®	-	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
PhagoBurst®	-	Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland
Phagotest®	-	Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland

Tab. III-1: Herkunft der verwendeten Chemikalien, Farbstoffe und Testkits

Proben- und Messlösungen	Zusammensetzung
Erythrozyten-Lysepuffer	5mM Na ₂ HPO ₄ / 5mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0, 20 mOsm
Flüssignährmedium I	RPMI 1640 mit MOPS auf pH 7.0 titriert
Flüssignährmedium II	DMEM in Aqua bidest. lösen, versetzt mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin; mit NaHCO ₃ auf pH 7.4 titrieren; sterile Filtration
Lysing Solution	FACS Lysing Solution® 1:10 mit Aqua dest. verdünnen
RP-HPLC Methodik	
AmB-Stammlösung	1g AmB in 1000 ml Lösung aus 49.5% ACN / 49.5% CH ₃ OH / 1% DMSO (v/v/v)
Zell-Fällungsreagenz	49.5% ACN / 49.5% CH ₃ OH / 1% DMSO (v/v/v)
Laufmittel	66% 0.05M Ammoniumacetat (pH 6.4) / 33% ACN (v/v)
Spülösung	50% ACN / 50% CH ₃ OH (v/v)
Farbstofflösungen	
FITC-Albumin-Zellmarkierung	10 mg/ml FITC-BSA in Aqua dest.
5-(6) FAM SE-Zellmarkierung	1 µmol/ml 5-(6) FAM SE in DMSO
PI-Vitalitätsnschweis	2 mg/ml Propidiumiodid in PBS
Quenching Solution	250 µg/ml Trypanblau gelöst in Buffer Solution (pH ≈4)

Tab. III-2: Verwendete Proben- und Messlösungen

III.4 Verwendete Gerätschaften und Instrumentarien

Die für die Experimente notwendigen Gerätschaften sind in **Tabelle III.3** dargestellt.

Art	Hersteller
Mikro 22R, 20160 x g	Hettich GmbH & CoKG, Tuttlingen, Deutschland
Labofuge 400, 2754 x g	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Advia 120	Bayer HealthCare, Fernwald, Deutschland
Osmomat 030-D	Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland
pH Meter 766 Calimatic	Knick GmbH, Berlin, Deutschland
Laborwaage Explorer	Ohaus GmbH, Giessen, Deutschland
Filteranlage Micon 10 ml, 350 ml	Millipore Corporation, Bredford MA, USA
Membranfilter 0.8/1.2 µm, 90 mm	Millipore Corporation, Bredford MA, USA
Inkubator	Memmert GmbH & CoKG, Schwabach, Deutschland
CLSM 510 meta	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
FACSCanto	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
HPLC-Shimadzu-Anlage LC-AD	Kontron-Instruments, Neufahrn, Deutschland

Tab. III-3: Herkunft der verwendeten Geräte

III.5 Grundlagen der mikrobiologischen Methodik

III.5.1 *Candida albicans*

Der verwendete *Candida albicans* (*C. albicans*) Referenzstamm ATCC 10231 wurde vom Institut für Mikrobiologie, Charité Campus Mitte (Berlin) bezogen. Ein Auszug der Charakteristik des Stammes ist der **Tabelle III-4** zu entnehmen.

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) von AmB, die 50% (MHK₅₀) bzw. 90% (MHK₉₀) der Pilzzellen nicht überleben, wurde durch eine AmB-Verdünnungsreihe in DMSO von 0.008 bis 2 µg/ml ermittelt. Hierfür wurden 10⁶ KBE/ml (in PBS) in derselben Menge RPMI 1640 aufgenommen, mit der jeweiligen Wirkstoffkonzentration bestückt und anschließend 2 Stunden bei 35°C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 2 µg/ml Propidiumiodid (PI) als Marker für den zellulären Exitus versetzt (siehe III.8) und durchflußzytometrisch analysiert.

Acronyme	ATCC 10231; B 49904; CBS 6431; DSM 1386; IFO 1594; NIH 3147;
Isolationssubstrat	humane Bronchomykose [72]
Entdeckung	Wright > C.W. Emmons > NIH > ATCC > B > 1988 IHM

Tab. III-4: Charakteristik von *C. albicans* ATCC 10231

III.5.2 Stammhaltung

Die Anzüchtung und Aufbewahrung des Referenzstammes folgte den Empfehlungen des *International Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the NCCLS* [73]. Als geeignetes Medium wurden Sabouraud-Dextrose-Agarplatten (SDA-Platten) gewählt, die ebenfalls vom Institut für Mikrobiologie, Charité Campus Mitte bezogen wurden. Entsprechend der *NCCLS*-Empfehlungen erfolgte vor jedem Experiment die zweimalige Passage des Pilzstammes auf drei SDA-Platten, die für je 24 Stunden bei 35°C inkubiert wurden. Mit *C. albicans* bewachsene Agarplatten wurden im Kühlschrank bei 4°C für längstens 2 Wochen gelagert.

III.5.3 Opsonierung von *C. albicans*

5 *C. albicans* Kolonien wurden in ein steriles Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen (500 x g, 10 min, 4°C). Die Opsonierung erfolgte durch eine einstündige Inkubation der Keime in 25%igen humanem Serum in PBS (mit 0.133 g/l CaCl₂ und 0.1 g/l MgCl₂) bei 37°C. Anschließend wurde *C. albicans* dreimal mit PBS gewaschen (500 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellzahl auf 10⁶ KBE/ml eingestellt.

III.5.4 Labeling von *C. albicans* mit 5-(6)-FAM SE

Nach der Opsonierung wurden die Pilzzellen (10^6 KBE/ml) mit 5 ml 0.1 M NaHCO_3 -Puffer (pH 8.3) gewaschen und erneut zentrifugiert ($500 \times g$, 10 min, 4°C). Das Sediment (*C. albicans*) wurde in 1 ml 0.1 M NaHCO_3 -Puffer, versetzt mit $1 \mu\text{mol/l}$ 5-(6)-FAM SE, aufgenommen und unter geringer Agitation für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. 5-(6)-FAM SE ist ein grünfluoreszierender Farbstoff, der als lipophiler Succinimidylester die Zellmembranen leicht passieren kann ohne die zelluläre Vitalität zu beeinflussen. In der Zelle wird es durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert, so dass es die Zelle nicht mehr verlassen kann. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Probe zentrifugiert ($1000 \times g$, 5 min, 4°C) und dreimal mit PBS gewaschen. 5-(6)-FAM SE markierte *C. albicans* standen jetzt für den Candida-Phagozytose-Test zur Verfügung (siehe III.11.2).

III.6 Blutentnahme

Das Blut wurde gesunden freiwilligen Spendern des Institutes für Transfusionsmedizin, Charité Campus Mitte nach den geltenden Qualitätsstandards abgenommen (SOP A-001/5, 2004). Zur Blutentnahme wurden handelsübliche Venenpunktionsbestecke der Firma Sarstedt verwendet: EDTA K-Monovetten Systeme (1.6 mg EDTA/ml) und NH_4 -Heparin-Monovetten Systeme (15 IE Heparin/ml). Es wurden jeweils 10 ml EDTA-Blut, das ausschließlich zur Erythrozytenisolierung genutzt wurde sowie 20 ml NH_4 -Heparin-Vollblut zur Leukozytenisolierung bzw. Funktionstestung gewonnen. Die Blutproben wurden anonymisiert und innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet.

III.7 Zellseparationen

III.7.1 Erythrozytenisolierung

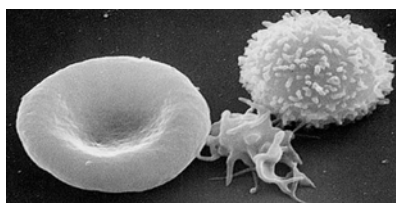


Abb. III-1: Erythrozyt, Thrombozyt, Leukozyt (von links nach rechts) [74]

Die humanen Erythrozyten wurden aus EDTA-Vollblut isoliert. Dazu wurde das Blut bei $2100 \times g$ für 10 Minuten unter konstanten Temperaturbedingungen von 20°C zentrifugiert. Anschließend ist das Plasma und der *buffy coat* vorsichtig von den darunter liegenden Erythrozyten entfernt worden. Nachfolgend wurden die Erythrozyten mit PBS (10 mM , pH 7.4) im Verhältnis 1:10 dreimal gewaschen und unverzüglich gemäß Kapitel III.9 weiterverarbeitet.

III.7.2 Isolierung von humanen Monozyten (MNC) und Granulozyten (PMN)

1974 beschrieben English und Anderson eine auf Boyums Publikationen von 1968 basierende erweiterte Dichtgradientenzentrifugierungsmethode zur gleichzeitigen Isolierung von mononukleären und granulozytären Zellen aus peripherem Blut [75]. Die dabei zur Verwendung kommenden Lösungen bestehen aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat, eingestellt auf eine Dichte von 1.077 ± 0.001 g/ml und 1.119 ± 0.001 g/ml. Während der isopyknischen Zentrifugation werden Erythrozyten und Granulozyten durch die Polysaccharose aggregiert und sedimentieren schneller als mononukleären Zellen und Lymphozyten (**Abb. III-2**).

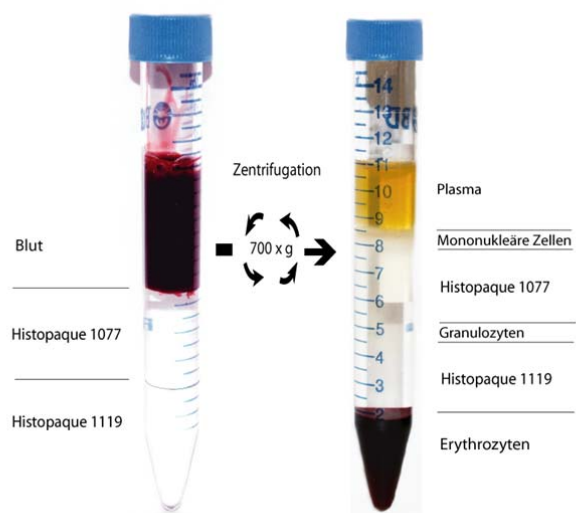


Abb. III-2: Dichtgradientenisolierung

Es wird ein doppelter Gradient durch Schichtung gleicher Volumina von Histopaque 1077 über Histopaque 1119 gebildet. Nach einer 35 minütigen Zentrifugation bei 700 x g kommt es zur Auftrennung der Zellschichten. Zellen der Granulozytenreihe sind in der 1077/1119-Grenzfläche zu finden, während sich mononukleäre Zellen, Lymphozyten und Thrombozyten in der Plasma/1077-Grenzfläche befinden.

3 ml Histopaque 1119 wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und mit 3 ml Histopaque 1077 überschichtet. Anschließend wurden 5 ml heparinisiertes, unverdünntes Vollblut über den doppelten Gradienten geschichtet und unverzüglich zentrifugiert (700 x g, 35 min, 18°C). Nach der Zentrifugation konnten die leukozytären Zellpopulationen als weißliche Intermediärschicht mit einer 5 ml Pipette aus der Dichtgradientenschicht vorsichtig aspiriert und in PBS überführt werden. Dabei waren die Zellen der Granulozytenreihe in der 1077/1119-Grenzfläche zu finden, während mononukleäre Zellen, Lymphozyten und Thrombozyten an der Plasma/1077-Grenzfläche lokalisiert waren (**Abb. III-2**). Als nächstes wurden die PMN von den verbliebenen RBCs separiert. Dazu wurde die Probe aufgrund der geringeren erythrozytären osmotischen Stabilität für 30 Sekunden mit 9 ml Aqua dest. lysiert und nachfolgend zur Wiederherstellung der physiologischen Verhältnisse mit 1 ml 10fach PBS (300 mOsm/kg H₂O, pH 7.4) versetzt. Hiernach wurden die gewonnenen PMN und MNC dreimal mit 10 ml PBS gewaschen (250 x g, 10 min) und in selbigem resuspendiert. Beide Populationen wurden auf 10⁶ Zellen/ml eingestellt und die Vitalität überprüft (siehe Kapitel III.8).

III.8 Vitalitätsbestimmung und Zellzählung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 50 μl einer Probe in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mit einem 63x Phasenkontrast LD-Objektiv unter dem CLSM 510 meta bestimmt. Bei gleichmäßiger Verteilung wurde der Mittelwert aus 10 Feldern berechnet und auf das Volumen der Zählkammer bezogen (**Gl. 1**).

$$\frac{\text{Erythrozyten}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{Anzahl gezählter Erythrozyten} \times \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate} \times \text{Volumen}_{\text{Quadrat}}} \quad [\text{Gl. 1}]$$

Propidiumiodid (PI) ist ein stark basischer Nukleinsäureinterkalator, der zur Bestimmung avitaler Zellen genutzt wird, da er die Membran intakter Zellen nicht durchdringen kann [76]. Ist die Membran jedoch defekt, interkaliert PI in die helikale Struktur der DNA und kann bei ca. 690 nm zur Emission gebracht werden. Dazu wurden die Proben mit 2 $\mu\text{g/ml}$ PI (in PBS) versetzt, soweit nicht anders in den entsprechenden Kapiteln geschildert, und nach einer 10 minütigen Inkubation durchflußzytometrisch analysiert (siehe Tabelle III-6).

III.9 *in-vitro* Beladung der RBC mit AmB-NS und Magnetit

III.9.1 Grundlagen der Beladung – Herstellung von *Ghosts*

„*Ghosts*“ beschreiben das nach der Hämolyse zurückbleibende, farblose Gerüst eines RBC ohne zytoplasmatischen Inhalt. Die am häufigsten eingesetzte Methode zu deren Präparation ist die Lyse in hypotonem Medium. Bei der Lyse rupturiert die Erythrozytenmembran und es entstehen Poren von ca. 500 Å Durchmesser, aus denen das Hämoglobin ungehindert entweichen kann. Sobald der Tonizitätsgradient wieder ausgeglichen wird, fusionieren die Membranbruchstücke zu sogenannten *Ghost*-Vesikeln (*Resealing*) [77]. **Abb. III-3** zeigt die Basisschritte beim Beladungsverfahren der RBC, die im weiteren Text näher erläutert werden.

Die Präparation von *Ghosts* erfolgte in modifizierter Form nach Dodge [60]. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt, alle verwendeten Puffer auf 4 °C vorgekühlt. Zuerst wurde das gewaschene Erythrozytenkonzentrat im Verhältnis 1:25 in Hämolysepuffer (5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) resuspendiert und durch eine fünfminütige Agitation hämolysiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (21160 x g, 15 min, 4°C) wurde der Überstand dekantiert, und das entstandene Pellet erneut lysiert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt, bis

hämoglobinfreie weiße *Ghosts* entstanden, die als Matrix für die im Folgenden beschriebenen Beladungen mit AmB-NS, Magnetit und FITC-BSA dienen.

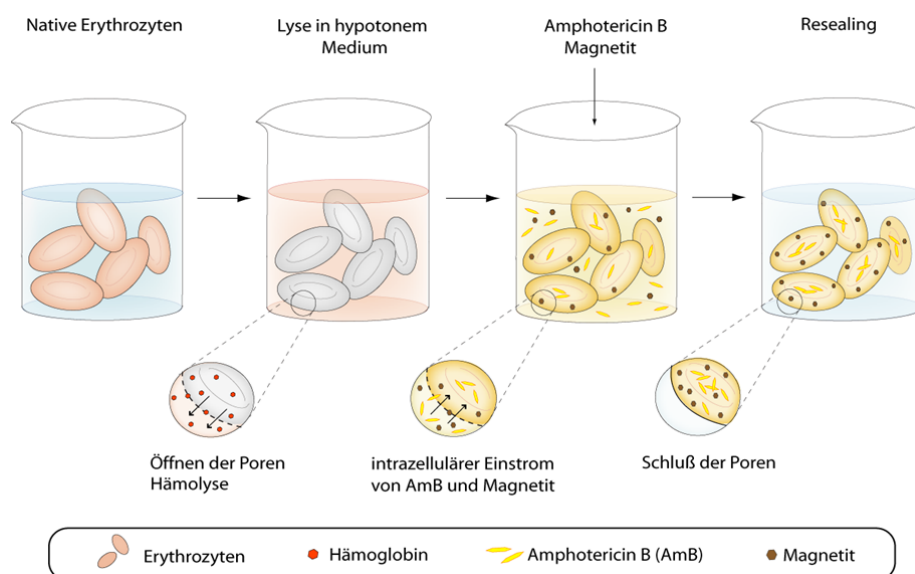


Abb. III-3: Übersicht zur verwendeten Beladungsmethodik

Bei der Lyse der RBCs in hypotonem Medium (5mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8) reißt die Membran auf und es entstehen Poren, durch die Arzneistoffe und andere Substanzen in RBC inkorporiert werden können.

III.9.2 Beladung der RBC mit AmB-NS

Zur AmB-Beladung wurden 500 μL *Ghost*-Sediment mit 500 μL AmB-NS (Volumenverhältnis 1:1) vermischt und für 1 Stunde bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Das anschließende *Resealing* erfolgte bei 37°C, um einen stabilen AmB-Einschluss in den RBCs zu gewährleisten. Zur Entfernung des freien AmBs von den AmB-NS beladenen Erythrozyten (AmB-NS-RBCs) wurden die Proben aufgrund der besseren AmB-Lipidlöslichkeit und der destabilisierenden Wirkung von wässrigen und elektrolythaltigen Lösungen dreimal mit 2 ml Olivenöl gewaschen (21160 x g, 15 min). Die Lagerung der AmB-NS-RBC erfolgte in PAGGS-M, das aus Phosphat, Adenin, Guanosin, Glukose und Mannitol besteht und häufig als Additivlösung für Erythrozyten verwendet wird.

III.9.3 Fluoreszenzmarkierung der AmB-NS-RBCs mit FITC-BSA

Die Markierung der AmB-NS-RBC mit FITC-BSA erfolgte im Anschluss an die einstündige Inkubation mit AmB (4°C) unter Aussparung des *Resealing*-Schrittes. Nach der Waschung der AmB-NS-RBC in kaltem Olivenöl (21160 x g, 15 min) wurde das Zellsediment umgehend mit

10 mg/ml FITC-BSA (in Aqua dest.) versetzt und eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert, gefolgt vom einstündigen *Resealingschritt* bei 37°C. Abschließend wurden die mit FITC-BSA markierten AmB-NS-RBC (FITC-BSA-AmB-NS-RBC) dreimal in PBS gewaschen (21160 x g, 15 min) und ebenfalls in PAGGS-M resuspendiert.

III.9.4 Kombinierte Beladung mit Magnetit

Sollten die AmB-NS-RBCs zusätzlich mit Magnetit beladen werden, so schloss sich dieser Schritt analog zur FITC-BSA-Markierung direkt nach der AmB-Inkubation an. Dazu wurden die AmB-NS-RBCs mit einer 10%igen Magnetit-PBS Lösung (Endkonzentration: 0.4% Magnetit) für eine Stunde bei 4°C inkubiert und danach entsprechend der **Abbildung III-3** für eine weitere Stunde auf 37°C temperiert (*Resealing*). Als nächstes wurde das überschüssige Magnetit durch Filtration (Porengröße 0.8 µm) entfernt. Der Filtrerrückstand (Magnetit-AmB-NS-RBC) wurde bei 3500 x g für 15 Minuten zentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurde die Magnetit-Beladung der Zellen mittels MRT verifiziert.

III.9.5 Bestimmung der *in-vitro* Effektivität der AmB-NS-RBCs

Dieser durchflußzytometrische Test zum Nachweis der therapeutischen Effektivität der AmB-NS-RBC basiert auf Publikationen von Chaturvedi *et al.* [78]. AmB-NS-RBCs wurden mit 500 µl DMSO versetzt und für 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um das eingeschlossene AmB freizusetzen. Danach wurde die Probe zentrifugiert (20000 x g, 15 min) und der abgehobene Überstand mit RPMI 1640 1:1 verdünnt. Zur Herstellung der Pilzsuspension wurden zuvor vorbereitete 10⁶ KBE *C. albicans* pro ml mit 5 ml 0.85% NaCl versetzt. Im Folgenden wurden 0.5 ml der Pilzsuspension mit 0.5 ml des Überstandes (in RPMI 1640) vermischt und bei 35°C für 2 Stunden inkubiert. Die Wachstumskontrolle enthielt 0.5 ml reines RPMI 1640 ohne AmB, die Negativkontrolle ausschließlich Hitze-getötete Pilze. Am Ende der Inkubation wurden 200 µl jeder Probe mit 200 µl 25 mM Natriumdesoxycholat und 2 µg/ml PI (in PBS) als DNA-Farbstoff versetzt, anschließend kurz durchmischt und durchflußzytometrisch vermessen (siehe Tabelle III-6).

III.10 Phagozytose der AmB-NS-RBC und AmB Freisetzung

Aufgrund der zentralen Rolle im Immunsystem stellen Leukozyten attraktive Zielzellen für ein Arzneistofftargeting dar. Dabei sollen die phagozytierenden Zellen nicht nur als

Transportvehikel in verschiedene Körperregionen vordringen sondern dienen auch als Arzneistoffreservoir [79]. Zu diesem Zweck sollte untersucht werden, ob die Menge leukozytär aufgenommener AmB-NS-RBCs suffizient ist, um eine langfristige Inhibition von *C. albicans* zu erreichen.

III.10.1 *In-vitro* Beladung der Leukozyten mit AmB-NS-RBCs

10^6 Zellen/ml MNCs und PMNs wurden mit dem jeweiligen Zellsubstrat (FITC-BSA-AmB-NS-RBC, *E.coli* (=Kontrolle)) in einem Verhältnis von 1:25 ($2.5 \cdot 10^7$ /ml) bei 37°C für insgesamt 4 Stunden inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 0,25, 1, 2, 3 und 4 Stunden wurden jeweils 100 µl Probe entnommen und anschließend mit 2 ml kalter Lysingsolution® versetzt. Die Lysingsolution® lysierte aufgrund ihrer geringen Osmolarität kontaminierende RBCs, während MNC, PMN und Lymphozyten durch 2%iges Paraformaldehyd inaktiviert wurden. Nach 20 minütiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 250 x g für 5 Minuten zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das letzte Pellet wurde in 300 µl PBS aufgenommen und die Effizienz der Phagozytose durchflußzytometrisch bestimmt.

Nach Ablauf der 4 stündigen Inkubation bei 37°C wurden freie, nicht phagozytierte AmB-NS-RBCs durch dreimalige Differentialzentrifugation (250 x g, 5 min) mit anschließender Waschung in 10 ml PBS entfernt. Abschließend wurden die gewonnenen, nun mit AmB-NS-RBC beladenen MNCs (AmB-NS-RBC-MNCs) und PMNs (AmB-NS-RBC-PMNs) in DMEM (mit 10% Hitze-inaktiviertem FCS, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml) mit einer Endkonzentration von 10^6 Zellen/ml aufgenommen und bei 36°C inkubiert.

III.10.2 Bestimmung der AmB-Freisetzungskinetik aus den Leukozyten

Die AmB Freisetzungskinetik wurde bei den AmB-NS-RBC-MNCs über 10 Tage und den AmB-NS-RBC-PMNs über 3 Tage analysiert. Der Medienwechsel erfolgte an jedem zweiten Tag unter sterilen Bedingungen. Dazu wurden die Proben zentrifugiert (500 x g, 10 min) und die Hälfte des Überstandes durch frisches Nährmedium ersetzt.

Zur Bestimmung der zellulären AmB-Freisetzung wurden je 200 µl der Gesamtprobe und zugehöriger Überstände täglich entnommen und, wie in **Kapitel III-12.1** ausführlich dargestellt, für die HPLC aufbereitet bzw. vermessen.

III.10.3 Bestimmung der *C. albicans* Wachstumsinhibition

AmB-NS-RBC-MNC und AmB-NS-RBC-PMN wurden nach deren Gewinnung mit *C. albicans* im Verhältnis 1:10 versetzt und bei 36°C inkubiert. Die Erfassung der fungalen Wachstumsinhibition erfolgte durch direkten Erregernachweis. Nach 3, 6, 12 und 24 Stunden, dann täglich über einen Zeitraum von 10 (für MNC) und 3 Tagen (für PMN) wurden 100 µl der Probe entnommen, und auf SDA-Platten ausgestrichen. Die beimpften SDA-Platten wurden für 24 Stunden bei konstanten 36°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auszählung der gewachsenen Kolonien im Vergleich zur Positivkontrolle.

Die intrazelluläre Pilzinhibition wurde gemäß Perfect *et al.* untersucht [80]. Dazu wurden je 100 µL AmB-NS-RBC-MNCs und -PMNs (je 10⁶ Zellen/ml) mit 100 µL opsonierten *C. albicans* Zellen (10⁷ KBE/ml) im Verhältnis 1:10 (*C. albicans* : Leukozyten) versetzt und 1 Stunde bei 37°C in 1 ml PBS (mit 0.133 g/l CaCl₂ und 0.1 g/l MgCl₂) inkubiert. Die Kontrolle enthielt native Leukozyten im gleichen Konzentrationsverhältnis. Nach der Inkubation wurden die extrazellulären, freien Hefen mittels dreimaliger Differentialzentrifugation (160 x g, 5 min, 4°C) und anschließender Waschung in PBS von den Leukozyten separiert. Als nächstes wurden die AmB-NS-RBC-Leukozyten in 0.2 ml RPMI 1640 resuspendiert und weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0.2 ml Aqua dest. 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert und je 50 µl der Probe, versetzt mit 50 µl PBS, auf SDA-Platten ausgestrichen. Nach der Inkubation der SDA-Platten bei 36°C für 24 Stunden, wurden die Pilzkolonien ausgezählt und die prozentuale Abtötungsrate nach **Gleichung 2** bestimmt:

$$\text{Intrazelluläre Abtötungskapazität [\%]} = \frac{\text{KBE Probe}}{\text{KBE Positivkontrolle}} * 100 \quad [\text{Gl. 2}]$$

III.11 Auswirkungen der intrazellulären AmB-NS-RBC Aufnahme auf die Immunzellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass AmB die phagozytäre Funktion beeinträchtigen kann [81, 82]. Eine funktionelle Beeinflussung der Immunzellen durch die AmB-NS-RBC-Aufnahme könnte somit zu erheblichen Konsequenzen für den humanen Organismus führen. Aus diesem Grund war es unumgänglich, *in-vitro* Funktionsuntersuchungen der Leukozyten direkt nach der Beladung sowie 24 Stunden später durchzuführen, um eventuelle Zellschäden zu erfassen.

III.11.1 Bestimmung der zellulären Vitalität und Apoptose

Die Plasmamembran vitaler Zellen ist asymmetrisch aufgebaut. Der Verlust dieser Asymmetrie durch die Translokation Phosphatidylserins (PS) von der Membraninnen- auf die Membranaußenseite findet in den frühen Phasen der Apoptose statt und dient als Marker für die zelluläre Vitalität [83].

Annexin-V (AnxV), ein Ca^{2+} -abhängiges Protein (35 - 36 kDa) mit hoher Affinität für PS, ermöglicht die Detektion apoptotischer Zellen mittels eines FITC-Fluoreszenzfarbstoffs [84]. Durch die Zugabe von PI, das ebenso wie AnxV intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann, erlaubt diese Doppelfärbung eine Differenzierung zwischen vitalen (AnxV-PI-), apoptotischen (AnxV+PI-) und nekrotischen (AnxV+PI+) Zellen (**Abb. III-4**).

Die AnxV-Markierung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Sigma und schloss sich direkt an das erythrozytäre und leukozytäre Beladungsverfahren an. Dabei wurden die AmB-NS-RBC, leere RBC sowie AmB-NS-RBC-MNC und -PMN mit einem calciumhaltigen Bindungspuffer auf ein Zellverhältnis von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 500 μl jeder Probe mit 5 μl Annexin-V-FITC-Färbelösung versetzt. Ansätze, die phagozytäre Zellen enthielten, wurden zur Anfärbung der DNA zusätzlich mit 10 μl Propidiumjodidlösung vermischt. Nach einer 10 minütigen lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben unverzüglich im Durchflußzytometer analysiert.

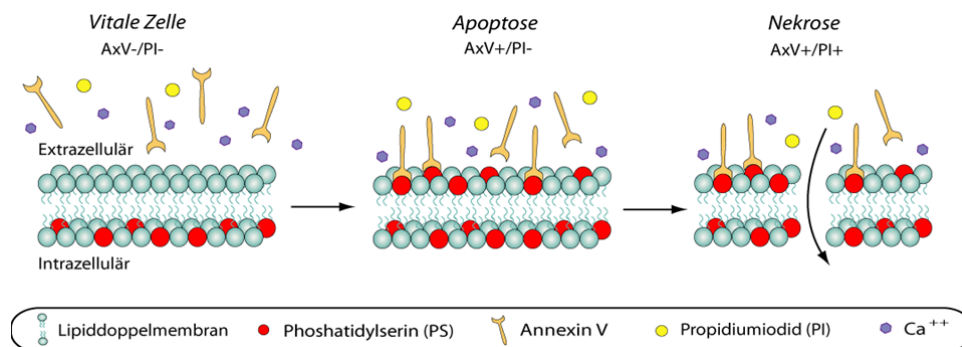


Abb. III-4: Annexin V-Testprinzip

III.11.2 Beurteilung der phagozytotischen Aktivität

Die Erfassung der phagozytotischen Aktivität der AmB-NS-RBC-MNC und AmB-NS-RBC-PMCs erfolgte in modifizierter Form nach Busetto *et al.* [85]. Opsonierte *C. albicans* ($10^6/\text{ml}$) wurden mit 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-(6)-FAM-SE gemäß Kapitel III.5.4 markiert. Danach wurden 5-(6)-

FAM SE-markierte *C. albicans* Zellen im Verhältnis 10:1 mit AmB-NS-RBC-MNC und -PMN bei 37°C in PBS (mit 0.133 g/l CaCl₂ und 0.1 g/l MgCl₂) für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde 200 µl Probe mit derselben Menge eiskaltem Trypanblau 250 mg/ml (in 0.1 M Zitratpuffer, pH 4.0) versetzt und abschließend im Durchflusszytometer analysiert.

III.11.3 Beurteilung des oxidativen Burst

Die Produktion von Sauerstoffradikalen ist für die Immunabwehr essentiell. Dabei bilden die Immunzellen mittels einer NADPH-Oxidase Superoxidanionen (O₂⁻), die zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) dismutieren. Die Bildung dieser Sauerstoffradikale kann im Durchflusszytometer durch die Oxidation von nichtfluoreszierendem Dihydrorhodamin 123, das frei in die Zellen permeiert, zu grün fluoreszierendem Rhodamin 123 verfolgt werden (Abb. III-5) [86].

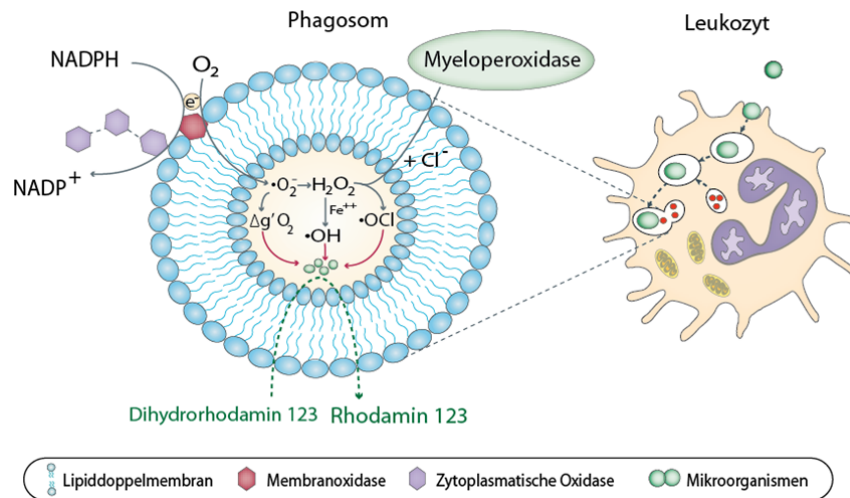


Abb. III-5: Bursttest Prinzip

In Anlehnung an das Protokoll des Phagoburst-Tests® wurden 100 µl AmB-NS-RBC-MNC und -PMN (je 10⁶ Zellen/ml in Flüssignährmedium II) mit jeweils 20 µl einer unverdünnten, auf 4°C gekühlten, opsonierten *Candida*-Suspension (10⁹ KBE/ml) versetzt. In einem Vorversuch wurde die Pilzkonzentration auf eine native granulozytäre Burstaktivität von 50-60% eingestellt, um sowohl eine Beurteilung der Stimulation als auch der Suppression zu ermöglichen. Den Kontrollansätzen wurden anstelle der *C. albicans*-Suspension jeweils 20 µl der Waschlösung bzw. Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) und Phorbol 13-Myristat 12-Acetat (PMA) als Stimuli beigemischt. Alle Ansätze inkubierten 20 min bei 37 °C im geschlossenen Wasserbad. Anschließend wurden die Proben mit 20 µl Dihydrorhodamin 123 versetzt und für weitere 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, gefolgt von einer Fixierung mit 2 ml *Lysing*

Solution®. Nach einer 20 minütigen, lichtgeschützten Inkubation wurde jeder Messansatz unter Zusetzung von 2 ml Waschlösung dreimal zentrifugiert (5 min, 250 x g, 4°C), mit 2 µg/ml PI versetzt und *via* Durchflußzytometer vermessen (siehe III-12).

III.12 Grundlagen der verwendeten Methodik

III.12.1 AmB-Bestimmung *via* HPLC

Die Entwicklung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in den 70er Jahren brachte wichtige Fortschritte bezüglich der Schnelligkeit und des Auflösungsvermögens chromatographischer Trennverfahren. Bei diesem Verfahren wird eine Substanzmischung (Analyt) in ein Laufmittel (mobile Phase) aufgenommen, das die Wechselwirkung des Analyten mit der spezifischen Oberfläche einer stationären Phase in Form einer Trennsäule vermittelt. Die Intensität der Wechselwirkung bewirkt in Abhängigkeit von der Polarität einen verzögerten Transport der einzelnen Komponenten, die zu einer charakteristischen Retentionszeit erscheinen.

Die AmB-Bestimmung wurde an einer Shimadzu-Anlage LC-AD (Kontron-Instruments, Neufahrn, Deutschland) durchgeführt; die Auswertung erfolgte mit der Software Kroma System. In dieser Arbeit fand die so genannte *reversed phase* (RP)-HPLC Anwendung. Die Spezifikationen der entwickelten Analytik können der **Tabelle III-5** entnommen werden. Die Methodik wurde auf Linearität, Reproduzierbarkeit, Präzision, Nachweisgrenze und Spezifität überprüft. Die Kalibrierung war akzeptiert, wenn nach **Gleichung 3** die folgenden Variationskoeffizienten im Toleranzbereich der Methode lagen:

$$\text{Variationskoeffizient [\%]} = \text{SD} / \text{MW} * 100 \quad [\text{Gl.3}]$$

$$\text{Variationskoeffizient}_{\text{Reproduzierbarkeit}} < 15\%$$

$$\text{Variationskoeffizient}_{\text{Präzision}} < 10\%$$

Parameter	Spezifikation
Stationäre Phase	Chromolith RP18e, 100 x 4,6mm Performance
Mobile Phase	66% 0.05M Ammoniumacetat (pH 6.4) / 34% ACN (v/v)
Spüllösung	50% ACN / 50% CH ₃ OH (v/v)
UV-Detektionswellenlänge	408 nm
Flussrate	1.5 ml
Injektionsvolumen	20µl
Säulentemperatur	40°C
Retentionszeit	≈ 3.2 min

Tab. III-5: Spezifikation der angewandten HPLC-Analytik

Für die Kalibrierung wurde eine AmB-Stammlösung angefertigt (1 g AmB in 1000 ml ACN:Methanol:DMSO im Verhältnis von 49.5:49.5:1), woraus 6 definierte AmB-Verdünnungen (25 ng, 20 ng, 15 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng) hergestellt und deren Peak-Flächen mit der HPLC an jedem Messtag je zweimal bestimmt wurden. Arzneistofffreie Zellen dienten als Blindwert, um eine Beeinflussung der Arzneistoffanalytik durch Grundlagenbestandteile auszuschließen.

Zur Ermittlung der intrazellulären AmB-Konzentration in den RBCs wurden 200 µl AmB-NS-RBC mit der Fällungsreagenz (Methanol:Acetonitril:DMSO = 49.5:49.5:1) im Verhältnis 1:4 versetzt. Die Probe wurde anschließend für 1 min mit höchster Geschwindigkeit am Vortex aufgeschüttelt und zentrifugiert (14000 x g, 10 min). 500 µl des Überstandes wurden in HPLC-Tubes gegeben und mit der HPLC quantifiziert. Die entsprechende prozentuale AmB-Einschlusseffizienz (EEF) konnte sodann mit der **Gleichung 4** ermittelt werden:

$$\text{Einschlusseffizienz [\%]} = \frac{\text{AmB-Konzentration in RBC [pg/RBC/mL]}}{\text{Gesamtkonzentration AmB [pg/mL]}} * 100 \quad [\text{Gl.4}]$$

Nach der phagozytären Aufnahme der AmB-NS-RBC sollte die AmB-Konzentration der Leukozytenpopulationen (MNC, PMN) im Abstand von jeweils 24 h analysiert werden.

Zur Bestimmung der AmB-Gesamtkonzentration in den Proben (AmB-Gehalt in Leukozyten plus Überstand) wurden alle Ansätze zunächst 1 Minute im Vortex durchmischt, 200 µl entnommen und mit der Fällungsreagenz im Verhältnis 1:4 versetzt. Die folgende Weiterverarbeitung erfolgte wie bei den AmB-NS-RBC zuvor geschildert.

Für die Messung des leukozytären AmB-Ausstroms wurden 500 µl der entsprechenden Gesamtprobe entnommen, zentrifugiert und 200 µl des Überstandes entnommen. Bei der Bestimmung der extrazellulären AmB-Konzentration wurde analog der zuvor beschriebenen Methodik verfahren, jedoch mit dem Unterschied, dass die Überstände mit dem Fällungsreagenz im Verhältnis 1:3 versetzt wurden.

Die Bestimmung der intrazellulären AmB-Konzentration erfolgte auf indirektem Wege durch Bestimmung der AmB-Konzentration in der gesamten Probe abzüglich des freigesetzten Arzneistoffs (Überstand) bezogen auf die Zellzahl:

$$\text{Intrazelluläre AmB-Konzentration [pg/Zelle]} = \text{Gesamtprobe}_{\text{AmB}} - \text{Überstand}_{\text{AmB}} \quad [\text{Gl.5}]$$

III.12.2 Durchflußzytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorter*)

Das Durchflußzytometer ist ein opto-elektronisches Messgerät mit dem heterogene Zellpopulationen anhand Zellgröße, Membranstruktur sowie in- und extrazellulärer Merkmale analysiert werden können. Die Zellsuspension wird dazu in einer umhüllenden Flüssigkeit fokussiert, so dass pro Zeiteinheit nur eine Zelle von einem Laserstrahl erfasst wird. Insgesamt können in Standardgeräten mit Analyse der Dreifarbenfluoreszenz fünf Parameter pro Zelle erfasst werden. Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) - gemessen in einem Winkel von ca. 3° zur Strahlungsrichtung des Lasers - wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen, und dient als Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) - gemessen in einem Winkel von 90° - resultiert aus der Brechung des Lichts und entspricht der zellulären Granularität. Durch die Fluoreszenzmarkierung von Zellstrukturen mit geeigneten Antikörpern o. ä. können einzelne Zellcharakteristika anhand der Dreifarben-fluoreszenzanalyse näher spezifiziert werden: Fluoreszenz 1 mit Wellenlängen um 530 nm (Grünfluoreszenz), Fluoreszenz 2 mit Wellenlängen um 580 nm (Orangefluoreszenz) und Fluoreszenz 3 mit Wellenlängen > 640 nm (Rotfluoreszenz). Sowohl das abgestrahlte Lichtspektrum als auch das durch die Zelle gebrochene Laserlicht werden mittels Detektoren und Verstärkerketten (Photomultiplier-Röhren) aufgenommen, die das Signal linear bzw. logarithmisch amplifizieren und über einen eingebauten Analog/Digital-Wandler (ADC) einem Computersystem zur Datenaufnahme zuführen (**Abb. III-6**).

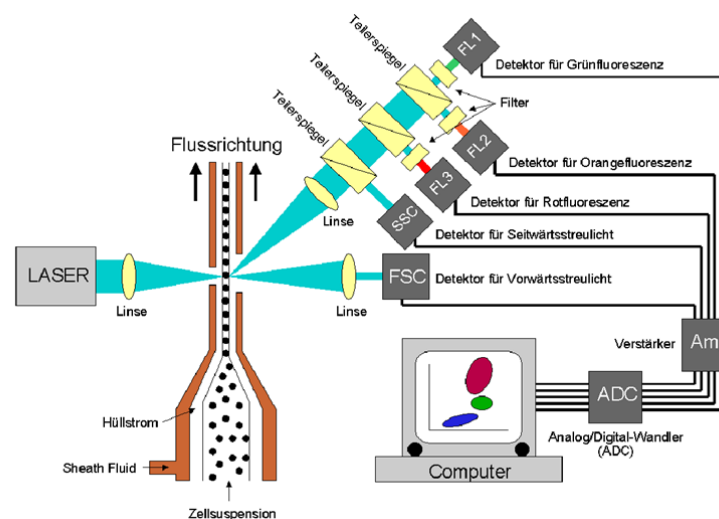


Abb. III-6: Aufbau des Durchflußzytometers [87]

Die Messung erfolgte mit einem FACSCanto®-Gerät. Die Zellen wurden im FSC und SSC analysiert, für die eine lineare Signalverstärkung gewählt wurde. Fluoreszenzen wurden

logarithmisch amplifiziert. Durch das Setzen der entsprechenden „Gates“ konnten Zellpopulationen von Interesse eingegrenzt werden. Die Verarbeitung der Informationen erfolgte mit CellQuest- und WinMDI-Software, die eine quantitative Erfassung der Daten im Dotplot oder Histogramm ermöglichte. Bei jeder Messung wurden jeweils 30000 *events*, überwiegend in niedriger Flussgeschwindigkeit registriert. Die analytischen Parameter sind für jedes Experiment in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Kapitel	Testbeschreibung	FSC	SSC	FL 1	FL 2	FL 3
III.8	Vitalität der Phagozyten	115	379	-	346	-
III.5.1; III.9.5	Resistenztestung nach Ramani	159	401	-	467	-
III.10.1	Phagozytose-Assay der AmB-NS-RBC	115	379	341	-	-
III.11.1	Apoptose der AmB-NS-RBC	137	390	361	-	-
III.11.1	Apoptose der Leukozyten	115	379	361	500	-
III.11.2	<i>Candida</i> -Phagozytose-Assay	115	379	308	346	346
III.11.3	Oxidativer Burst-Test	176	415	308	346	-

Tab. III-6: Einstellungen am Durchflußzytometer

III.12.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) können virtuelle Schnitte durch ein Objekt erzeugt werden. Bei diesem Prinzip wird ein Objekt punktweise von einem Laserstrahl abgetastet und in einzelne Schnittebenen zerlegt. Dazu muss der Laserstrahl über einen Strahlteiler so auf die Probe fokussiert werden, dass nur die Signale aus der jeweiligen Fokusebene in die konfokale Lochblende (*Pinhole*) fallen. Diese werden anschließend von einem dahinter befindlichen lichtempfindlichen Empfänger (*Photomultiplier*) als Schnittbild zusammengesetzt [88].

Die Experimente wurden am *LSM 510 meta* der Firma Carl Zeiss GmbH (Jena, Deutschland) durchgeführt. Für die Zellzählung wurde ein 63x Phasenkontrast LD-Objektiv verwendet. Fluoreszenzmarkierte Zellen wurden bei 488 nm zur Grün- (FITC) und bei 543 nm zur Rotfluoreszenz (PI) angeregt.

III.13 Statistische Analyse

Zur Auswertung der Daten wurde die Software GraphPad Prism5® (La Jolla, CA, USA) verwendet. Die statistische Signifikanz der Messwerte wurde mit dem nicht-parametrischen *U-Test nach Mann & Whitney* für unabhängige nicht-normalverteilte Stichproben bestimmt. Korrelationsanalysen wurden anhand des *Rangkorrelations-Koeffizienten nach Spearman* durchgeführt, der den Grad des Zusammenhangs zweier Merkmale in unabhängigen Messwertreihen beschreibt. Beiden Statistikverfahren wurde ein Signifikanzniveau (p) von $p < 0.05$ zu Grunde gelegt. Die Fehlerbalken in den abgebildeten Diagrammen zeigen die Standardabweichung (SD) an.

Grafische Illustrationen wurde mit dem Adobe Illustrator® bzw. Photoshop® (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) angefertigt.

IV Ergebnisse

IV.1 Charakteristika der HPLC-Messmethodik

Die verwendete HPLC-Nachweismethode für AmB wurde in ihrer optimierten Form auf Linearität, analytische Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, Präzision, Nachweisgrenze und Spezifität überprüft.

IV.1.1 Linearität (*linearity*) und analytische Richtigkeit (*accuracy*)

Die Linearität wurde anhand 6 definierter AmB-Konzentrationen zwischen 2.5 und 25 ng nachgewiesen (**Abb. IV-1A**). Jeder Messpunkt wurde aus dem Durchschnitt zweier Messungen derselben Probe bestimmt. Unter Anwendung der linearen Regressionsanalyse ergab sich dabei die Gleichung $y = 1169x - 676.9$ (**Gl. 6**) mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0.997$. Zusätzlich wurden die experimentell ermittelten Daten den errechneten Werten gegenübergestellt. Die durchschnittliche analytische Richtigkeit betrug $\pm 6.14\%$.

IV.1.2 Reproduzierbarkeit (*inter-assay coefficient of variation*)

Die Reproduzierbarkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung von Standards zwischen einzelnen Messreihen. Nach der in Kapitel III-11 aufgeführten Gleichung (Gl. 3) ergab sich aus den vermessenen Standardkonzentrationen ein relativer Variationskoeffizient (V_r) von $13.42 \pm 1.21\%$.

IV.1.3 Präzision (*intra-assay coefficient of variation*)

Die Präzision wurde anhand von 3 AmB-Standardkonzentrationen (15, 10, 5 ng) bestimmt, die viermal innerhalb einer Messreihe vermessen wurden. Der durchschnittliche Variationskoeffizient (V_r) wurde mit $4.24 \pm 2.54\%$ festgesetzt.

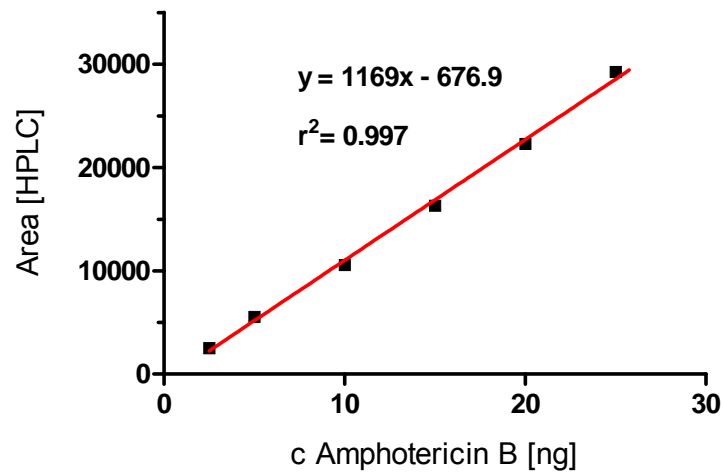
IV.1.4 Nachweisgrenze (*detection limit*)

Die Nachweisgrenze ermittelt die Empfindlichkeit einer Methode, indem sie die kleinste Menge an nachzuweisender Substanz, die vom sog. Nullstandard (keine Substanz vorhanden) unterschieden werden kann, angibt. Als Limit wurde < 2.5 ng AmB ermittelt.

IV.1.5 Spezifität (*cross reactivities*)

Die Spezifität wurde überprüft, indem 5 unabhängige Proben ohne AmB (*blank*) mit AmB-enthaltenen Aliquots verglichen wurden. Es wurde zu keiner Zeit eine Interferenz mit der AmB-Retentionszeit beobachtet (Abb. IV-1B).

A



B

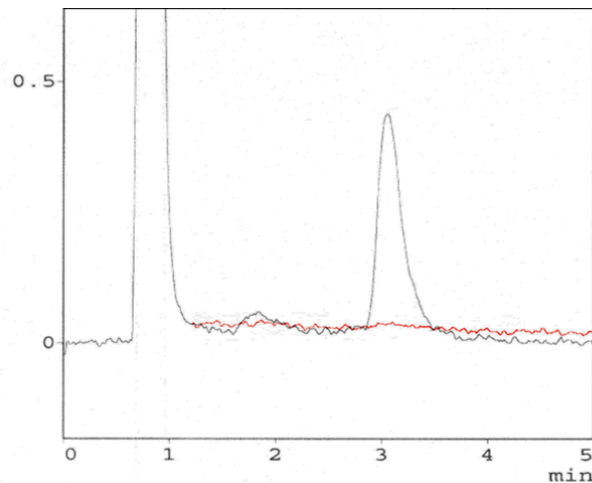


Abb. IV-1: RP-HPLC von AmB.

(A) Gezeigt ist eine repräsentative AmB-Regressionsgerade mit der Gleichung $y = 1169x - 676.9$. Jeder Messpunkt wurde als Durchschnittswert aus zwei HPLC-Vermessungen derselben Probe dargestellt.

(B) Exemplarischer Verlauf eines AmB-HPLC-Chromatogramms. Schwarz unterlegt ist eine typisch verlaufende AmB-Retentionskurve (Retentionszeit von 3.247 min, Area 6582) mit einer UV-Spur bei 400 nm. Die rote Linie stellt eine *blank-Probe* dar. Es ist keine Interaktion mit der AmB-Retentionszeit nachweisbar.

IV.2 Beladung der Erythrozyten

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Beladung der Erythrozyten mit wasserunlöslichen bzw. schwer löslichen Substanzen. Als Modellsubstanz wurde AmB gewählt, da die systemische Therapie weiterhin mit schwerwiegenden Nebenwirkungen einhergeht und die bisher verfügbaren *Drug Delivery Systeme* (DDS) trotz großer Bemühungen nur eingeschränkt anwendbar sind (siehe Kapitel I.2.4).

Nanosuspensionen besitzen in der Medizin eine große Bedeutung für schwerlösliche Arzneistoffe wie AmB und als DDS. Daher wurde zunächst von der AG Prof. Dr. Müller mit Hilfe der Hochdruckhomogenisation eine Nanosuspension des Wirkstoffes AmB (AmB-NS) hergestellt (**Abb. IV-2**). Mittels Photokorrelationsspektroskopie wurde eine durchschnittliche AmB-Partikelgröße von 65nm und ein Polydispersitätsindex von 0.454 ermittelt.

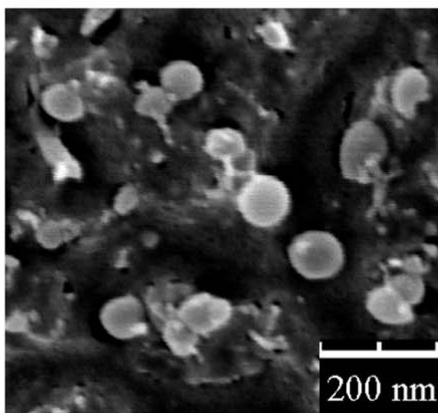


Abb. IV-2. Gefrierbruchaufnahme der AmB-NS.

Gefrierbruchaufnahme der AmB-NS mit SEM S-4800 von Hitachi belegt eine durchschnittliche Partikelgröße von 65 nm. Die AmB-NS wurde zunächst in flüssigem Propan bei -180°C schockgefroren, anschließend mittels Doppelbruchtechnik (Sandwichtchnik) auseinandergebrochen und mit Platin bei -130°C bedampft. Die entstandenen Repliken wurden mit Wasser von den Kupferträgern geschwemmt und in einem Kupfergrid zur Visualisierung aufgenommen. Die Bildaufnahme erfolgte bei -130°C und einer Beschleunigungsspannung von 2 kV.

Nanosuspensionen führen zwar zu einer verbesserten Verteilung und Löslichkeit, behalten aber oft einen großen Teil der Instabilität und Toxizität der Ausgangssubstanz bei. Daher sollte im Folgenden durch die AmB-Inkorporierung in Erythrozyten eine kostengünstige Therapiealternative entwickelt werden, die die Vorteile der Lipid-basierten Produkte aufweist und mittels zusätzlicher Magnetitbeladung, eine Möglichkeit zum erweiterten Targeting und dessen Visualisierung offeriert.

IV.2.1 Beladung der Erythrozyten mit der AmB-NS

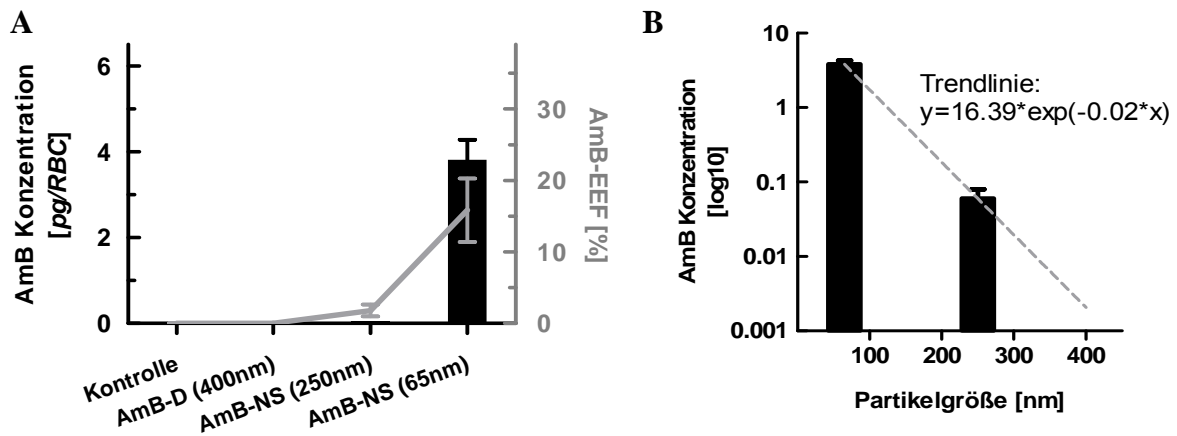
Um das Problem der Instabilität und Toxizität zu adressieren, sollte die AmB-NS *via* hypotoner Hämolyse in die Erythrozyten (RBCs) aufgenommen werden. Wird während der Hämolyse die AmB-NS hinzugefügt, kann diese durch die hypoton induzierten erythrozytären Poren die Zellmembran passieren und intrazellulär akkumulieren.

Der zelluläre AmB-Eintritt erfolgte innerhalb einer Stunde. Messungen der intrazellulären AmB-Konzentration in den RBCs *via* RP-HPLC ergaben Werte von 3.81 ± 0.47 pg/RBC, als Kontrollwert dienten unbeladene RBCs in gleicher Anzahl. Die AmB-Einschlusseffizienz (EEF) wurde mittels Gleichung 4 (Kapitel III.12.1) mit $15.84 \pm 4.45\%$ festgelegt bei einer durchschnittlichen Partikelgröße_{AmB} von 65 nm. Im Vergleich dazu konnten mit einer weiteren AmB-Nanosuspension, durchschnittliche Partikelgröße 250 nm, und dem konventionell erhältlichen AmB-Desoxycholat (AmB-D), durchschnittliche Partikelgröße 300 - 400 nm [45, 46], nur geringste bzw. keine intrazelluläre AmB-Beladung erzielt werden (**Abb. IV-3A**). Aus diesen Ergebnissen konnte auf eine inverse Korrelation zwischen der AmB-Partikelgröße und der Beladungsmenge ($r_s = -0.956$, $p < 0.01$) geschlossen werden. Das lineare Verhältnis zwischen der AmB Konzentration (im logarithmischen Maßstab) und der AmB-Partikelgröße (im linearen Maßstab) ist dargestellt in **Abb. IV-3B** als Trendlinie der Funktion:

$$y = 16.39 \cdot \exp(-0.02 \cdot x) \quad [\text{Gl. 7}]$$

wobei x die Partikelgröße [nm] und y die Beladungsmenge [\log_{10}] beschreiben.

Lichtmikroskopische Untersuchungen der AmB-NS beladenen RBCs (AmB-NS-RBCs) zeigten eine minimale Zellschrumpfung, wahrscheinlich hervorgerufen durch die angewendete hypotone Hämolyse, bei erhaltenen Form- und Erscheinungscharakteristika der RBCs (**Abb. IV-3C**). Die intrazelluläre Lokalisation der AmB-NS innerhalb der RBCs wurde mittels TEM in **Abbildung IV-3D** nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die AmB-NS relativ homogen im Zellkörper verteilt war.



AmB-Formulierung	Partikelgröße [nm]	$C_{\text{AmB}}/\text{RBC}$ [pg/RBC]	AmB-Einschlusseffizienz [%]
AmB-D	Ø 300 – 400	0	0
AmB-NS	Ø 250	0.06 ± 0.01	1.8 ± 0.83
AmB-NS	Ø 65	3.81 ± 0.47	15.84 ± 4.45
Unbeladene Kontrolle	-	0	0

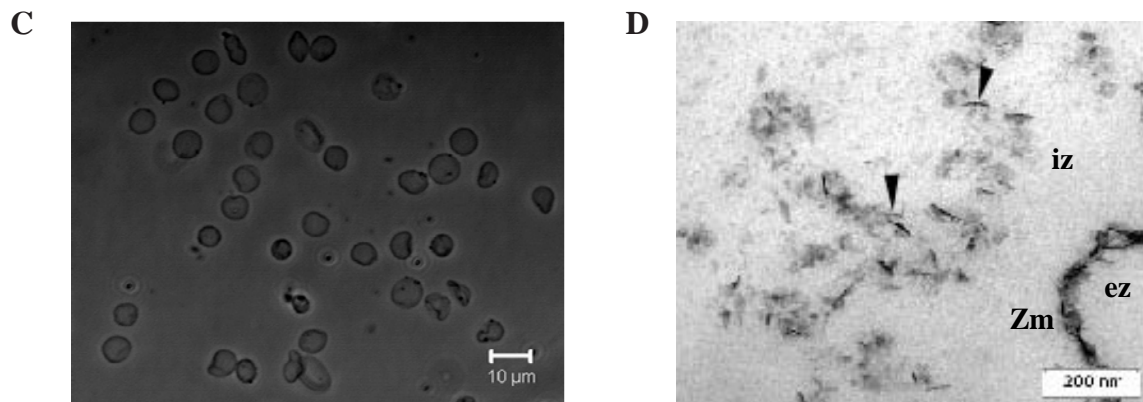


Abb. IV-3: Beladung der RBC mit AmB-Nanosuspension (AmB-NS-RBCs).

(A) Nach der Beladung der RBC mit der 1% igen AmB-NS (durchschnittliche Partikelgröße 65 nm) *via* hypotonische Hämolyse wurde die intrazelluläre AmB-Konzentration mittels RP-HPLC bestimmt. Die eingezeichnete graue Gerade entspricht der prozentualen AmB-EEF. Die Beladungseffizienz wurde für AmB-NS-RBCs mit $15.84 \pm 4.45\%$ kalkuliert. Im Vergleich zur AmB-NS mit einer Partikelgröße von 65 nm, führte eine weitere AmB-NS (Partikelgröße 250 nm) und AmB-D (Partikelgröße 300 - 400 nm) zu keiner signifikanten Beladung. Die darunter aufgeführte Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen. Dargestellt sind die MW \pm SD von 3 - 8 separaten Ansätzen.

(B) Dargestellt ist die inverse lineare Korrelation zwischen der AmB-Partikelgröße (Abzisse, linearer Maßstab) und der intrazellulären AmB-Beladungsmenge (y-Achse, im logarithmischen Maßstab).

(C) Lichtmikroskopische Aufnahme der AmB-NS-RBCs mit einem 63LD/0.75x Objektiv. Die Zellen unterliefen einer behandlungsbedingten Zellschrumpfung, wiesen jedoch ansonsten eine normale Form und Erscheinung auf.

(D) TEM Aufnahme der AmB-NS-RBCs bestätigte die intrazelluläre Lokalisation von AmB (schwarze Pfeile). Die AmB-NS ist im RBC-Zellkörper gleichmäßig verteilt. Zm=Zellmembran, iz=intrazellulär, ez=extrazellulär

Da es sich bei AmB um ein schwerlösliches Molekül handelt, stellte sich die Eliminierung des verbleibenden freien, extrazellulären AmBs nach der Beladung technisch problematisch dar. Letztendlich konnte das freie AmB suffizient durch dreimalige Waschung mit Olivenöl entfernt werden, was durch konsekutive Messungen der Überstände *via* RP-HPLC bestätigt werden konnte (**Abb. IV-1B**).

Im Folgenden sollte der stabile Einschluss der AmB-NS im RBC durch einen Farbumschlag nachgewiesen werden. Dabei macht man sich die optischen Eigenschaften von AmB zunutze, dessen gelblicher Farbton gut zu differenzieren ist. Intakte, mit AmB-NS beladene RBC (AmB-NS-RBC) stellen sich weißlich dar (**Abb. IV-4**, mittleres Eppendorf Tube). Wird jene RBC Membran jedoch durch eine Fällungsreagenz aus Methanol/Acetonitril/DMSO geschädigt, konnte aufgrund des nun freigesetzten AmBs ein gelber Farbumschlag beobachtet werden (**Abb. IV-4**, linkes Eppendorf Tube). Unbeladene Kontrollzellen wiesen keinen Farbumschlag nach deren Lysierung auf.

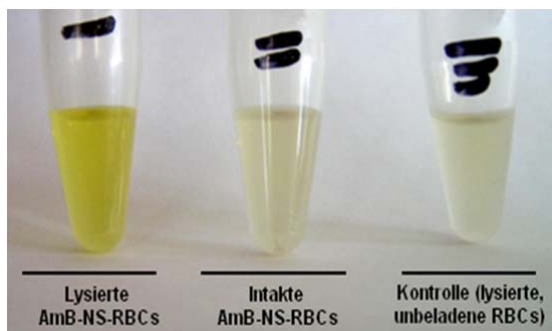


Abb. IV-4 : Lyse von AmB-NS-RBCs

Nach der Lyse der AmB-NS-RBCs mit Methanol/Acetonitril/DMSO konnte ein Farbumschlag von weiß (intakte AmB-NS-RBCs) zu gelb (freies AmB) beobachtet werden. Der Farbumschlag war nicht präsent nach der Lyse unbeladener RBC.

IV.2.2 Inkorporierung von Magnetit in AmB-NS-RBCs

Nachdem in der AG Bäumler die Beladungstechnik für den Einschluss von magnetischen Nanopartikeln in Zellen optimiert und erfolgreich angewendet worden war, entschieden wir uns, zitratbeschichtete Magnetit-Nanopartikel zusätzlich zur AmB-NS in RBCs einzuschließen. Ziel der magnetischen Beladung von AmB-NS-RBCs mit Eisenoxidnanopartikeln war es, zum einen eine magnetische Fokussierung der AmB-NS-RBCs von außen zu ermöglichen und zum anderen eine kernspintomographische Visualisierung des Vehikelsystems zu erreichen.

Das Vorgehen bei der Präparation von Magnetit beladenen AmB-NS-RBC (Magnetit-AmB-NS-RBC) erfolgte gemäß Kapitel III-9.4. Die zuvor hergestellten AmB-NS-RBCs wurden unter Auslassung des Resealing Schrittes mit einer 10%igen Magnetit-PBS-Lösung eine Stunde inkubiert, anschließend verschlossen und das überschüssige Magnetit mittels eines Ultrafiltrationsgerätes entfernt.

Messungen der intrazellulären AmB-Konzentration *via* RP-HPLC ergaben eine durchschnittliche Konzentration von 5.79 ± 0.71 pg/RBC in Kombination mit Magnetit, die damit signifikant höher lag als die Konzentration, die mit einer AmB-NS-Einzelbeladung erzielt werden konnte ($p = 0.007$) (**Abb. IV-5A**). Die resultierende AmB-Einschlusseffizienz wurde mit $17.27 \pm 2.47\%$ festgelegt gegenüber $15.84 \pm 4.45\%$ (AmB-Einzelbeladung).

Die intrazelluläre Lokalisation von Magnetit wurde abschließend im TEM untersucht. **Abbildung IV-5C-D** zeigt eindrucksvoll die intrazelluläre Lokalisation von Magnetit. Im Umgebungsmilieu der Zellen konnten keine Magnetit-Partikel nachgewiesen werden, was auf einen stabilen zellulären Einschluss hinweist. Dabei waren die Magnetit-Nanopartikel im gesamten Zellkörper gleichmäßig verteilt. Zusätzlich reicherten sich hohe Mengen von Magnetit in der Zellmembran an (**Abbildung IV-5D**). Diese Beobachtung verbunden mit der höheren AmB-NS-Beladungseffizienz, wenn kombiniert mit Magnetit, stellt ein Indiz für die membranstabilisierende Rolle der Eisenoxidnanopartikel dar, die über eine Störung der Bindung zwischen AmB und Membrancholesterolen zu einem Beladungsvorteil geführt haben könnte.

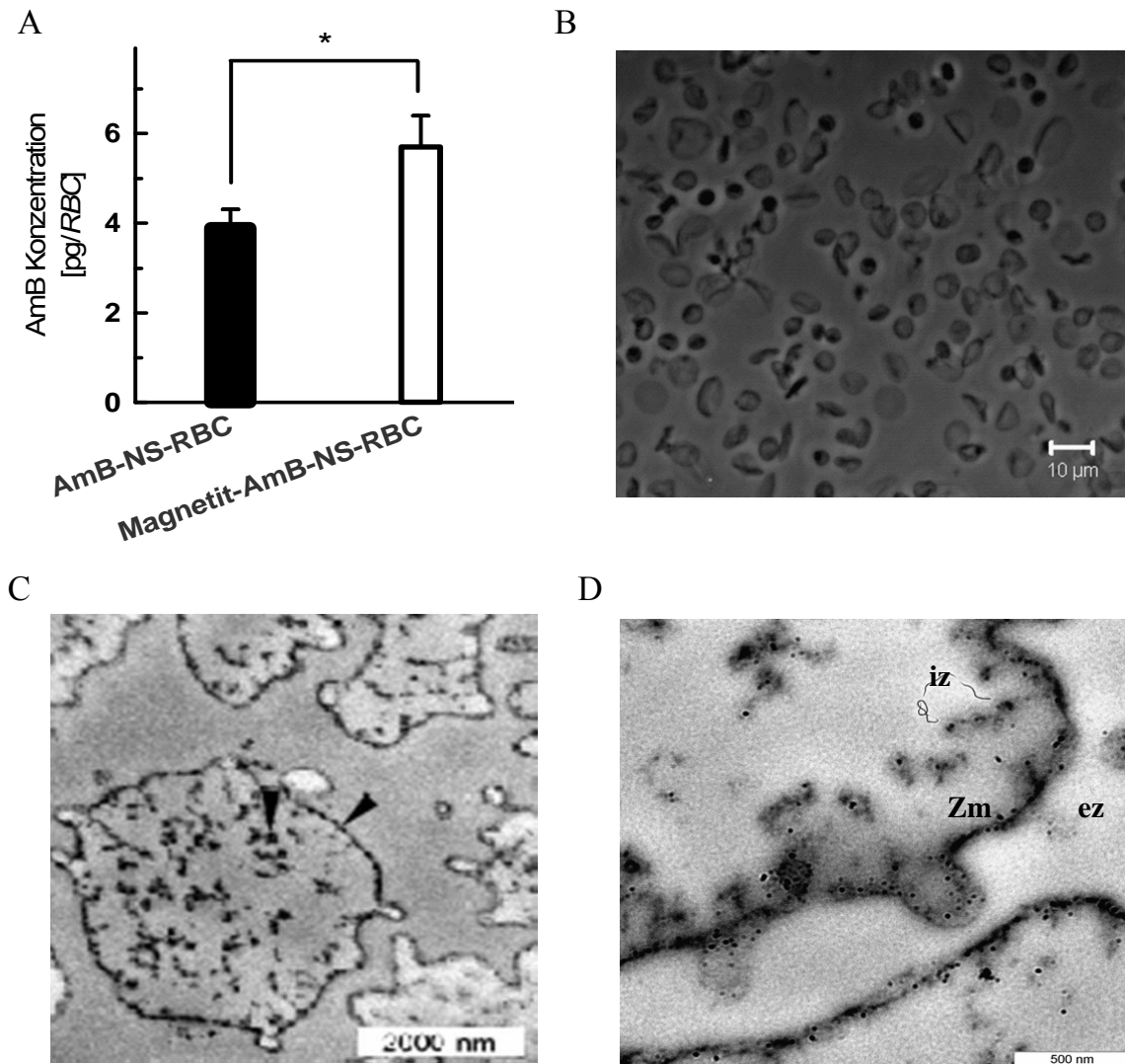


Abb. IV-5: Vergleich der AmB-Einzelbeladung mit der AmB-Magnetit-Beladung.

(A) Die Beladung der RBCs mit AmB-NS und Magnetit führte zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären AmB-Beladungsmenge ($p = 0.007$) im Vergleich zur AmB-Einzelbeladung. Die mittlere AmB-Konzentration wurde aus 10 (AmB-NS-RBCs) bzw. 4 (Magnetit-AmB-NS-RBC) unabhängigen Experimenten ermittelt. *Signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) gegenüber der AmB-NS-Einzelbeladung

(B) Lichtmikroskopische Aufnahme der Magnetit-AmB-NS-RBCs mit einem 63LD/0.75x Objektiv. Ebenso wie die AmB-NS-RBCs unterliefen Magnetit-AmB-NS-RBCs eine behandlungsbedingte Zellschrumpfung durch das hypotonische Hämolyseverfahren, wiesen aber ansonsten eine normale Form und Erscheinung auf.

(C) Die TEM Aufnahme der Magnetit beladenen RBCs demonstrierte die intrazelluläre Lokalisation von Magnetit. Die Nanopartikel wurden sowohl im Zellkörper als auch in der Zellmembran gefunden (siehe Pfeile).

(D) TEM Nahaufnahme der Magnetit beladenen RBCs zur Verdeutlichung der Magnetitakkumulation in der Zellmembran. Zm=Zellmembran, iz=intrazellulär, ez=extrazellulär

IV.2.3 Kernspintomographische Visualisierung der Magnetit-AmB-NS-RBCs

Im Folgenden untersuchten wir die Detektionsmöglichkeiten von Magnetit beladenen AmB-NS-RBCs für Anwendungen in der Magnet-Resonanz-Bildgebung (MRT). Für eine kernspintomographische Visualisierung der AmB-NS-RBCs war es notwendig, die Zellen mit einer ausreichenden Menge an Eisenoxidnanopartikeln zu beladen, um einen möglichst hohen Bildkontrast zwischen den Zellen und der Umgebungsmatrix zu erzeugen.

Dazu wurden Magnetit-AmB-NS-RBCs in 20% Agarose enthaltenen Gelphantomen eingebettet und der zelluläre Eiseneinschluss anschließend mit einem 3.0T MRT unter den folgenden Einstellungen analysiert: RARE Sequenz, effektive Echozeit 80 ms, Repetition Time 2000 ms, T2.

Im Gel eingebettete Magnetit markierte AmB-NS-RBC zeigten in der axialen Schnittführung deutliche hypointense Signalveränderungen in den T2-gewichteten Bildgebungssequenzen, die sich deutlich von dem Umgebungsmedium, der Agarosematrix, abhoben (**Abb. IV-6A**). Eine Zuordnung der Hypointensitäten zu den magnetisch markierten AmB-NS-RBCs konnte nicht erreicht werden, da aufgrund der Einbettungsmethodik eine Wärme-induzierte Agglomeratbildung der Zellen auftrat. Kontrollen magnetisch unmarkierter RBCs und native RBCs derselben Konzentration zeigten keinen Kontrast, nur lediglich vereinzelte Suszeptibilitätsartefakte (**Abb. IV-6B-C**).

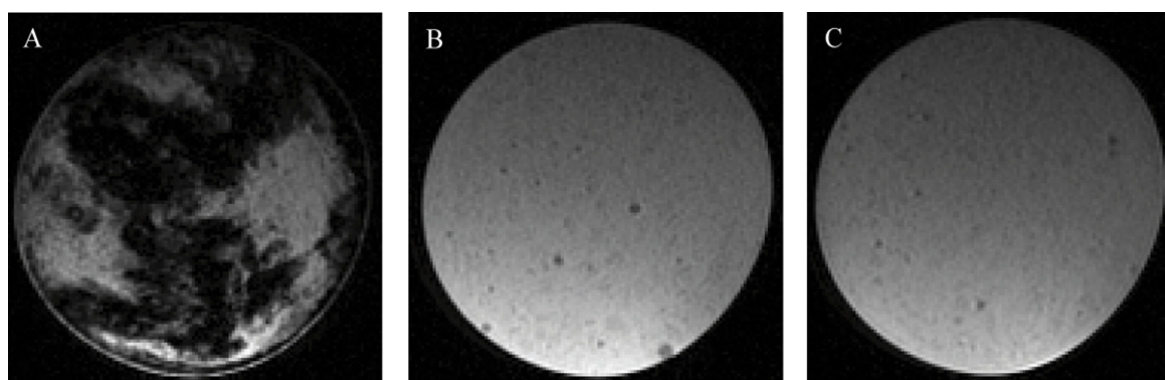


Abb. IV-6: Kernspintomographische Visualisierung von Magnetit-AmB-NS-RBCs

(A) In Agarosephantome eingebettete Magnetit beladene AmB-NS-RBCs ($10^4/\text{ml}$) zeigten im 3.0T MR eine deutliche T2-gewichtete Signalauslöschung, die die Zellen eindeutig von der Umgebungsmatrix abgrenzte. Die Verklumpung der Zellen war am ehesten auf die Hitze der Agarose Einbettungsprozedur zurückzuführen. Entsprechende Kontrollen bestehend aus nativen RBCs (B) und lysierten, unbeladenen RBCs (C) zeigten keine Veränderungen im T2 Signal, sondern lediglich vereinzelte Suszeptibilitätsartefakte.

IV.2.4 PS Exposition an AmB-NS-RBCs und Magnetit-AmB-NS-RBCs

Nach der Beladungsprozedur sollte die Präsenz von externalisiertem Phosphatidylserin (PS) als Maß für die Membranschädigung der AmB-NS-RBCs und Magnetit-AmB-NS-RBCs mit Annexin V (AnxV) untersucht werden. Sobald PS auf der Zelloberfläche präsent ist, bindet es FITC gekoppeltes AnxV und erlaubt somit die durchflusszytometrische Quantifizierung.

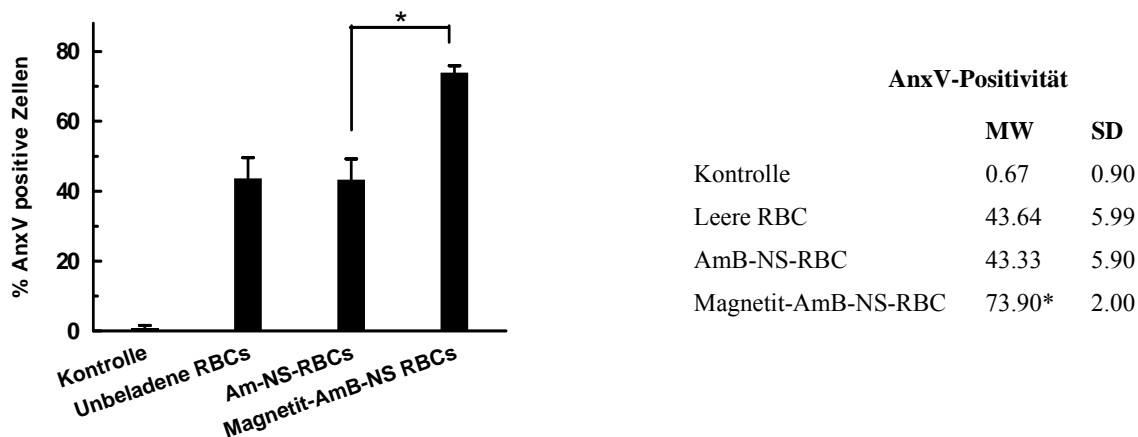


Abb. IV-7: Quantifizierung von PS auf der Zellmembran von AmB-NS-RBCs und unbeladene RBCs

Um das Ausmaß der Membranschädigung durch die AmB-Beladung zu beurteilen, wurde die PS-Translokation *via* AnxV untersucht. Dargestellt ist der %-Anteil AnxV positiver Zellen in der Gesamtpopulation der AmB-NS-RBCs, Magnetit-AmB-NS-RBCs, unbeladene RBCs und nativer RBCs. Sowohl AmB-NS-RBCs als auch unbeladene RBCs wiesen dieselbe PS Exposition auf der Zelloberfläche auf. Lediglich Magnetit-AmB-NS-RBCs, die einer rigoroseren hypoosmotischen Prozedur unterzogen wurden, demonstrierten signifikant höhere Werte (* $p < 0.05$). Als Kontrollpopulation dienten native RBCs. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 5 unabhängigen Messungen und deren Standardabweichungen.

Die durchflusszytometrische Analyse unmittelbar nach Beendigung des RBC-Beladungsverfahrens ergab eine AnxV-Positivität von $43 \pm 5.9\%$ für die AmB-NS-RBCs, die nahezu identisch mit den unbeladenen RBCs ($44 \pm 6\%$) war (**Abb. IV-7**). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die PS-Externalisierung eher von der hypoosmotischen Behandlung und der damit verbundenen Reduzierung der intrazellulären Enzyme verursacht zu sein schien als von AmB assoziierter Zytotoxizität. Im Fall der Magnetit-AmB-NS-RBCs war sogar eine deutlich höhere prozentuale PS Externalisierung von $74 \pm 2\%$ ($p < 0.05$) ermittelt worden (**Abb. IV-7**). Diese ausgeprägte Zunahme der PS-Präsentation im Vergleich zu den AmB-NS-RBCs könnte neben der intensiveren hypoosmotischen Prozedur aufgrund der Doppelbeladung ebenfalls ein Hinweis auf die in **Abb. IV-5C-D** dargestellte membranöse Magnetiteinlagerung sein, die Störungen in der Lipiddoppelschichtkomposition hervorrufen könnte.

IV. 2.5 *In-vitro* Effektivität der AmB-NS-RBCs in *C. albicans* Kultur

Zur Feststellung der antifungalen Potenz von AmB-NS-RBCs wurden diese im Ultraschallbad zerstört und mit dem freigesetzten AmB ein fungaler Hemmtest durchgeführt. Das Ausmaß der Schädigung von *C. albicans* wurde durchflusszytometrisch anhand der Zunahme der Propidiumiodid-Signalintensität als Indikator für den zellulären Exitus erfasst.

Die zuvor ermittelte MHK_{50} für *C. albicans* ATCC 10231 ergab für konventionelles AmB-D sowie für die AmB-Nanosuspension $0.0313 \mu\text{g/ml}$. Für eine $> 90\%$ ige Hemmung des Pilzwachstums (MHK_{90}) waren $0.5 \mu\text{g/ml}$ AmB-Nanosuspension bzw. AmB-D notwendig. Beide AmB-Formulierungen zeigten eine identische *in-vitro* Effektivität.

Abbildung IV-8 stellt die Beziehung zwischen dem aus AmB-NS-RBCs freigesetztem AmB und der fungalen Wachstumsinhibition dar. Um eine 50% ige *C. albicans* Hemmung (MHK_{50}) zu erreichen waren im Durchschnitt ca. $1 \cdot 10^4$ AmB-NS-RBCs/ml notwendig, für eine 90% ige Inhibition wurden ca. $1 \cdot 10^5$ AmB-NS-RBCs/ml benötigt bei einer durchschnittlichen AmB-Beladungskonzentration von 3.81 pg/RBC . Beispielhistogramme mit entsprechendem Anstieg der PI Signalintensität (M1) sind in **Abb. IV-8B** gezeigt.

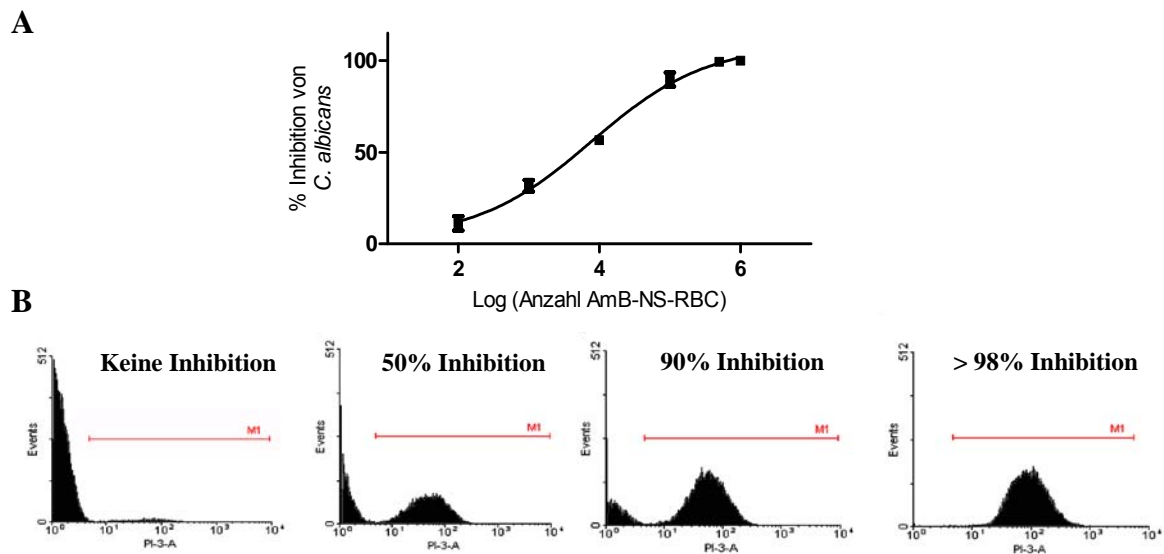


Abb. IV-8: Inhibition von *C. albicans* ATCC 10231 mit AmB-NS-RBCs

(A) Das Diagramm zeigt die Beziehung zwischen der aus AmB-NS-RBCs freigesetzten AmB Menge und der *C. albicans* Wachstumsinhibition. Für eine 50% ige *C. albicans* Hemmung waren ca. $1 \cdot 10^4$ AmB-NS-RBCs/ml notwendig. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen und deren Standardabweichungen.

(B) Dargestellt sind Beispielhistogramme der durchflusszytometrischen Erfassung der fungalen Wachstumsinhibition nach AmB-NS-RBC Inkubation mittels PI. M1 gibt den Bereich der toten, PI-positiven *C. albicans* Zellen an. Gezeigt ist eine Positivkontrolle und 50% , 90% bzw. $> 98\%$ Inhibition des Pilzwachstums.

IV.3 Intrazelluläre AmB-Akkumulation und Freisetzung aus Leukozyten

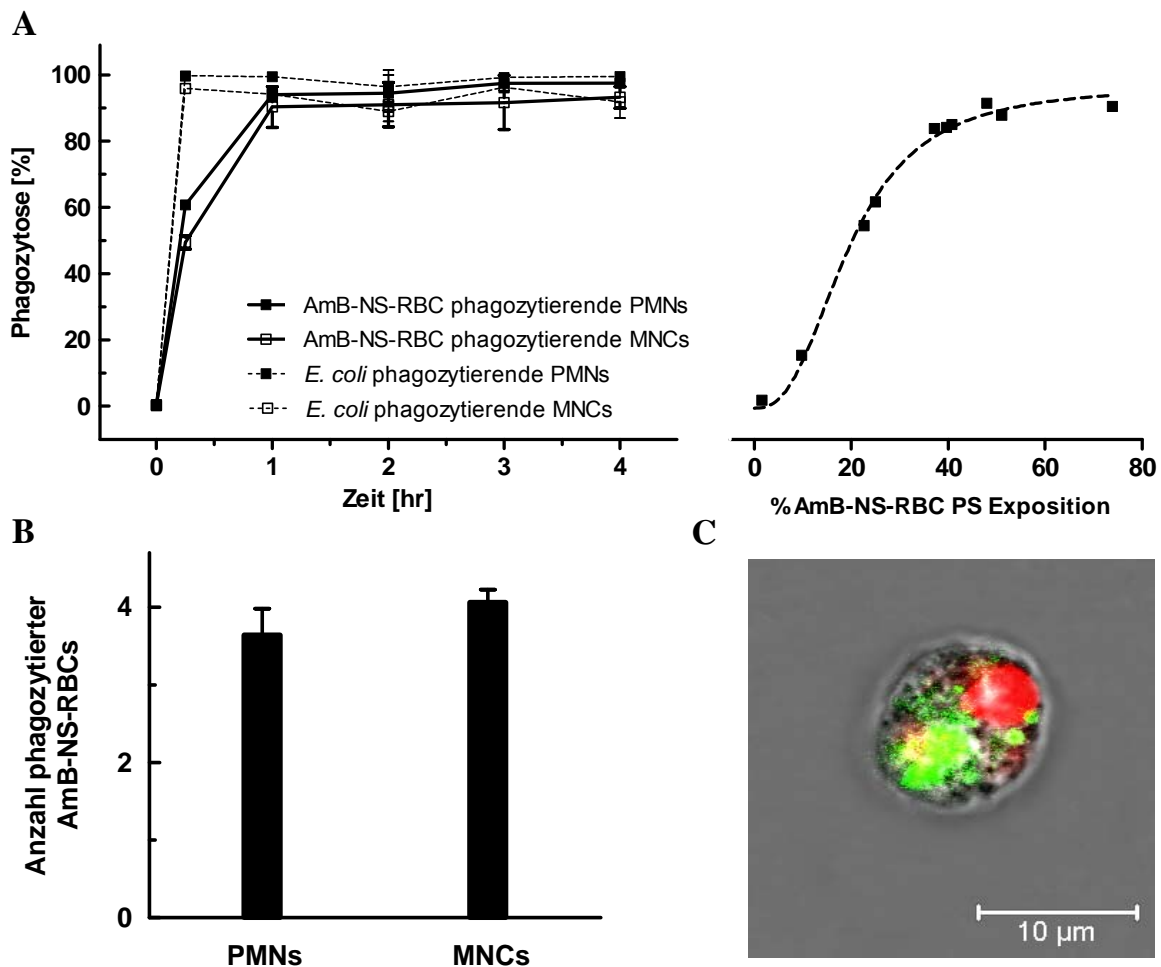
IV.3.1 Leukozytäre Aufnahme von AmB-NS-RBCs

Für einen maximalen therapeutischen Effekt war es nötig, eine möglichst hohe intrazelluläre AmB-Akkumulation in den Leukozyten zu erzielen. Die Effektivität und Kinetik der intrazellulären Aufnahme von AmB-NS-RBCs wurde *via* Durchflusszytometrie, RP-HPLC und CLSM beurteilt. Zu diesem Zweck wurden FITC-BSA markierte AmB-NS-RBCs mit PMN bzw. MNC bei 37°C inkubiert und die leukozytäre Aufnahme über einen Zeitraum von 4 Stunden erfasst.

Abbildung IV-9A-D zeigt eine Zusammenstellung der zeitabhängigen Phagozytose von FITC-BSA markierten AmB-NS-RBCs. Dabei diente die Zunahme der FITC-Fluoreszenzintensität der Leukozyten als Maß für deren Aufnahmekapazität. AmB-NS-RBCs wurden sowohl von PMN als auch von MNC effizient ingestiert. Nach einer Stunde Inkubation wiesen bereits mehr als 90% der Immunzellen eine FITC-Positivität auf; eine annähernd vollständige Sättigung der Immunzellen trat nach 4 Stunden Inkubationszeit ein. Somit war die leukozytäre Elimination der AmB-NS-RBCs annähernd so effektiv wie die Phagozytose von gram-negativen, opsonierten *E. coli* im Vergleich ($p = 0.143$) (**Abb. IV-9A, links**).

Nach Betrachtung der Phagozytose wurden die Ergebnisse mit dem Grad PS Exposition an der RBC-Zelloberfläche korreliert. Eine Korrelation zwischen leukozytärer AmB-NS-RBC Aufnahme und prozentualem Anteil der PS-positiven AmB-NS-RBCs wurde für Werte von < 35% beobachtet, wohingegen PS-Ratios von > 35% zu einer Sättigung, ohne weitere Steigerung der Aufnahmekapazität, führten (**Abb. IV-9A, rechts**).

RP-HPLC Untersuchungen der AmB-NS-RBC beladenen Leukozyten ermittelten eine intrazelluläre AmB-Akkumulation von ca. 16 pg/Zelle für MNC und 14 pg/Zelle für PMN (siehe Tabelle in **Abb. IV-9**), entsprechend einer leukozytären Transportkapazität von 4 bis 5 AmB-NS-RBCs pro Zelle (**Abb. IV-9B**). Dieses wurde ebenfalls durch das CLSM bestätigt, welches eine deutliche Anreicherung von FITC-BSA markierten AmB-NS-RBCs (grün) innerhalb der Leukozyten darstellte (**Abb. IV-9C**).



	Anzahl internalisierter AmB-NS-RBCs [AmB-NS-RBC/Zelle]	Leukozyt-AmB-Konzentration [pg/Zelle]
MNC	4.06 ± 0.34	15.79 ± 0.79
PMN	3.64 ± 0.17	14.16 ± 0.34

Abb. IV-9: Phagozytose und intrazelluläre Akkumulation der AmB-NS-RBCs durch Leukozyten.

(A) Die phagozytotische Aufnahme von FITC-BSA markierten AmB-NS-RBCs durch Leukozyten wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Aufnahmekinetik beider Zelltypen (MNCs, PMNs) entspricht einer typischen Sättigungskurve mit der höchsten Eliminierung innerhalb der ersten Stunde. Die intrazelluläre Aufnahme der FITC-BSA-AmB-NS-RBCs war ebenso effektiv wie die Phagozytose von *E. coli*. Eine Korrelation zwischen PS-Exposition und Phagozytose konnte für prozentuale PS-Werte von < 35% dargestellt werden. PS Externalisierungen > 35% führten zu > 90%igen Aufnahmeraten. (B) Über einen Zeitraum von 4 hr internalisierten Leukozyten 4 – 5 AmB-NS-RBCs pro Zelle entsprechend einer AmB-End-Konzentration von 14-16 pg/Leukozyt. Dabei waren geringfügige Unterschiede in der Zell-Ladefähigkeit zwischen PMN und MNC erkennbar. (C) CLSM Aufnahme eines FITC-BSA markierten AmB-NS-RBC-tragenden Leukozyten. FITC-BSA-AmB-NS-RBCs (grün) sind intrazellulär lokalisiert, der phagozytäre Zellkern wurde mit PI (rot) angefärbt. Die Bildaufnahme erfolgte durch ein LSM 510 Mikroskop (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland), Ölobjektiv 100x/1.3 mit einem 488-nm Argon und 543-nm He / Ne-Laser.

IV.3.2 Leukozytäre Freisetzungskinetik von AmB

Für ein DDS ist es nicht nur notwendig, dass der Wirkstoff stabil in ein Trägersystem eingeschlossen werden kann, sondern dass das System auch in der Lage ist, den Wirkstoff wieder abzugeben. Daher wurde im Folgenden die AmB-Freisetzungskinetik aus den MNC und PMN mit Hilfe des unter Kapitel III-10.2 beschriebenen Versuchsaufbaus analysiert.

Die leukozytäre Freisetzung von AmB wurde als Funktion der Zeit über eine Dauer von 10 Tagen für MNC und 3 Tagen für PMN untersucht. Die Probenentnahme zur Ermittlung der intra- und extrazellulären AmB Konzentration *via* RP-HPLC erfolgte jeweils im Abstand von 24 Stunden. Um Artefakte in der Erfassung der extrazellulären AmB Konzentration durch überschüssigen Zelltod zu minimieren, wurde die Zellvitalität zu Anfang durchflusszytometrisch *via* PI überprüft und lag bei 99.3% (PMN) und 99.6% (MNC).

Abbildungen IV-10A-B zeigen eine kontinuierliche leukozytäre AmB-Freisetzung mit entsprechender Abnahme der intrazellulären AmB-Konzentration in der Charakteristik einer Funktion 1. Ordnung. Das Freisetzungsmuster von AmB verhielt sich in beiden Zellpopulationen ähnlich und folgte der folgenden Kinetik:

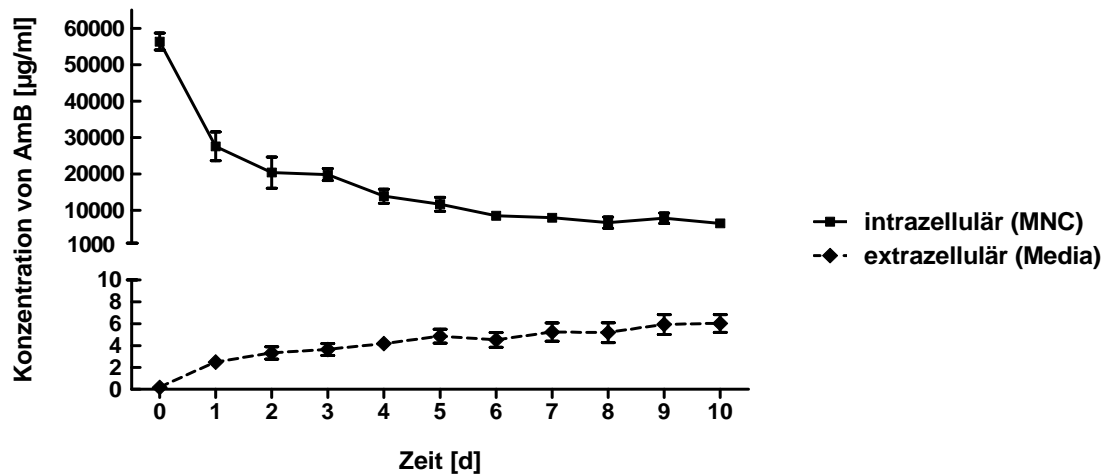
$$\text{Konz}_{\text{AmB}}(t) = \text{Konz}_{\text{AmB-0}} * \exp(-at) + \text{Konz}_{\text{AmB-End}} \quad [\text{Gl.8}]$$

wobei Konz die Konzentration, a die Zeitkonstante und t die Zeit ist.

Dabei war der intrazelluläre AmB Konzentrationsabfall pro Zeit nicht konstant. Innerhalb der ersten 24 Stunden konnte ein schneller intrazellulärer AmB Konzentrationsabfall von fast 50% beobachtet werden, das mit einem Anstieg der extrazellulären AmB Menge auf 2.48 µg/ml (MNC) und 3.41 µg/ml (PMN) korrelierte. Mit ansteigender extrazellulärer AmB Menge sank die AmB-Freisetzung pro Zeiteinheit immer mehr ab, was Hinweise auf ein Diffusionsgeschehen geben könnte. Die extrazellulär erreichten AmB-Konzentrationen lagen mit Werten zwischen 2.48 – 6.1 µg/ml (MNC) bzw. 3.4 – 4.1 µg/ml (PMN) weit über der experimentell festgesetzten MHK_{90} für *C. albicans* (0.5 µg/ml) (siehe **Kapitel IV. 2.5**).

Im Verlauf des Versuches kam es durch sequentielle Medienwechsel zu einer schrittweisen Substitution des extrazellulären AmBs. Ein Equilibrium am Ende der Messung wurde jedoch nicht erreicht.

A



B

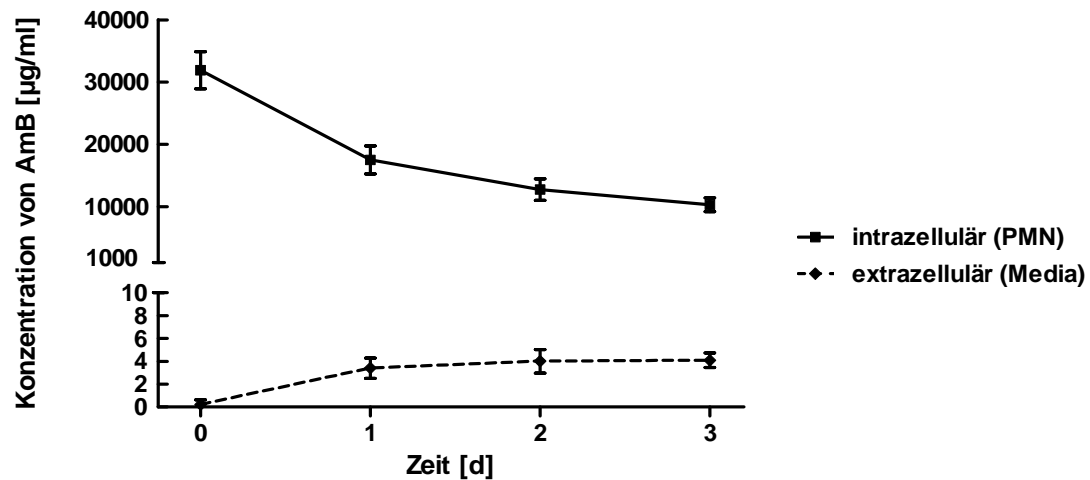


Abb. IV-10: Freisetzungskinetik von AmB aus AmB-NS-RBC beladenen MNC (A) und PMN (B).

(A und B) Die Ermittlung der intra- (PMNs, MNCs) und extrazellulären (Media) AmB Konzentration via RP-HPLC erfolgte täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen (MNCs, A) und 3 Tagen (PMNs, B). In beiden Zellpopulationen konnte eine kontinuierliche zelluläre AmB-Freisetzung mit entsprechender Abnahme der intrazellulären AmB-Konzentration in der Charakteristik einer Funktion 1. Ordnung beobachtet werden. Das AmB-Freisetzungsmuster beider Leukozytenpopulationen folgte dabei derselben Kinetik.

Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus 5 - 8 unabhängigen Experimenten.

IV.3.3 Bestimmung der antifungalen Kapazität von AmB-NS-RBC-Leukozyten

Um die antifungale Kapazität der AmB-NS-RBC tragenden Leukozyten zu bestimmen, wurde ein *C. albicans* - AmB-NS-RBC-Leukozyten Ko-Kultivierungsassay etabliert, wobei Leukozyten und *C. albicans* im Verhältnis 1:10 inkubiert wurden. Je 100 µl Probe wurden nach 3, 6, 12 und 24 Stunden, dann täglich über einen Zeitraum von 10 (für MNC) und 3 Tagen (für PMN) entnommen und auf SDA-Platten ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und mit Hilfe der Kontrollen die prozentuale Hemmung des Pilzwachstums ermittelt.

Bereits innerhalb der ersten 6 - 12 Stunden konnte eine erhebliche Inhibition des Pilzwachstums von mehr als 90% bei beiden Zellpopulationen beobachtet werden (**Abb. IV-11A-B, rot**). Dabei konnte eine deutliche Dosis – Effekt Beziehung aufgezeigt werden, wobei die *C. albicans* Hemmung mit ansteigender AmB-Konzentration im Medium zunahm (**Abb. IV-11A-B, schwarz**). So wurde beispielsweise in der Monozytenpopulation bei einer Konzentration von ca. 1 µg/ml AmB im Medium eine 41%ige und ab ca. 2 µg/ml AmB eine > 90%ige Hemmung von *C. albicans* beobachtet (**Abb. IV-11A, schwarz**). Bei PMNs stellte sich eine > 90%ige Inhibition schon bei ca. 1.0 µg/ml AmB ein (**Abb. IV-11B, schwarz**). Eine dauerhafte, komplette Wachstumshemmung wurde ab dem 2. Tag für PMN und ab dem 3. Tag für MNC erreicht, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes anhielt (**Abb. IV-11A-B, rot**).

Die intrazelluläre antifungale Aktivität der AmB beladenen Leukozytenpopulationen gegen *C. albicans* wurde in einem weiteren 3-Stunden-Co-Kultivierungstest untersucht. Dazu wurden die extrazellulären, freien *C. albicans* Zellen nach der Inkubation durch Differentialzentrifugation von den Leukozyten getrennt. Anschließend wurden die Immunzellen lysiert und das Lysat auf SDA-Platten kultiviert.

Aus **Abbildung IV-11C** ist ersichtlich, dass die leukozytäre Prä-Inkubation mit AmB-NS-RBC zu einer signifikanten Effizienzsteigerung der intrazellulären fungalen Abtötungskapazität um 84% für MNCs und PMNs im Vergleich zu den Kontrollen führte. Damit konnte gezeigt werden, dass neben der extrazellulären antifungalen Aktivität auch die Fähigkeit der Leukozyten zur intrazellulären Pilzabtötung durch die Internalisierung von AmB-NS-RBCs gesteigert werden konnte.

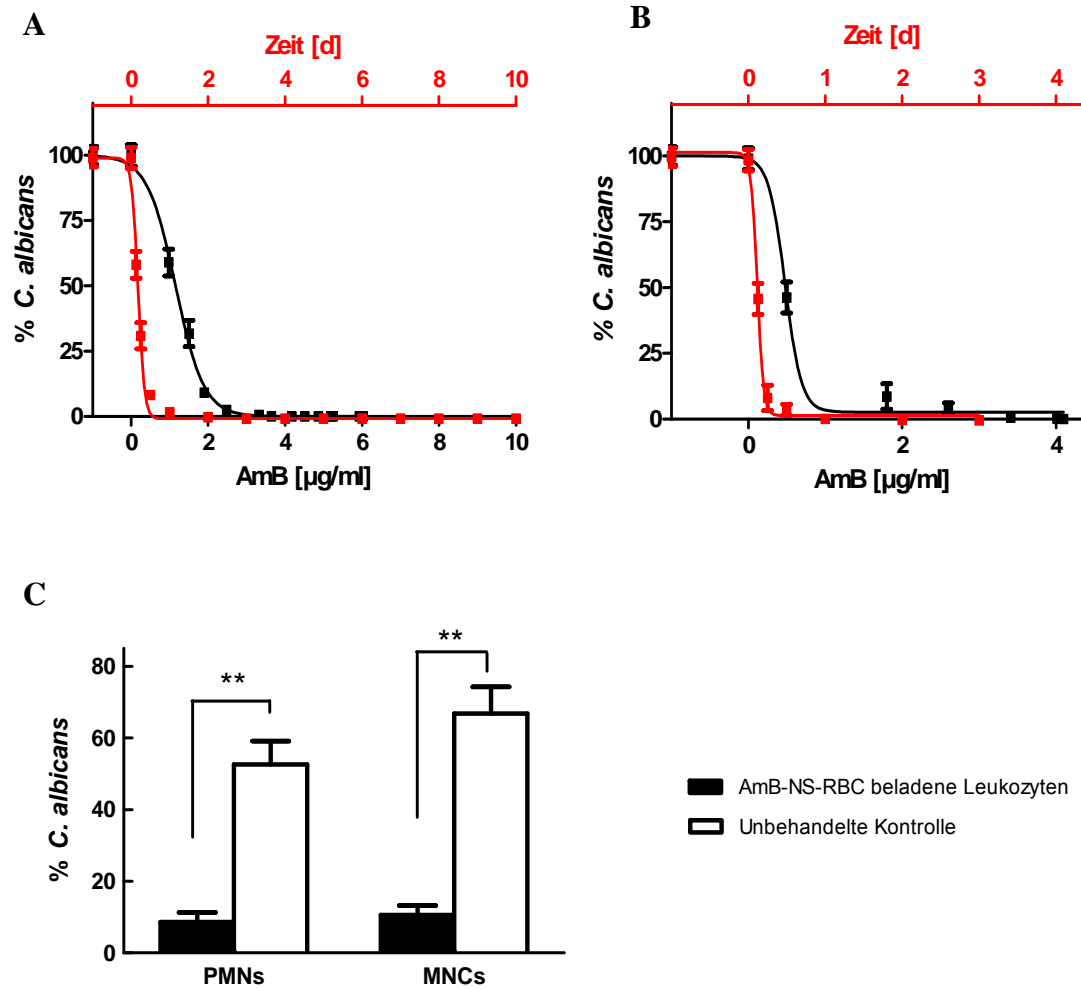


Abb. IV-11: Effekte von AmB-NS-RBC beladenen Leukozyten auf die intra- und extrazelluläre Abtötungskapazität von *C. albicans* ATCC 10231

(A und B) Die extrazelluläre Abtötungseffizienz von *C. albicans* durch AmB-NS-RBC beladene MNC (A) und PMN (B) wurde mittels direkter Kultivierung bestimmt (rot). Eine signifikante Reduktion vitaler *C. albicans* konnte bereits nach 4 Stunden Inkubation festgestellt werden. Eine komplette Inhibition erfolgte nach 2 Tagen für PMNs und 3 Tage für MNCs. Ebenfalls gezeigt ist eine Konzentrations-Effekt Kurve des aus den Leukozyten freigesetzten AmBs und *C. albicans* (schwarz). Deutlich zu erkennen ist eine Korrelation zwischen Pilzhemmung und ansteigender AmB Konzentration im Medium. Bei ca. 1.9 µg/ml AmB wurde eine > 95%ige Pilzhemmung für MNCs erreicht, während AmB-NS-RBC beladene PMNs schon bei ca. 1.0 µg/ml AmB im Medium > 95% ige Pilzhemmung aufwiesen.

(C) Die intrazelluläre fungale Abtötungspotenz wurde in einem 3 Stunden Co-Kultivierungsassay untersucht. Die Ergebnisse sind in % dargestellt. Mit AmB-NS-RBCs beladene Leukozyten konnte eine signifikante Erhöhung der antifungalen Abtötung um ca. 84 % für MNCs und PMNs im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden (** $p < 0.001$).

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 - 4 unabhängigen Experimenten.

IV.4 Auswirkungen von intrazellulärem AmB auf die Funktionen der PMN und MNC

Wie in Kapitel III.11 dargelegt, sollte die Anreicherung von AmB-NS-RBCs in Immunzellen dazu dienen, ein biologisches, ubiquitäres Transport- und Arzneistoffreservoir zu generieren. Phagozytose und oxidativer Burst stellen die wesentlichen Komponenten der antifungalen Effektormechanismen dar. Werden diese Prozesse durch die intrazelluläre AmB-Akkumulation behindert, kann dies zu schweren Konsequenzen für den Organismus führen. Daher wurde der Einfluss der AmB-NS-RBC-Aufnahme auf die leukozytäre Vitalität, Phagozytose und oxidative Burst Produktion untersucht. Proben wurden jeweils unmittelbar nach der AmB-NS-RBC Aufnahme sowie 24 Stunden später analysiert, um auch langfristige Folgen zu erfassen.

IV.4.1 Untersuchungen zur Vitalität von AmB-NS-RBC-Leukozyten

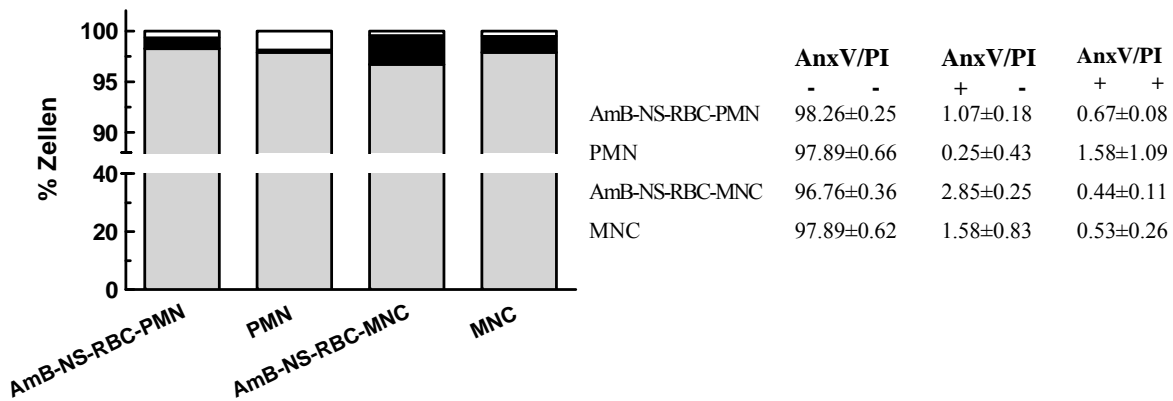
Zur Beurteilung des Einflusses der AmB-NS-RBCs auf die Effektorfunktion phagozytischer Zellen wurde zunächst deren Vitalität nach der intrazellulären Aufnahme der AmB-NS-RBCs bestimmt.

AmB-NS-RBC beladene Leukozyten wurden direkt nach der Präparation mit den fluoreszierenden Vitalitätsmarkern AnxV und PI inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Bei dieser Methode stellen sich früh-apoptotische Zellen AnxV positiv dar, spät-apoptotische/tote Zellen werden durch die Interkalierung von PI mit der nukleären DNA rot dargestellt; vitale Zellen hingegen sind negativ für beide Marker.

Die erhobenen Ergebnisse sind in **Abbildung IV-12** zusammengefasst. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung vitaler, früh- und spät-apoptotischer/toter Leukozyten mit und ohne Internalisierung von AmB-NS-RBCs. Die Vitalität (AnxV-/PI-) der MNC und PMN betrug > 96% nach der AmB-NS-RBC-Aufnahme und zeigte damit keine signifikante Abweichung von der Kontrollpopulation (viable Zellen $p > 0.05$; früh-apoptotische Zellen $p > 0.05$, spät-apoptotische Zellen $p > 0.05$) (**Abb. IV-12A**). Der Apoptoseindex (% apoptotischer Zellen) schwankte zellabhängig zwischen 0.25 – 2.85% und wies statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen AmB-NS-RBC beladenen und nativen Leukozyten auf.

Um mit der AmB-NS-RBC-Beladung assoziierte Langzeitfolgen auf die leukozytäre Vitalität zu erfassen, wurde die Messung nach 24 hr wiederholt. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den AmB beladenen und unbeladenen Populationen beobachtet werden (**Abb. IV-12B**).

A Leukozytäre Vitalität nach Aufnahme der AmB-NS-RBCs



B Leukozytäre Vitalität 24 Stunden später

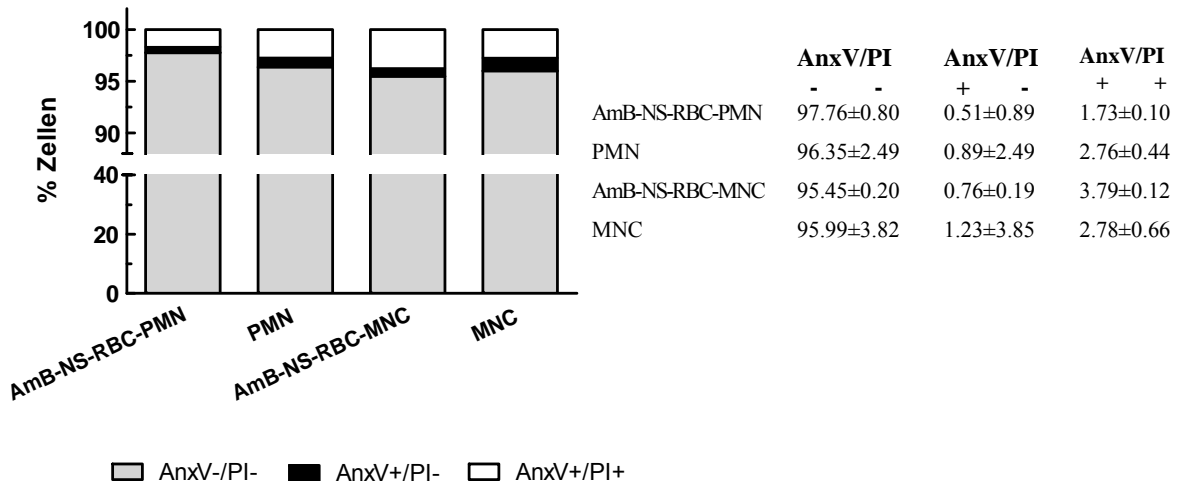


Abb. IV-12: Kurz- und Langzeitauswirkungen der AmB-NS-RBCs Internalisierung auf die Vitalität der Leukozyten

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung (MW) der Leukozyten in lebende (AnxV-/PI-), früh- (AnxV+/PI-) und spät-apoptotische (AnxV+/PI+) Zellpopulationen als Balkendiagramm. Die Ergebnisse stammen aus 5 unabhängigen Ansätzen. MW und SD können der beigefügten Tabelle entnommen werden.

(A) Die Aufnahme der AmB-NS-RBCs zeigte keine sofortigen Auswirkungen auf die Vitalität der Leukozyten im Vergleich zu den unbeladenen Kontrollpopulationen.

(B) Auch nach 24 Stunden konnte keine Einschränkung der leukozytären Vitalität nachgewiesen werden.

IV.4.2 Phagozytose von AmB-NS-RBC-Leukozyten von *C. albicans*

Um die leukozytäre Phagozytoseleistung nach der AmB-NS-RBC Internalisierung zu beurteilen, wurden AmB-NS-RBC beladene Leukozyten mit opsonierten 5(6)-FAM-SE markierten *C. albicans* (grün) inkubiert und deren phagozytotische Aktivität durchflusszytometrisch analysiert. Mit Hilfe des Farbstoffs TB, der eine Grün-Rot Fluoreszenzverschiebung bei extrazellulär, jedoch nicht intrazellulär, befindlichen Partikeln verursacht, sollte eine Differenzierung zwischen phagozytierenden und adhätierenden Immunzellpopulationen erfolgen. Die Phagozytosekapazität der AmB-NS-RBC-Leukozyten wurde über den prozentualen Anteil Phagozytose-positiver Zellen sowie über die mittlere Fluoreszenzintensität als Maß für die Phagozytoseintensität bestimmt.

Abbildung IV-13 zeigt eine repräsentative Verlaufsdarstellung der *C. albicans* Phagozytose von AmB-NS-RBC-Leukozyten über einen Zeitraum von > 4 Stunden. Nach 30 Minuten waren 4 unterschiedliche Leukozytensubpopulationen identifizierbar, die mit dem Grad der Leukozyten-*C. albicans*-Interaktion korrelierten. Anhand der Färbecharakteristika konnten folgende Unterteilungen vorgenommen werden: inaktive Zellen (keine Fluoreszenz) (I), adhätierende Zellen (Rotfluoreszenz) (II), ingestierende Zellen (Grünfluoreszenz) (IV) sowie adhätierende und ingestierende Zellen (Rot- und Grünfluoreszenz) (III).

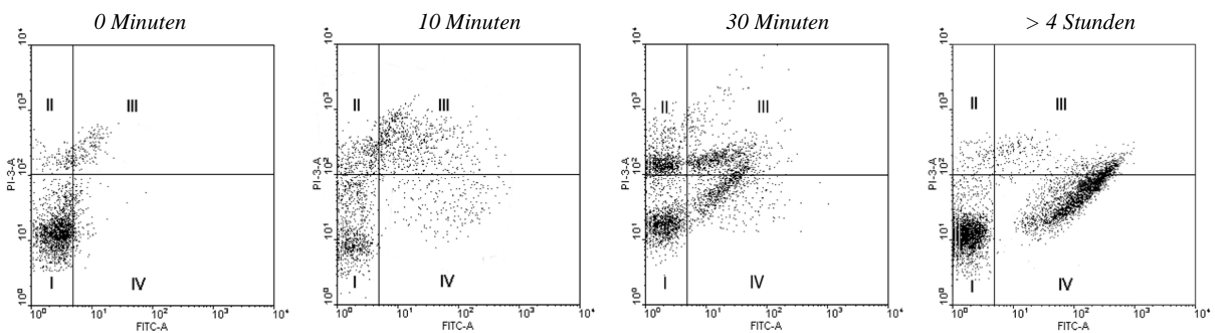


Abb. IV-13: Phagozytose von *C. albicans* durch AmB-NS-RBC beladene Leukozyten.

Dotplotdarstellung der *C. albicans* Phagozytose im zeitlichen Verlauf. Die Abzisse zeigt die FITC-Fluoreszenz (Grünfluoreszenz), während die y-Achse die Rotfluoreszenz (PI) repräsentiert. Nach 30 Minuten ist eine deutliche Differenzierung der leukozytären Subpopulationen zu erkennen:

- I** Keine Interaktion (keine Färbung; FITC - / PI -)
- II** Adhätierende Leukozyten (rot; FITC - / PI +)
- III** Adhätierende / Ingestierende Leukozyten (grün, rot; FITC + / PI +)
- IV** Ingestierende Leukozyten (grün; FITC + / PI -)

Aufgrund dieser Beobachtung wurde die durchflusszytometrische Analyse der leukozytären Phagozytosekapazität in den weiteren Experimenten nach 30 Minuten durchgeführt.

In der durchflusszytometrischen Auswertung konnte ein Anstieg von phagozytotisch inaktiven Zellen innerhalb der AmB-NS-RBC beladenen Leukozytenpopulationen verzeichnet werden. Der prozentuale Inaktivitätszuwachs betrug 25.5% für AmB-NS-RBC-MNCs ($p = 0.4$) und 29.5% für AmB-NS-RBC-PMNs ($p = 0.1$), der jedoch im Vergleich zu den Kontrollen statistisch nicht signifikant war (**Abb. IV-14A**). Neben der prozentualen Phagozytosekapazität wurde die Phagozytoseintensität, d. h. die Anzahl adhärierter und ingestierter *C. albicans* pro Zelle, anhand der Fluoreszenzintensitäten mit den folgenden Formeln ermittelt:

$$C_A = F_{L\text{ II+III}} / RF_C \quad [\text{Gl. 9}]$$

$$C_I = F_{L\text{ III+IV}} / GF_C \quad [\text{Gl. 10}]$$

RF_C Mittlere Rotfluoreszenz von *C. albicans*

GF_C Mittlere Grünfluoreszenz von *C. albicans* (vor dem Quenching)

F_L Mittlere Fluoreszenz der Leukozyten aus Quadranten II und III zur Bestimmung der Adhärenz bzw. III und IV zur Bestimmung der Ingestionsrate

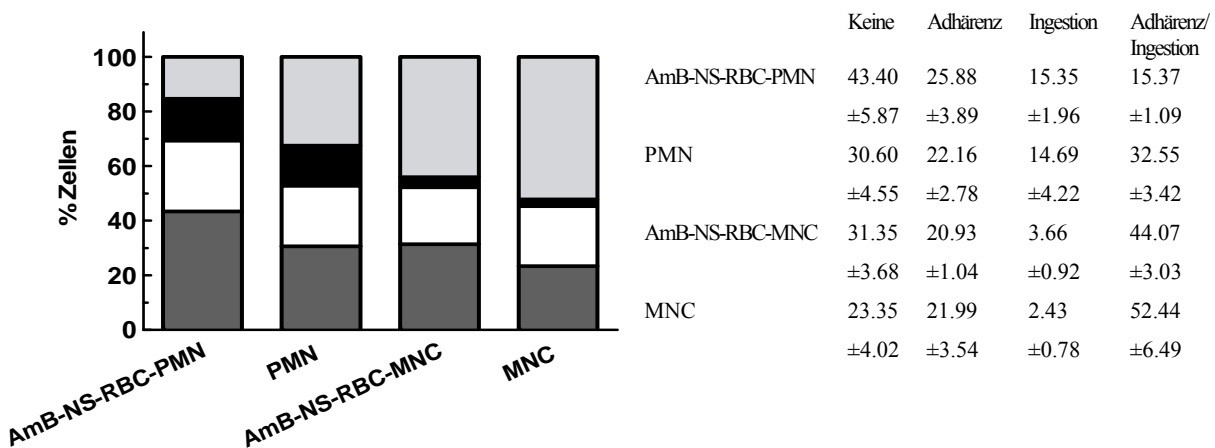
C_A Anzahl adhärierter *C. albicans*

C_I Anzahl ingestierter *C. albicans*

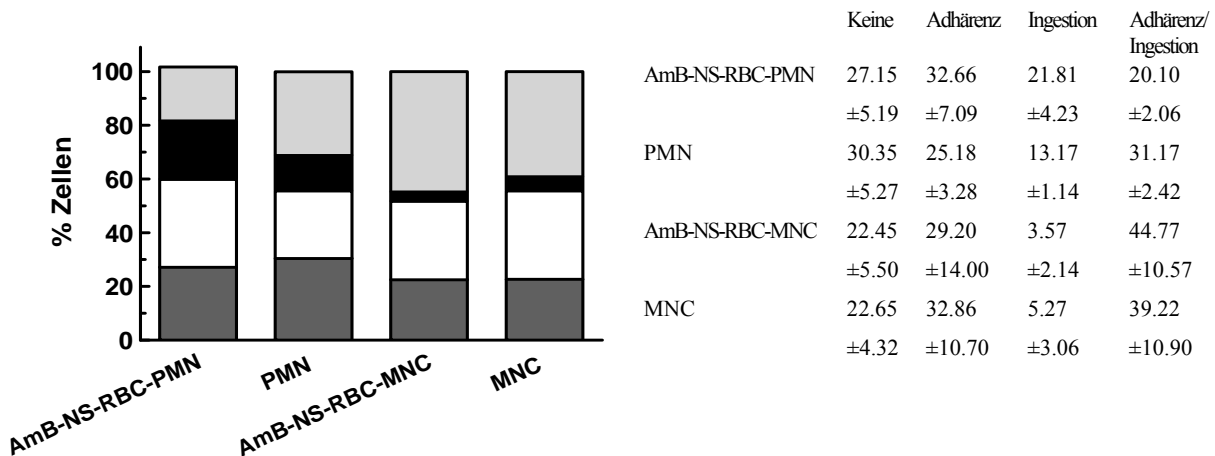
Basierend auf diesen Berechnungen adhärerten AmB-NS-RBC-MNC durchschnittlich 3.77 ± 0.22 *C. albicans*/Zelle und internalisierten 3.00 ± 0.30 *C. albicans* pro Zelle, gegenüber 7.23 ± 1.62 bzw. 3.59 ± 1.60 respektive (Kontrollpopulation). AmB-NS-RBC-PMN adhärerten 6.23 ± 1.93 und phagozytierten 3.53 ± 0.09 *C. albicans*/Zelle; unbehandelte PMN banden 8.11 ± 2.95 *C. albicans*/Zelle an sich und nahmen 3.58 ± 0.13 *C. albicans*/Zelle auf. Demnach musste geschlossen werden, dass obwohl der prozentuale Anteil Phagozytose-inaktiver AmB-NS-RBC-Leukozytenpopulationen erhöht war, so war der Aktivitätsgrad phagozytotisch aktiver AmB-NS-RBC-Leukozyten annähernd identisch mit den Kontrollen. Lediglich die Adhärenz von *C. albicans* an die AmB-NS-RBC-Leukozyten war etwas erniedrigt, wenn auch nicht signifikant.

Nach 24 Stunden normalisierte sich die Phagozytoseaktivität für beide AmB-NS-RBC beladene Leukozytenpopulationen vollständig und glich sich den Werten der Kontrollpopulationen an (**Abb. IV-14B**).

A Phagozytosekapazität nach der Aufnahme der AmB-NS-RBC



B Phagozytosekapazität 24 Stunden später



Keine Interaktion
 Adhärenz
 Ingestion
 Adhärenz und Ingestion

Abb. IV-14: Kurz- und Langzeitauswirkungen der AmB-NS-RBC Aufnahme auf die Phagozytosekapazität der Leukozyten.

Dargestellt ist das prozentuale Verteilungsmuster der Leukozyten in Abhängigkeit von ihrer Aktivität während der *C. albicans* Phagozytose als Balkendiagramm. AmB-NS-RBC-PMN bzw. AmB-NS-RBC-MNC wurden mit *C. albicans* in einem Verhältnis von 1:10 für 30 Minuten inkubiert und im Durchflußzytometer analysiert. Die Ergebnisse stammen aus 4 unabhängigen Ansätzen. MW und SD können der Tabelle entnommen werden.

(A) Die Daten zeigen einen Anstieg der phagozytotisch inaktiven Zellen innerhalb der AmB-NS-RBC beladenen Leukozytenpopulationen um 25.5% für AmB-NS-RBC-MNCs und 29.5% für AmB-NS-RBC-PMNs.

(B) Nach 24 Stunden normalisierte sich die phagozytotische Aktivität beider AmB-NS-RBC-Leukozytenpopulationen und glich sich den Werten der unbeladenen Kontrollen an. Der % Anteil der Phagozytose-positiven Zellen war annähernd identisch.

IV.4.3 Untersuchungen zum oxidativen Stress

Die Fähigkeit der MNC und PMN auf Stimulation mit der Bildung von Sauerstoffradikalen zu reagieren, ist für die Immunabwehr essentiell. In den folgenden Versuchsreihen wurde analysiert, inwieweit intrazellulär befindliches AmB die Fähigkeit der Zellen ROS zu generieren, beeinflusst. Um den tatsächlichen Einfluss von AmB herauszustellen, wurden mit leeren RBCs beladene Leukozyten als zusätzliche Kontrolle eingefügt. Die ROS Bildung der AmB-NS-RBC-Leukozyten wurde durchflusszytometrisch nach Stimulierung mit *C. albicans*, fMLP und PMA untersucht; die entstehende Fluoreszenz entspricht dem % Anteil ROS-bildender Zellen.

IV.4.3.1 Stimulierung mit *C. albicans*

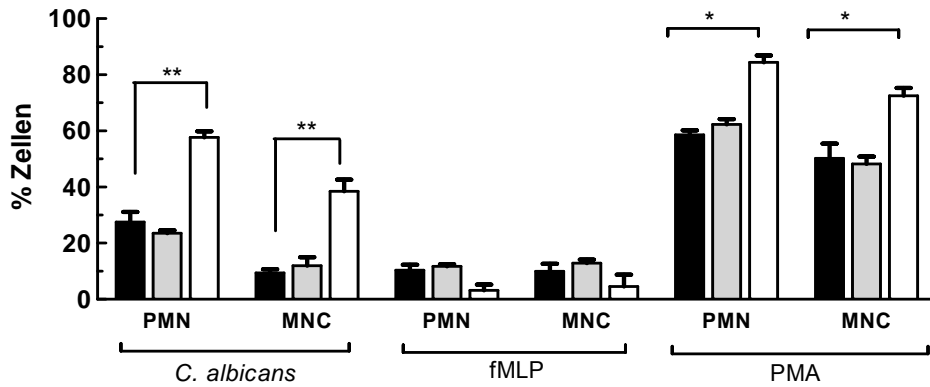
Unmittelbar nach der Aufnahme der AmB-NS-RBC war die Phagozytose von *C. albicans* von einem messbaren, aber im Vergleich zur Kontrollpopulation um 50% geringeren Fluoreszenzanstieg begleitet, was auf eine signifikant reduzierte Sauerstoffradikal-Produktion hinwies ($p < 0.001$) (**Abb. IV-15A**). Ebenso führte die Aufnahme leerer RBC zu einer verminderten Radikalproduktion ($p < 0.001$) (**Abb. IV-15A**). Um festzustellen, ob es sich dabei um permanente oder transiente Effekte handelte, wurden die Messungen nach 24 h wiederholt. Es zeigte sich eine Normalisierung der Messwerte auf das Kontrollniveau sowohl für AmB-NS-RBC als auch für leere RBC beladene Populationen (**Abb. IV-15B**).

IV.4.3.2 Stimulierung mit *Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin* (fMLP)

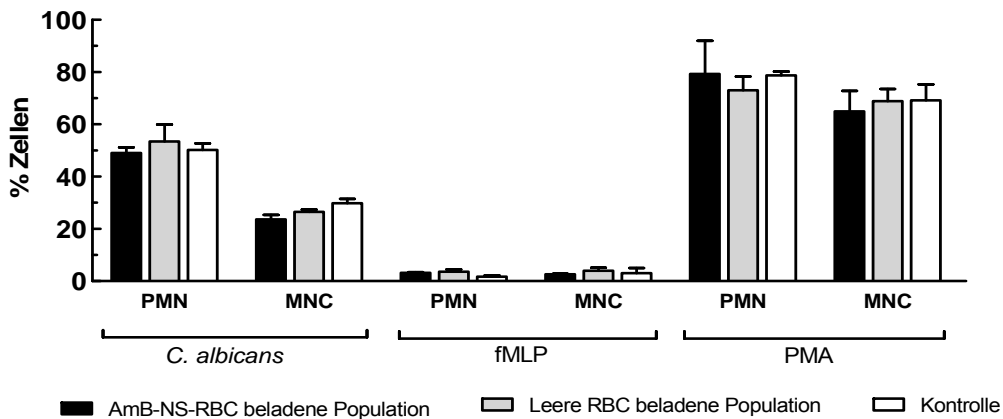
fMLP führt über rezeptorvermittelte Mechanismen zur Aktivierung der NADPH-Oxidase. Beladene MNC- und PMN-Populationen zeigten unabhängig von AmB unter Stimulation von fMLP eine tendenziell höhere, aber noch im Normbereich (Normalwert 1 - 20%) befindliche Burstaktivität mit Werten um 10 - 13% (**Abb. IV-15A**), die jedoch nicht anhaltend war. Bei der Wiederholung der Messung 24 Stunden später konnte kein Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden (**Abb. IV-15B**).

IV.4.3.3 Stimulierung mit *Phorbol 13-Myristat 12-Acetat* (PMA)

Die stimulatorische Aktivität von PMA, welches die Zytokininduktion durch Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) bewirkt, war initial sowohl bei den AmB-NS-RBC- als auch leeren RBC beladenen Leukozytenpopulationen gleichsam deutlich reduziert auf ca. 30% ($p = 0.029$) (**Abb. IV-15A**). Auch in diesem Fall, war dieses Phenomen nur von transienter Dauer. Nach 24 Stunden konnte eine Normalisierung der Messergebnisse auf Kontrollwerte beobachtet werden (**Abb. IV-15B**).

A Oxidativer Burst nach der Aufnahme der AmB-NS-RBC

		AmB-NS-RBC	Leere RBC	Kontrolle
<i>C. albicans</i>	PMN	27.52 ± 3.61	23.50 ± 1.04	57.67 ± 2.24**
	MNC	9.41 ± 1.31	11.95 ± 2.99	38.45 ± 4.16**
fMLP	PMN	10.37 ± 1.93	11.73 ± 0.75	3.17 ± 2.07
	MNC	9.97 ± 2.64	12.87 ± 1.30	4.52 ± 4.31
PMA	PMN	58.64 ± 1.70	62.30 ± 1.93	84.46 ± 2.41*
	MNC	50.18 ± 5.30	48.17 ± 2.70	72.50 ± 2.78*

B Oxidativer Burst 24 Stunden später

		AmB-NS-RBC	Leere RBC	Kontrolle
<i>C. albicans</i>	PMN	49.03 ± 2.14	53.43 ± 6.51	50.21 ± 2.50
	MNC	23.59 ± 1.81	26.55 ± 0.84	29.80 ± 1.68
fMLP	PMN	3.25 ± 0.23	3.60 ± 0.86	1.73 ± 0.50
	MNC	2.63 ± 0.12	3.99 ± 1.10	3.01 ± 2.02
PMA	PMN	79.33 ± 12.64	73.04 ± 5.23	78.73 ± 1.49
	MNC	64.94 ± 7.85	68.85 ± 4.68	69.21 ± 6.07

Abb. IV-15: Kurz- und Langzeitauswirkungen der AmB-NS-RBC auf leukozytäre ROS-Bildung.

(A) Die ROS-Bildung der PMN und MNC nach der Aufnahme von AmB-NS-RBC und leeren RBC war deutlich reduziert, wenn die Zellen mit *C. albicans* (** $p < 0.01$) und PMA (* $p < 0.05$), jedoch nicht mit fMLP, stimuliert wurden. Diese Beobachtung war unabhängig von AmB, da Zellen ohne AmB dieselben Resultate aufwiesen.

(B) Eine Wiederholung der Messung 24 Stunden später ergab eine Normalisierung der Messwerte auf das Niveau der Kontrollen sowohl für AmB als auch mit leeren RBC beladene Populationen.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 4 unabhängigen Messungen.

V Diskussion

Das Spektrum der Pilzkolonisierung von *C. albicans*, dem häufigsten fungalen Humanpathogen, reicht von symbiotischer Koexistenz bis hin zu schwerwiegenden, systemischen Infektionen. Trotz der Tatsache, dass Pilzinfektionen im immunkompetenten Wirt meist selbstlimitierend sind, ist die Zahl der lebensbedrohlichen Pilzinfektionen in den letzten drei Jahrzehnten vor allem bei immungeschwächten Patienten dramatisch angestiegen obwohl potente Therapeutika wie AmB zur Verfügung stehen [1]. Ursächlich hierfür ist neben der unzureichenden Frühdiagnostik das fulminante Nebenwirkungsprofil von AmB, das den klinischen Anwendungsbereich stark einengt [28]. Anstreben, das Nebenwirkungsprofil mittels der Synthese von AmB-Analoga wie AmB-Estern, Liposomen und anderen lipid-basierenden Formulierungen zu verbessern, führten nicht zum erwarteten Erfolg [1, 89].

Die Einführung der Nanotechnologie in der letzten Dekade hat innovative Ansätze für schwerlösliche Wirkstoffe wie z. B. AmB offeriert, und hat daher großes Interesse im Zellbasierten Medikamententargeting und ebenso als DDS gewonnen [69, 90, 91]. Daher schlussfolgerten wir, dass der Einschluss einer AmB-NS in einen biologischen Träger mit anschließender selektiver Aufnahme durch die Leukozyten einen idealen Ansatz zur Verbesserung der antimykotischen Therapie darstellt. Wir folgerten weiter, dass ein solches Zellbasiertes Arzneistoffträgersystem die antifungale Therapie intensiviert durch (1) Limitierung der Toxizität, (2) Unterstützung der intra- und extrazellulären antifungalen Immunantwort und (3) Verbesserung der Wirkstoffakkumulation am Krankheitsherd. Dabei war die Rolle der Leukozyten von besonderer Bedeutung, da sie im Gegensatz zu AmB Zutritt in alle Körpergewebe einschließlich des ZNS besitzen [92].

Basierend auf diesen zugrunde liegenden Erwägungen, ergaben sich folgende Ergebnisse, die in den weiteren Abschnitten im Einzelnen diskutiert werden:

- (A) Lysierte RBCs (*Ghosts*) können schnell und effizient *via* hypotone Hämolyse mit einer AmB-NS beladen werden. Durchschnittliche AmB-Beladungsmenge war 3.81 ± 0.47 pg/RBC.
- (B) Der Co-Einschluss von Magnetit in AmB-NS-RBCs erlaubte eine kernspintomographische Visualisierung der Zellen und erhöhte die eingeschlossene AmB-Konzentration auf 5.79 ± 0.71 pg / RBC.

- (C) AmB-NS-RBCs wurden schnell von den Leukozyten (MNC und PMN) erkannt und phagozytiert mittels auf der RBC-Zelloberfläche befindlichem PS. Durchschnittlich wurden 4 - 5 AmB-NS-RBCs pro Leukozyt aufgenommen und eine AmB-Beladungsendmenge von 14 - 16 pg/Zelle erzielt.
- (D) Die leukozytäre AmB-Akkumulation führte zu einer signifikanten Steigerung der intra- und extrazellulären Abtötung von *C. albicans*. Eine kontinuierliche leukozytäre AmB-Freisetzung konnte über einen Zeitraum von maximal 10 Tagen beobachtet werden.
- (E) Die leukozytäre Funktionstestung nach der Aufnahme der AmB-NS-RBC zeigte weder kurz- noch langfristige Einschränkungen der Vitalität. Jedoch wurden kurzfristige Verminderungen im Aktivitätsgrad der Phagozytose und oxidativem Burst sowohl bei den AmB-NS-RBC-MNCs als auch -PMNs beobachtet, die sich nach 24 Stunden wieder normalisierten und somit keine langfristigen Einschränkungen nach sich zogen.

V.1 Erythrozyten als Arzneistoffträgersysteme für schwerlösliche Substanzen am Beispiel von AmB

V.1.1 Einsatz der Nanosuspension

AmB hat in der Behandlung invasiver Pilzinfektionen nach wie vor einen hohen Stellenwert; die Abtötung von *C. albicans* durch AmB bleibt die schnellste und effizienteste Methode trotz neuer antifungaler Medikamente [27]. Es interagiert mit dem Pilz-spezifischen Ergosterol und führt über die Bildung von Membrankanälen zu einem Verlust der Membranstabilität, die im zellulären Exitus endet. Literatur zufolge spielt die Resistenzentwicklung für Pilze, mit Ausnahme von *Aspergillus terreus*, nur eine untergeordnete Rolle [33]. Vielmehr scheinen Probleme mit der Pharmakokinetik, d. h. Diskrepanzen zwischen der Lokalisation der Pilze und AmB-Verteilung, dem Löslichkeitsprofil sowie der unspezifischen Sterolbindung einen wichtigen Anteil beim Versagen der Therapie zu spielen.

Betrachtet man die pharmakokinetischen Eigenschaften von AmB, muss festgestellt werden, dass AmB kein ideales Medikament darstellt. Da freies AmB sehr lipophil und in Wasser praktisch unlöslich ist - mit Einschränkung im sehr sauren und alkalischen pH-Bereich (< pH 2 und > pH 11), wo es mit 0.1 mg/ml nur gering löslich ist - muss AmB mit hohem Aufwand in spezielle pharmakologische Formulierungen aufbereitet werden [29, 30]. Konventionell wird AmB mit Desoxycholat, einer Gallsäure, dispergiert. Neue Ansätze, AmB in Liposomen oder andere lipidähnliche Formulierungen aufzubereiten, ermöglichte durch erhebliche Reduktion von

Nebeneffekten, insbesondere der Nephrotoxizität, die Verabreichung von höheren Dosen [39]. Gleichzeitig erhöhen sich jedoch die Kosten für das Medikament gegenüber der konventionellen Formulierung dramatisch [48].

Zur Steigerung der Löslichkeit und Bioverfügbarkeit von schwerlöslichen Therapeutika wie AmB bietet die Nanotechnologie neue, innovative Lösungsmöglichkeiten [90]. Unter ihnen stellen Nanosuspensionen besonders attraktive Formulierungen dar, da neben einer Erhöhung der Sättigungslöslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit auch eine Verbesserung der Beladungskapazität für Carrier bis zu 30% erzielt werden kann [69]. Weitere Vorteile beinhalten **(a)** ein schnelleres Einsetzen der Wirkung, **(b)** verbesserte Bioverfügbarkeit, **(c)** verbesserte Voraussage der therapeutischen Wirksamkeit, **(d)** verbesserte Dosisproportionalität und Gleichförmigkeit, **(e)** gezielte Arzneistoffabgabe, und **(f)** Formulierungen ohne toxische Trägersubstanzen [69].

Aus den dargelegten Gründen wurde entschieden, die erythrozytäre Beladung mit einer AmB-Nanosuspension durchzuführen. Dabei kommt der physikalischen Stabilisierung der Nanopartikel große Bedeutung zu, um ein Anwachsen der Kristalle zu unerwünschten Mikropartikeln zu vermeiden. Infolgedessen sollten Arzneistoffkonzentrationen zwischen 1-10% gewählt werden, wie es in der vorliegenden Arbeit getan wurde [70].

V.1.2 Schwerlösliche Substanzen - am Beispiel von AmB - können als Nanosuspension in Erythrozyten geladen werden

Die Wahl der Erythrozyten als Carriersystem basierte auf drei wesentliche Überlegungen. Erythrozyten besitzen im Gegensatz zu anderen Zellen kaum Zellorganellen und bieten mit einem intrazellulären Speichervolumen von 90 fl eine gute Beladungskapazität. Weiterhin schützen sie die eingeschlossene Substanz vor einer frühzeitigen enzymatischen Inaktivierung, Abbau durch endogene Faktoren und gleichzeitig wird der Organismus vor toxischen Nebenwirkungen bewahrt. Durch die Etablierung verschiedenster Beladungsverfahren konnte gezeigt werden, dass RBCs mit unterschiedlichsten Stoffen beladen werden können. Zusätzlich sind sie leicht *ex vivo* zu handhaben und äußeren Einflüssen gegenüber relativ robust [50, 57, 58].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass RBCs mit therapeutischen Dosen von AmB beladen werden können. Das verwendete Beladungsverfahren stellte sich als effizient,

schnell und reproduzierbar dar: der AmB-Einschluss gelang innerhalb von 2 Stunden bei einer reproduzierbaren Einschlusseffizienz von 15 - 18%. Dies entspricht der in Literatur angegebenen Effektivität (~ 15%) für das von uns angewendete Beladungsverfahren der hypotonischen Hämolyse [61, 93]. Die intrazelluläre Aufnahme von AmB erfolgte durch hypotonisch induzierte Porenbildung in der Erythrozytenmembran, wodurch ein passiver Materialtransport im Sinne einer Diffusion ermöglicht wird. Entsprechend einer erythrozytären Porengröße von 200 - 500 Å [61], war es daher nicht überraschend, dass die AmB-NS mit der geringsten Partikelgröße von Ø 65 nm die effizienteste Beladung erzielte und für die beschriebenen Experimente eingesetzt wurde, während konventionelles AmB-D (Partikelgröße 300 - 400 nm) ebenso wie eine weitere AmB-NS (Partikelgröße 250 nm) zu keiner signifikanten AmB-Akkumulation im RBC führten. Die Inkubation von intakten RBCs mit AmB führte zu keiner intrazellulären AmB-Akkumulation, was einen aktiven Aufnahmeprozess, wie beispielsweise bei Primaquin, Vinblastin, Hydrocortisone und Propranolol beschrieben, unwahrscheinlich erscheinen ließ [94].

Mit der oben genannten Methodik wurde eine durchschnittliche intrazelluläre AmB-Beladung von 3.81 pg pro RBC erzielt, was 8004 µg AmB pro mg Lipid entspricht – angenommen die Erythrozytenmembran enthält 4.76 pg Lipid pro RBC [95]. Im Vergleich dazu erzielen Amphotericin B liposomale Formulierungen wie z.B. Ambisome oder ähnliche liposomale Formulierungen eine durchschnittliche AmB Beladung von 33 - 37 µg/mg Lipid [96], was einer 221 - 248fachen Erhöhung der AmB-Beladungsmenge pro mg Lipid im Erythrozyten entspricht. Diese Berechnung ist jedoch nur von limitierter Aussagefähigkeit, da die liposomale Membran vollständig aus Lipiden besteht, während die Erythrozytenmembran neben Lipiden (35%) zu einem Großteil aus Proteinen (50%) gebildet wird [54, 95]. Trotzdem ist der errechnete Beladungsvorteil nicht allein mit der Membranzusammensetzung zu erklären, sondern muss ebenso auf ein vorteilhafteres Oberflächen-Volumen-Verhältnis zugunsten der größeren RBCs zurückgeführt werden: bei einer Verdopplung des Durchmessers erhöht sich die theoretische Volumenbeladung um die 3. Potenz während die Oberfläche um die 2. Potenz zunimmt. Auch bei der Betrachtung des prozentualen Molekülanteils von AmB im RBC (Mol%) konnte mit 41% ein weitaus höherer Arzneistoffeinschluss als in Ambisome (10%), ABLC (33%) und AmB-Desoxycholat (34%) erzielt werden [39, 48]. Kalkuliert wurden diese Werte in Bezug auf den Lipidanteil (durchschnittliches molekulares Gewicht 800 Da) in der Zellmembran und unter Auslassung von Cholesterol und Proteinen.

Trotz der erfolgreichen erythrozytären AmB Beladung muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass AmB aufgrund der unspezifischen Cholesterolbindung zytotoxisch für humane Zellen wirkt. Ähnlich wie bei Pilzmembranen führt es im Erythrozyten in niedrigen Konzentrationen durch Bildung von transmembranen Kanälen zunächst zu einer reversiblen Permeabilisierung, in höheren Dosen kommt es dann zu einer Zelllyse aufgrund fortschreitender oxidativer Schäden an der erythrozytären Zellmembran, die eine dauerhaften Destabilisierung hervorrufen [97]. Umso überraschender war es, dass nach der erythrozytären Beladung mit AmB-NS die Integrität und Stabilität der Zellmembran wiederhergestellt werden konnte. Der AmB-NS Einschluss war für mehrere Tage stabil, was mittels RP-HPLC Messungen der Überstände überprüft wurde. Weitergehende Untersuchungen zur Membranintegrität wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Zusammengefasst bietet diese Methodik eine einfache und kostengünstige Alternative zu den existierenden liposomalen AmB Formulierungen, da unter anderem höhere Beladungseffizienzen in kurzer Zeit erzielt werden konnten. Für die klinische Anwendung dieses Verfahrens sind jedoch weitere Experimente inkl. Nebenwirkungsprofil, Effizienz und Pharmakokinetik notwendig. Neben neuen Möglichkeiten zum Medikamententransport offeriert diese Methodik auch Chancen zur Wiedereinführung von Wirkstoffen in die klinische Praxis, die aufgrund einer signifikanten Zytotoxizität bisher vermieden wurden.

V.1.3 Nachweismethoden der erythrozytären AmB Beladung

Der Nachweis der erythrozytären AmB-Beladung erfolgte aufgrund von Limitierungen einzelner Methoden mit 3 voneinander unabhängigen Verfahren. Beim ersten Verfahren, dem HPLC-Nachweis, handelt es sich um eine rein quantitative Messtechnik. Mit der entwickelten AmB-HPLC ließen sich durch isokratische Elution, bestehend aus Acetonitril und Methanol, AmB-Konzentrationen (Bestimmungsgrenze < 2.5 ng) aus einer geringen Probenmenge (20 µl) AmB-NS-RBCs analysieren. Die Parameter für analytische Richtigkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit entsprachen den internationalen Standards an eine robuste Methode [98]. Die ermittelte Bestimmungsgrenze von < 2.5 ng/ml ist vergleichbar mit publizierten Ergebnissen von Campanero *et al.* unter Berücksichtigung und Korrektur des eingesetzten Volumens [99]. Mögliche Fehlerquellen der HPLC Messung könnten in der AmB-Aufbereitung durch Proteinfällung liegen, da an die Membransterole gebundenes AmB theoretisch unzureichend herausgelöst werden könnte.

Über die exakte zelluläre AmB-Lokalisation konnte mit der HPLC keine Aussage getroffen werden. Neben einer intrazellulären Lage wäre theoretisch auch eine extrazelluläre AmB-Bindung an die Zellmembran denkbar gewesen [100]. Aufgrund dessen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der AmB-NS-RBCs angefertigt, in denen die intrazelluläre Lage der AmB-Kristalle dargestellt werden konnte.

Abschließend wurde überprüft, ob das in Erythrozyten eingeschlossene AmB biologisch aktiv ist. Nach mechanischer Zerstörung der AmB-NS-RBCs im Ultraschallbad wurde das freigesetzte AmB *in vitro* mit *C. albicans* inkubiert und die fungale Vitalität mit PI untersucht. Es konnte eine bis zu 100%ige fungale Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der eingesetzten Erythrozytenzahl nachgewiesen werden.

V.1.4 Markierung der AmB-NS-RBCs mit Eisenoxidnanopartikeln ermöglichte eine gesteigerte AmB-Beladung und Visualisierung der Zellen im MRT

Der zweite Schritt nach der Entwicklung einer erfolgreichen erythrozytären AmB-Beladungsstrategie bestand in der Schaffung einer zellulären magnetischen Markierung zur Visualisierung im MRT. Dabei stellen die in dieser Arbeit verwendeten Eisenoxidnanopartikel (Magnetite) nicht nur die bisher erfolgreichste Strategie zur Magnetisierung von Zellen dar sondern gehören ebenfalls zu einer Gruppe hochwirksamer Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie [101]. Bereits 1987 veröffentlichte Hahn erste Daten zu Kontrastmitteln auf Basis superparamagnetischer Eisenoxidpartikel [102]. Zudem beeinflussen sie nicht die zelluläre Vitalität, sind biokompatibel, nicht-immunogen und werden relativ schnell sowohl über die Leber als auch Nieren eliminiert [103].

Als Ersatz für ein biologisches System wurde für die MR-Bildgebung Agarose aufgrund ihrer gewebeähnlichen biologischen Eigenschaften (ähnlicher Wassergehalt, Viskosität) ausgewählt. Mit der angewendeten Technik konnte eine signifikante Kontrasterzeugung der Magnetit-AmB-NS-RBCs im MRT erzeugt werden. Die kontrasterzeugende Wirkung des Magnetits beruht auf einer Verzerrung des sonst homogenen Magnetfeldes, wobei es aufgrund der beschleunigten Dephasierung der umgebenden Protonen zu einer Reduktion der Relaxationszeit und somit Signalauslöschungen in den T2-gewichteten Bildsequenzen hervorruft, die als Hypointensität wahrgenommen werden können [104]. Dabei kann die Dephasierung räumlich deutlich über die

benachbarten Wasserprotonen hinausgehen und einen sogenannten signalverstärkenden „blooming effect“ hervorrufen [105].

Wie viel Erythrozyten für eine ausreichende Kontrastierung benötigt werden und ob die Methodik auf *in vivo* Systeme übertragen werden kann, wurde in dieser Arbeit nicht adressiert. Brähler *et al.* konnte jedoch in weiterführenden Untersuchungen das kernspintomographische Zelldetektionslimit von Magnetit beladenen Erythrozyten auf unter 1000 Zellen/ml festsetzen [106].

Überraschenderweise führte der Co-Einschluss von AmB mit Magnetit zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der AmB-Beladung um 34% in den RBCs. Betrachtet man die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, könnte dies zu der Vermutung hinleiten, dass die Membraneinlagerung von Magnetiten neben einer Stabilisierung der Zellmembran ebenfalls zu einer Behinderung der AmB-Interaktion mit den Membrancholesterolen der RBCs führen und somit eine erhöhte Beladungseffizienz ermöglichen. In der Literatur ist das Phänomen der Zellmembraneinlagerung/-penetration von Magnetiten zwar beschrieben [104, 106], jedoch ist dem bisher keine Bedeutung bei der Beladungseffizienz von Zellen zugeschrieben worden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um dieses Phänomen zu charakterisieren.

Das Anwendungsspektrum der zellulären Markierung mit Eisenoxidnanopartikeln reicht über die einfache Darstellung im MRT weit hinaus. Anstatt wie bisher die passive Verteilung konventioneller Kontrastmittel über einen kleinen Zeitfenster zu verfolgen, könnten nun mittels magnetisierter zellulärer Trägersysteme gezielte pathologische Prozesse wie inflammatorische Geschehen beobachtet werden [107] oder wie in dieser Arbeit angedeutet, ein therapeutisches Monitoring bzw. eine magnetische Fokussierung der AmB-NS-RBCs am Krankheitsherd erfolgen. Bisherige Arbeiten zu diesem Gesichtspunkt umfassen u. a. die intratumorale magnetische Fokussierung von Microspheres mit Doxorubicin, Mitraxone, Mitomycin C, Etoposid, Paclitaxel und Oxaliplatin [108]. Neben der Einschlusseffizienz ist bei diesen Anwendungen natürlich auch die Stabilität der Magnetitbeladung von essentieller Bedeutung. Im Gegensatz zur direkten intrazellulären Aufnahme von Magnetit durch das RES ist aufgrund der zusätzlichen Inkorporierung in RBCs von einer verzögerten intrazellulären Degradation aufgrund der Membranprotektion auszugehen, so dass *prima vista* eine längere Visualisierungsdauer möglich scheint. Über die genauen Prozesse der Biodegradation im RES nach Internalisierung der Magnetit-AmB-NS-RBC existieren zwar keine weiteren Studien,

jedoch muss ähnlich wie beim direkten Magnetiteinschluss in Makrophagen von einer Destabilisierung verursacht durch das saure Milieu in den Endosomen innerhalb von Tagen bis Wochen ausgegangen werden [109].

V.2 Leukozytäre Aufnahme und Freisetzung von AmB

V.2.1 AmB-NS-RBC werden effizient von Leukozyten aufgenommen und erhöhen die antifungale Potenz

Sobald *C. albicans* in die Blutbahn gelangt, spielen phagozytierenden Zellen des angeborenen Immunsystems eine entscheidende Rolle in der Begrenzung oder Ausbreitung der Pilzinfektion auf verschiedene Organsysteme wie Niere, Lunge und Gehirn. Daher war die Rekrutierung von MNC und insbesondere PMN als Haupteffektoren der antifungalen Immunantwort von enormer Bedeutung, um die Immunität des Wirtes durch gezieltes Targeting des Steuerzentrums für die antifungalen Immunabwehr zu verstärken [20, 110].

Während einer Pilzinfektion dienen Leukozyten neben der primären Pilzabtötung auch als Reservoir für die weitere Pilzvermehrung und -ausbreitung, da maximal 20 - 30% der internalisierten Pilze pro Leukozyt getötet werden [8]. Sie bilden damit wichtige Vehikel für die fungale Dissemination. Somit hypothesierten wir, dass der Einschluss von AmB in ein biologisches Trägersystem mit Leukozyten als Endziel, einen idealen Ansatz zur gezielten Verstärkung der Haupteffektoren bei der Bekämpfung von Pilzinfektionen und Erhöhung der Wirkstoffakkumulation an den Orten der aktiven Infektion bildet. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass Leukozyten ein über den gesamten Organismus verbreitetes System von Zellen mit uneingeschränktem Gewebezutritt verfügen, dass die Medikamentenakkumulation erheblich erleichtert. Ausgenutzt wird dieser biologische Mechanismus bei Therapie von Lebertumoren und Infektionen mit primärem Befall von Zellen und Geweben des makrophagozytären Systems (MPS Tropismus): als Beispiele hierfür sind *Leishmania* spp. [111], HIV [112], *Salmonella* spp. [64], *Mycobacteria* spp. [69], *Legionella* [64] und wie in dieser Arbeit geschildert *Candida* spp. zu nennen.

Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz der indirekten Medikamentenbeladung von Leukozyten durch den Einsatz von RBCs als primäre Medikamententransporter, haben einige Autoren die direkte Phagozytenbeladungen mit Medikamenten beschrieben [64]. Als Beispiel sei an dieser Stelle Indinavir, ein anti-retrovirales

Therapeutikum, genannt, dass als Nanopartikel *via* Endozytose in Makrophagen eingeschleust wurde und zu einer signifikanten Reduzierung der Viruslast führte [112]. Der Grund für die gewählte Vorgehensweise der indirekten Beladung beruhte auf der Annahme, dass eine direkte leukozytäre AmB-Exposition Schäden induzieren könnte, die ihre Funktionalität als Immuneffektorzellen einschränken [113]. Weitere Vorteile des Einsatzes von RBCs als primäre Vehikel finden sich unter Kapitel V.1.2.

Wie bereits zuvor angedeutet, basiert die Grundidee dieser Arbeit auf die Ausnutzung des leukozytären Targetings und ihrer meist unerwünschten Eliminationsfähigkeiten, um die zelluläre antifungale Immunabwehr zu verstärken und AmB zum Infektionsort zu transportieren. Dabei ist der Schlüssel zum Erfolg eines solchen DDSs im wesentlichen von der AmB-Akkumulation in den Leukozyten abhängig. Es mussten daher verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein, um es den Erythrozyten als Vehikel zu ermöglichen, AmB in die Leukozyten zu transportieren. Zu den Voraussetzungen zählten, dass die AmB-NS-RBC (i) von den Leukozyten erkannt, (ii) leicht adhärert und internalisiert werden, (iii) den Wirkstoff stabil einschließen und (iv) die leukozytäre Vitalität und Funktionalität nach deren Aufnahme nicht beeinträchtigen.

Mittels Durchflusszytometrie konnte demonstriert werden, dass AmB-NS-RBCs rasch von den Leukozyten erkannt und internalisiert wurden. Im Durchschnitt wurden 4 - 5 AmB-NS-RBCs pro Zelle in > 98% der Leukozyten internalisiert, entsprechend einer soliden AmB-Beladungsmenge von 14 - 16 pg/Leukozyt. Die Phagozytoseeffizienz der AmB-NS-RBC war dabei vergleichbar mit Beobachtungen von Vaysse *et al.*, wonach durchschnittlich 5 ± 0.5 seneszente RBCs pro Zelle internalisiert werden [114]. Die leukozytäre Aufnahmekapazität ist jedoch nicht unbeschränkt. Eine 5 - 10 fach gesteigerte Erythrophagozytose, entsprechend einer Aufnahme von mehr als ca. 6 - 7 RBCs pro Zelle, kann signifikante Funktionsbeeinträchtigungen des Leukozyten durch Apoptoseinduktion aufgrund von oxidativem Stress verursachen [115]. Daher wurde in dieser Arbeit auf zusätzliche Methoden zur Steigerung der Phagozytoseeffizienz verzichtet. Unter ihnen zählt das Protein Bande 3 Clustering der RBCs zu den am häufigsten angewendeten Verfahren [56]. Historisch geht diese Methode auf Beobachtungen von Arese *et al.* zurück, der das Proteinclustering als ein Seneszenzsignal für Phagozyten identifizierte und durch die Behandlung von Zellen mit Zn^{2+} getriggert werden kann [56].

Die leukozytäre Internalisierung der AmB-NS-RBCs war keineswegs ein verallgemeinerbares Phänomen. Weitere durchgeführte Untersuchungen belegten, dass die Eliminationseffizienz vor allem aber nicht ausschließlich von der PS-Exposition auf der Zelloberfläche der AmB-NS-RBC abhängig war, dass somit als Signal für die rasche Erkennung und leukozytäre Aufnahme diente [116]. Neben PS scheinen jedoch noch weitere Faktoren eine Rolle zu spielen. Bei einem vergleichenden Experiment zwischen der Phagozytose von leeren RBCs und AmB-NS-RBCs wurde eine deutlich geringere Internalisierung der leeren RBCs beobachtet trotz gleicher PS Exposition (**Abb. V-1A, B**). Eine Erklärung für diese Beobachtung liefert Bennett *et al.*, dass die Bindung von PS als Voraussetzung für die Phagozytose von RBCs zwar notwendig ist, aber für den Ablauf allein nicht ausreichend und zusätzliche Faktoren notwendig sind [117]. Da beide RBC Populationen (AmB-NS-RBC, leere RBC) derselben hypoosmotischen Behandlung unterzogen wurden, wären beispielsweise AmB induzierte, nicht detektierte Veränderungen der Zellmembran oder Antikörperbindungen an die AmB-NS-RBC eine denkbare Ursache für die erhöhte phagozytäre Aufnahme im Vergleich zu der leeren RBC Population.

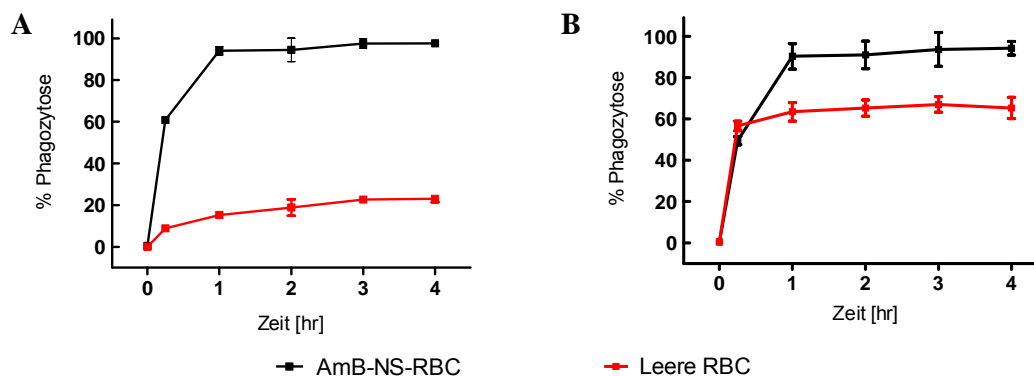


Abb. V-1: Phagozytose von AmB-NS-RBCs und leeren RBCs durch PMN (A) und MNC (B). Im Vergleich zu den AmB-NS-RBCs konnte eine deutlich geringere Eliminationsrate der leeren RBCs festgestellt werden.

Nach der erfolgreichen Phagozytose von AmB-NS-RBCs erfolgte der intrazelluläre Transport, der zwei kritische Schritte, nämlich die Degradation der AmB-NS-RBCs im Phagolysosomen mit dem Austritt von AmB in das zytoplasmatische Kompartiment und die extrazelluläre AmB-Freisetzung, beinhaltet. **Abbildung V-2** gibt eine Übersicht über die vorgesehenen intrazellulären Prozessierungsschritte [69]. Danach werden die AmB-NS-RBCs nach der zellulären Internalisierung zunächst dem Milieu des Zytosols (pH ~ 7) ausgesetzt und in die Phagosomen aufgenommen. Aufgrund des pH Milieus und seines lipophilen Charakters kann AmB nach Abbau der RBC Membran die Phagosomen nicht verlassen. Sobald Enzymvesikel

aus dem trans-Golgi Netzwerk mit den Phagosomen verschmelzen, verringert sich der pH-Wert schrittweise und die Löslichkeit von AmB nimmt zu, was letztendlich bei einem pH von 3 - 4 zum Austritt von AmB in das zytoplasmatische Kompartiment führt (**Abb. V-2A**). Im Zytoplasma befindliches AmB kann an dieser Stelle bereits intrazellulär befindliche *C. albicans* inhibieren, den fungal induzierten leukozytären Zelltod verringern und damit signifikant zur antifungalen Kompetenz der Leukozyten beitragen (**Abb. V-2B**). Anschließend folgt die kontinuierliche extrazelluläre Freisetzung von AmB durch Diffusion (siehe Kapitel V.2.2) über einen Zeitraum von Wochen. Dabei war die Menge von AmB, die aus den Leukozyten (Konzentration 10^6 Zellen/ml) diffundierte über den gesamten Beobachtungszeitraum oberhalb des therapeutischen Schwellenwertes von $0.5 \mu\text{g/ml}$ für *C. albicans* ATCC 10231, was zu einer überlegenen extrazellulären Pilzabtötung führte, jedoch ohne offensichtliche zytotoxische Auswirkungen für die Immunzellen.

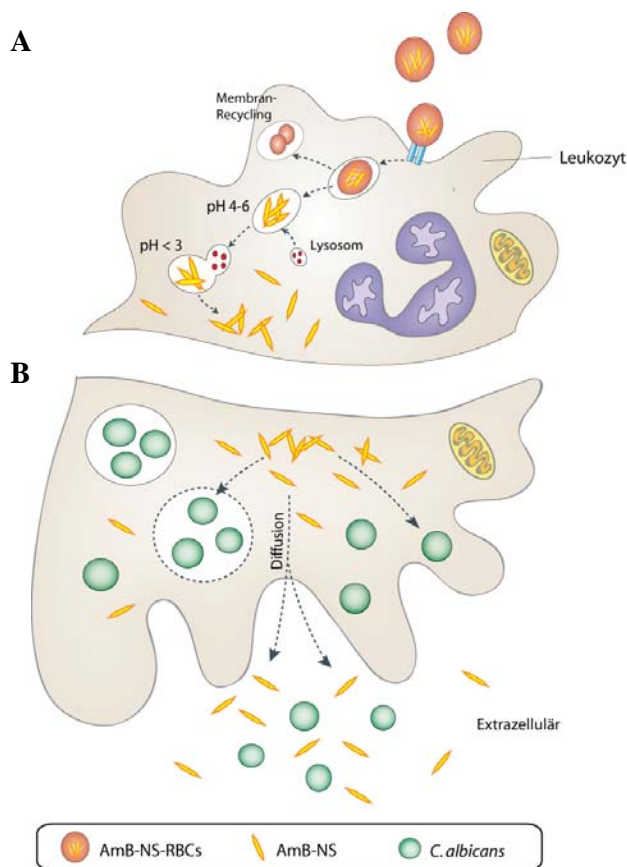


Abb. V-2: Schema des intrazellulären Transports und der Degradation von AmB-NS-RBCs und deren antifungale Aktivität.

A) AmB-NS-RBCs werden durch auf der Zelloberfläche befindliches PS von den Leukozyten erkannt und phagozytiert. Sobald Enzymvesikel aus dem trans-Golgi Netzwerk mit den Phagosomen verschmelzen, verringert sich der pH-Wert, die Löslichkeit von AmB nimmt zu, und AmB tritt aus dem Phagolysosomen in das zytoplasmatische Kompartiment über.

B) Im Zytoplasma befindliches AmB inhibiert intrazellulär aufgenommene *C. albicans* und versärkt damit antifungale Kompetenz der Leukozyten. Anschliessend folgt die extrazelluläre Freisetzung von AmB durch Diffusion. Der AmB-Efflux ist kontinuierlich und inhibiert extrazellulär befindliche *C. albicans*.

Neben einer verbesserten extrazellulären Pilzabtötung war der Anstieg der intrazellulären fungalen Wachstumsinhibition nach der leukozytären AmB-NS-RBC Aufnahme ebenso bemerkenswert. Dass AmB beladene Leukozyten die intrazelluläre Abtötungsrate erhöhen,

wurde bereits von Perfect *et al.* und Pallister *et al.* beschrieben [80, 81]. Für diese Arbeit wurde ein auf Perfect's Publikation basierender Test verwendet, jedoch mit dem Unterschied, dass die Leukozyten nicht direkt AmB ausgesetzt wurden sondern die AmB-Aufnahme über RBCs als Transportvehikel erfolgte. Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelläre antifungale Aktivität um ca. 84% für PMNs und MNCs gesteigert werden konnte, was in Bezug auf MNCs im Einklang mit den Ergebnissen steht, die von Perfect veröffentlicht wurden [80]. Im Gegensatz zu dieser Studie konnte Perfect keine erhöhte Abtötungspotenz für PMNs nachweisen und führte dies auf ihre Fragilität und kurze Lebensspanne zurück. Pallister *et al.* hingegen demonstrierte eine erhöhte intrazelluläre fungale Abtötung für PMNs, die allerdings mit 10 - 15% geringer als in dieser Arbeit ausfiel [81].

Der durch die leukozytäre AmB-NS-RBC Internalisierung eintretende Depoteffekt ermöglicht über die kontinuierliche phagozytäre AmB-Freisetzung eine deutliche Reduzierung der C_{max} und eine Verlängerung der AmB Halbwertszeit. Insbesondere Substanzen wie AmB, bei denen die Toxizität durch Peak-Plasma-Werte und die therapeutische Effizienz AUC vermittelt werden, profitieren von dieser Darreichungsmethode [69]. Speziell bei resistenten Stämmen, die ein zunehmendes Problem für immunsuppressive Patienten darstellen, ermöglicht ein solches DDS theoretisch den Einsatz höherer Medikamentendosen. Der beobachtete Depot-Effekt von > 10 Tagen für MNCs könnte zusätzlich komplexe Dosierungsschemata drastisch vereinfachen, und damit durch Senkung der Behandlungskosten bei gleichbleibender Effektivität die Kosten-Nutzen Ratio verbessern.

V.2.2 Die leukozytäre AmB Freisetzung folgt dem Diffusionsmodell

AmB-NS-RBC beladene Leukozyten wiesen initial einen stabilen intrazellulären Einschluss des Wirkstoffs AmB auf infolge des Vorhandenseins einer intakten Zellmembran, die als Trennschicht zwischen Innen- vom Außenmilieu dient. Zellmembranen bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden, die als Lipiddoppelschicht die Grundsubstanz der Membran bilden und Cholesterinen, die eine hydrophobe Wechselwirkung mit den Lipiden eingehen. Dabei bilden die hydrophoben C-Ketten den Kernbereich der Doppelschicht, die hydrophilen Kopfgruppen werden nach außen angeordnet [118].

In der Literatur existieren 2 verschiedene Modelle um die Kinetik von Medikamenten durch eine Lipiddoppelschicht zu beschreiben: **(1)** Diffusionsmodell und **(2)** Flip-Flop Modell [119]. Das Diffusionsmodell ist abgeleitet vom ersten Fick'schen Gesetz während das Flip-Flop Modell auf

einem Drei-Stufen-Prinzip basiert: Penetration der ersten Lipidschicht, Translokation (Flip-Flop) von der ersten in die zweite Lipidschicht und Substanzfreisetzung aus der zweiten Lipidschicht. Substanzen, die dem Flip-Flop Modell folgen, sind in der Regel amphiphile Verbindungen und können als Lipid-ähnliche Strukturen angesehen werden, wenn sie sich in einer biologischen Membran bewegen [119]. Da es sich bei AmB jedoch um ein hydrophobes, lipophiles Molekül handelt [29, 30], kann das Flip-Flop Modell nicht zur Anwendung kommen, in diesem Fall muss das Diffusionsmodell eingesetzt werden.

Im Diffusionsmodell wird die Lipiddoppelschicht als homogene, lipophile Lösung betrachtet. Dabei werden Substanzen zuerst in diese Lösung aufgenommen, durchwandern die Membran und werden im Folgenden auf der anderen Seite freigesetzt. Die Diffusion wird dabei als dynamischer Prozess angesehen und basiert auf Fick's erstes Gesetz (**Gl. 11**):

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad [\text{Gl. 11}]$$

Nach dem 1. Fick'schen Gesetz ist die Fluss J ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) einer Substanz proportional zum Konzentrationsgradienten entgegen der Diffusionsrichtung $\partial c/\partial x$ ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-4}$). Der Diffusionskoeffizient D ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) einer beliebigen Barriere ist konstant.

Die Diffusion durch ein biologisches Membransystem folgt der folgenden Formel [119]:

$$J = \frac{dM}{dt * A} = \frac{D * P}{\partial x} (C_d - C_r) = Perm * (C_d - C_r) \quad [\text{Gl. 12}]$$

Der Flux J einer Substanz (Permeationsmenge M pro Zeitintervall dt und Membranfläche A) hängt von dessen Verteilungskoeffizienten (P) zwischen durch eine Membran getrennte verschiedene Flüssigkompartimente, dem Konzentrationsgradienten [C_d = Konzentration im Donor (abgebenden Kompartiment); C_r = Konzentration im Recipient (aufnehmendes Kompartiment)], der Membrandicke ∂x und dem Diffusionskoeffizienten D ab. Der Permeationskoeffizient $Perm$ [cm/s] ist dabei ein Maß für die Substanzpermeation durch die Membran (∂x) in einem definierten Zeitraum. Basierend auf dieser Annahme ergibt sich nach Kramer *et al.* Gleichung 13, wobei ΔC_d die Differenz zwischen der Konzentration zum Zeitpunkt t und die Konzentration zum Zeitpunkt des Equilibriums beschreibt (**Gl. 13**) [119]:

$$\Delta C_d(t) = C_d(t) - C_d(\infty) \quad [\text{Gl. 13}]$$

Um zu überprüfen, ob die AmB Evasionkinetik in dieser Arbeit dem Diffusionsmodell folgt, wurden von Gleichung 13 folgende Formeln nach allgemeinen mathematischen Prinzipien abgeleitet unter Berücksichtigung des Substanzhinstroms (k_{dr}) und Rückstroms (k_{rd}) pro Zeiteinheit t :

$$\Delta C_d(t) = \Delta C_d(0) e^{-(k_{dr}+k_{rd})t} \quad [\text{Gl. 14}]$$

$$\ln \frac{\Delta C_d(t)}{\Delta C_d(0)} = -(k_{dr} + k_{rd}) * t \quad [\text{Gl. 15}]$$

$$\ln \Delta C_d(t) - \ln \Delta C_d(0) = -(k_{dr} + k_{rd}) * t \quad [\text{Gl. 16}]$$

$$\lg(C_d(t) - C_d(\infty)) = \lg(C_d(0) - C_d(\infty)) - \lg e * (k_{dr} + k_{rd}) * t \quad [\text{Gl. 17}]$$

Anhand der Gleichung 17 sollte bewiesen werden, dass die intrazelluläre AmB Konzentration zu einem beliebigen Zeitpunkt dem Diffusionsmodell folgt. Dazu muss demonstriert werden, dass zwischen $\lg \Delta C_d(t)$ und t ein lineares Verhältnis vorliegt, wobei $\lg(C_d(0) - C_d(\infty))$ sowie $\lg e * (k_{dr} + k_{rd})$ Konstanten sind. Das Equilibrium wurde theoretisch mit 2.87 $\mu\text{g/ml}$ für MNC bzw. 4.16 $\mu\text{g/ml}$ für PMN bestimmt.

Abbildung V-3 zeigt ein lineares Verhältnis zwischen $\lg \Delta C_d(t)$ und der Zeit t in Tagen. Anhand dieser Kalkulation kann davon ausgegangen werden, dass die AmB Effluxkinetik dem Diffusionsmodell zugrunde liegt.

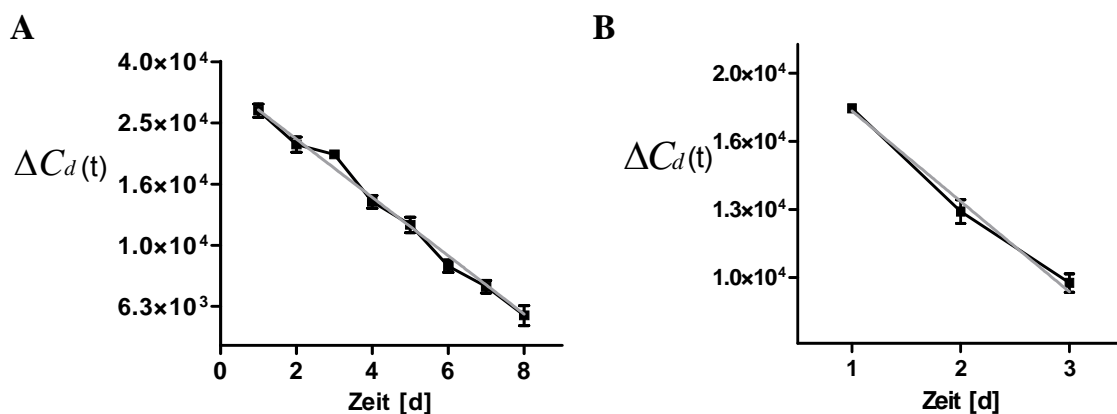


Abb. V-3 A und B: Die leukozytäre AmB Freisetzung aus MNC (A) und PMN (B) folgt dem Diffusionsmodell.

Die Y-Achse zeigt $\Delta C_d(t)$, dargestellt im Logarithmus, zu einem beliebigen Zeitpunkt [d] (X-Achse, linear).

Zwischen $\lg \Delta C_d(t)$ und der Zeit (t) besteht ein lineares Verhältnis.

V.3 „Du bist, was du isst“ - Auswirkungen der phagozytären AmB-NS-RBC Aufnahme auf die Funktionalität der Leukozyten

Bei der beabsichtigten, PS vermittelten phagozytären Internalisierung der AmB-NS-RBC standen neben dem summarischen Effekt zum ersten Mal auch die Evaluierung der Zell-Wechselwirkungen im Vordergrund, da eine Beeinträchtigung der Funktionalität der Leukozyten, als Haupteffektorzellen des Immunsystems, ernsthafte Nebenwirkungen hervorrufen könnte. Abgesehen von der bereits erwähnten Interaktion zwischen AmB und Zellmembranen, die aufgrund der Zytotoxizität die maximale Anwendungsdosis von AmB-D auf 1 mg/kg/d limitiert, inhibiert AmB wesentliche Abwehrmechanismen u. a. durch Veränderungen im Phagozytoseverhalten und der Burstproduktion sowie Verminderung der T und B Zell Proliferation [82, 113]. Weiterhin musste berücksichtigt werden, dass die Immunantwort der Leukozyten in Abhängigkeit von der Art des aufgenommenen Substrats anti- oder pro-inflammatorischen Einflüssen unterliegt [120]. In dieser Arbeit wurden PS-exponierende Erythrozyten verwendet, die die Zelloberflächeneigenschaften von apoptotischen Partikeln aufweisen und daher anti-inflammatorische Veränderungen herbeiführen können. **Tabelle V-4** stellt einen kurzen Vergleich zu immunologischen Auswirkungen der Phagozytose von inflammatorischen und apoptotischen Partikeln dar.

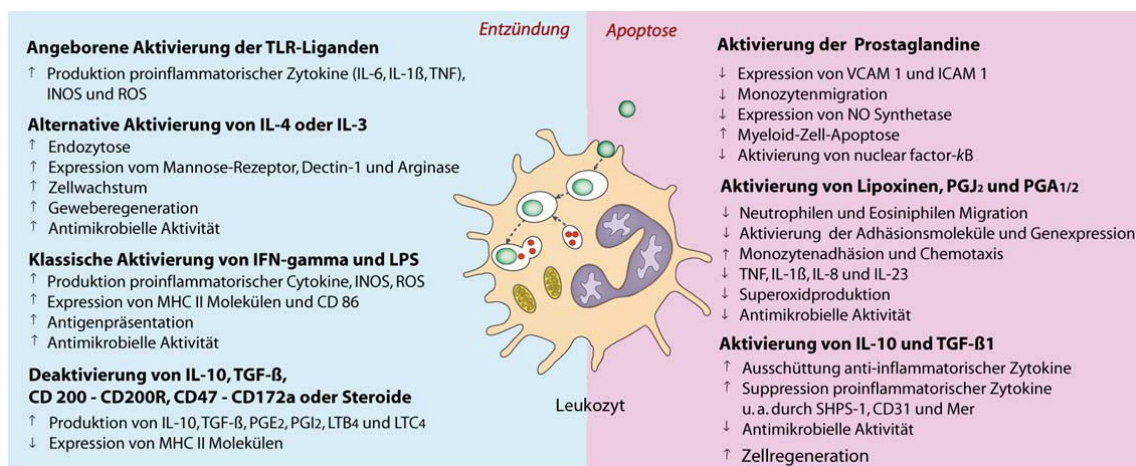


Abb. V-4: Auswirkungen der Phagozytose von entzündlichen und apoptotischen Substraten auf die Aktivität von Leukozyten (modifiziert nach [120])

Daher war es von entscheidender Bedeutung die Funktionalität der Immunzellen und der Immunantwort sicherzustellen, um die antifungale Wirtsantwort zu stärken.

V.3.1 Die Internalisierung der AmB-NS-RBCs hat keine Auswirkungen auf die leukozytäre Zellvitalität

Der erste Aspekt in diesem Zusammenhang untersuchte die Beziehung zwischen der leukozytären, intrazellulären AmB-Akkumulation und Zellvitalität. Die Vitalitätsbeurteilung erfolgte durch die zum Goldstandard zählende Doppelfärbung aus Annexin V und Propidiumiodid [121].

Trotz einer signifikanten AmB Beladung der Leukozyten von 14 - 16 pg pro Zelle wurden anhand der verwendeten Untersuchungsmethodik weder kurz- noch langfristige Erhöhungen der PS-Präsentation auf der Zelloberfläche als Zeichen einer Reduktion der Zellvitalität im Vergleich zur Normalpopulation beobachtet. Im Gegensatz dazu weisen Leukozyten, die ähnlichen Konzentrationen an freiem AmB-D (5 µg/ml) ausgesetzt werden, signifikante Einschränkungen der Vitalität auf [122]. Das Spektrum der AmB induzierten zytotoxischen Schädigung umfasst neben der Zellyse durch Bindung an Cholesterole der Zellmembran, die Initiierung einer pro-inflammatorischen Antwort mit IL-1 β und TNF- α u. ä. [82, 123] sowie apoptotische Prozesse [124]. Die Ergebnisse zeigen, dass durch den stabilen Einschluss von AmB-NS in RBCs und deren direkte Aufnahme in die endosomalen Kompartimente ein zellprotektiver Effekt für Leukozyten erzielt werden kann und zytotoxische Nebenwirkungen erheblich minimiert werden. Ähnliche zellprotektive Effekte in Bezug auf die Zellvitalität wurden bereits mit der Einführung von AmB-Liposomen beobachtet [125]. Damit stellen AmB-NS-RBCs nicht nur eine kostengünstige und beladungseffizientere Alternative zu den herkömmlichen Liposomen dar, sondern werden auch gut von den MNCs und PMNs hinsichtlich der Vitalität toleriert.

V.3.2 Die Internalisierung der AmB-NS-RBCs führt zu transienten Einschränkungen der Phagozytose und Burst Produktion

Nachdem demonstriert werden konnten, dass die Vitalität der Immunzellen durch die AmB-NS-RBC Beladung nicht beeinträchtigt wird, schloss sich als nächster Schritt die Bestimmung der phagozytären Funktionskapazität nach der Beladung an. Im Fokus der Untersuchungen standen die Phagozytose und die oxidative Burstproduktion.

Die Beurteilung der Phagozytose erfordert Methoden, die zwischen phagozytierten und Membran-gebundenen Partikeln unterscheiden können; unter ihnen zählen die (1) Fluoreszenz-

Mikroskopie [126] und (2) Fluoreszenz-Durchflusszytometrie [127] zu den Standardmethoden. In dieser Arbeit wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie zur Untersuchung der leukozytären Phagozytosekapazität nach erfolgter AmB-NS-RBC Aufnahme verwendet. Als Substrat für die Bestimmung der leukozytären Phagozytosekapazität dienten opsonierte, FITC-markierte *C. albicans* Zellen, da diese zum einen aus klinischer Sicht relevanter sind als beispielsweise Zymosanpartikel und zum anderen molekulare Phagozytosemechanismen von der Vitalität des Pathogens abhängen [128]. Dabei kommt der Zellwand von *C. albicans* eine große experimentelle Bedeutung zu, da sie in Bezug auf Virulenz, Morphologie und Diagnostik eine wichtige Rolle spielt. Durch die Interaktion zwischen den β -Glukanstrukturen in der fungalen Zellwand mit den Immunzellen wird *via* Dectin-1 eine mikrobizide Immunantwort inkl. Phagozytose, assoziierter H_2O_2 -Produktion und der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine generiert [22].

Die Phagozytose opsonierter, FITC-markierter *C. albicans* nach erfolgter AmB-NS-RBC-Aufnahme wurde an zwei verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die verwendete Fluoreszenzmethode beruht auf Beobachtungen von Busetto *et al.*, wonach der Vitalfarbstoff Trypanblau (TB) bei der Bindung an grünfluoreszierende Partikel rot fluoresziert [85]. Diese Eigenschaft zusammen mit der Unfähigkeit von TB intakte, humane Zellmembranen zu durchdringen, wurde unserer Untersuchung zugrunde gelegt, um gleichzeitig Membran-gebundene und ingestierte *C. albicans* Partikel während der Phagozytose zu beurteilen. Somit wurde eine FITC-Fluoreszenzzunahme der Leukozyten als ein Maß für die Internalisierung gewertet, während eine Zunahme der PI-Fluoreszenz als Maß für die Adhärenz von Pilzzellen an Leukozyten bewertet wurde.

Die Prä-Inkubation der Leukozyten mit AmB-NS-RBCs führte zu einer transienten Verminderung der Phagozytoseaktivität von *C. albicans* um ca. 30% während der phagozytotische Aktivitätsgrad unbehandelter Immunzellen (Kontrollwert) größtenteils publizierten Ergebnissen von Busetto *et al.* entsprach [85]. Diese initial geminderte Phagozytoseaktivität könnte in einer funktionellen Schädigung der Leukozyten durch AmB ihre Ursache haben, wahrscheinlicher jedoch führte die vorhergegangene Aufnahme der AmB-NS-RBCs zur Beeinträchtigung der Phagozytose. Zwar ist aus der Literatur bekannt, dass eine phagozytäre Exposition von AmB-D und unterschiedlichen AmB-Formulierungen mit einer verringerten Phagozytose einhergeht [81], jedoch würde man aufgrund der AmB assoziierten Zytotoxizität eher eine permanente Schädigung erwarten. Da bei den durchgeführten

Experimenten jedoch eine transiente Phagozytosereduktion beobachtet wurde, könnte der zugrunde liegende Mechanismus neben einer Auslastung der leukozytären Phagozytosekapazität ebenso mit der vorausgegangenen PS-abhängigen Phagozytose der AmB-NS-RBCs assoziiert sein. Ähnliche Beobachtungen wurden von Hirt und Johann *et al.* gemacht, die eine signifikante Reduktion der Phagozytose in Anwesenheit oder Prä-Inkubation mit PS-Liposomen beschrieben [129, 130]. Nach der Internalisierung PS-präsentierender Zellen, sezernieren Phagozyten anti-inflammatorische Zytokine, die die weitere Ausschüttung von pro-inflammatorischen Stoffen unterdrücken und somit zu einer Minderung der aktiven Phagozytose führen [131]. Dabei kann der Effekt - wie in unseren Beobachtungen beschrieben - von transients Dauer sein [132]. Die exakten Mechanismen, durch die PS-exponierende Zellen Leukozyten modulieren, sind zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig verstanden und nicht Fokus dieser Arbeit; exzellente Zusammenfassungen zum aktuellen Wissensstand finden sich unter Birge *et al.* [133]. Inwieweit PS für die transiente Phagozytosereduktion verantwortlich ist, konnte anhand der erhobenen Daten nicht mit Sicherheit festgestellt werden, da es aufgrund der angewendeten Lyseprozedur technisch unmöglich war, RBCs ohne signifikante PS Externalisierung herzustellen.

Die durchflußzytometrische Messung des „*respiratory burst*“ aktivierter Leukozyten ist eine sensitive Methode zur Erfassung der Sauerstoffanionenbildung [134]. Die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies nach Stimuli wie Phagozytose oder verschiedenen inflammatorischen Mediatoren ist assoziiert mit einer proportionalen Zunahme der Konvertierung von nicht-fluoreszierenden Dihydroxyrhodamin 123 zum fluoreszierenden Rhodamin 123, wodurch eine Quantifizierung der Burstaktivität ermöglicht wird [134]. Nach der leukozytären Aufnahme der AmB-NS-RBC konnte unter Anregung mit PMA und *C. albicans* eine um ca. 50% abgeschwächte Sauerstoffanionenbildung nachgewiesen werden, wohingegen fMLP im Vergleich zur Normalpopulation tendenziell eher zu einer leicht gesteigerten, jedoch im Normbereich befindlichen Radikalbildung anregte. Ursächlich für diese gegensätzliche Beobachtung könnten die unterschiedlichen Ansatzpunkte der Stimulanzen in der Signalkaskade sein (**Abb. V-5**).

Am Anfang der Signaltransduktionskette, die mit der Bindung von fMLP an den fMLP-Rezeptor beginnt, steht die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die an der Zellmembran assoziiert ist. Die Aktivierung der PLC führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), was zur Entstehung von Myoinositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) und 1,2-diacylglycerol (DAG) führt. IP₃ löst seinerseits die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Kalzium aus,

dass zusammen mit DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert [135, 136]. PMA dagegen durchdringt die Zellmembran und führt rezeptorunabhängig zur direkten (maximalen) Aktivierung der PKC *via* Mimikry von DAG, das ein direktes Substrat der PKC darstellt [137]. Ähnlich wie PMA, ist die PKC für die Phagozytose von *C. albicans* ebenfalls von zentraler Bedeutung [138]. Káposzta *et al.* demonstrierte, dass die *C. albicans* Internalisierung vor allem von der PKC-Aktivität abhängt und durch PKC Inhibitoren wie Staurosporin bereits in geringen Konzentrationen erheblich gehemmt werden kann [138]. Daher könnte eine verminderte Aktivität und/oder Mangel an PKC durch die vorhergehende Phagozytose der AmB-NS-RBCs verantwortlich für die Abnahme des oxidativen Bursts bei PMA und *C. albicans* sein, während ein geringer PKC Mangel bei submaximaler Stimulation, wie hervorgerufen von fMLP, verdeckt geblieben wäre.

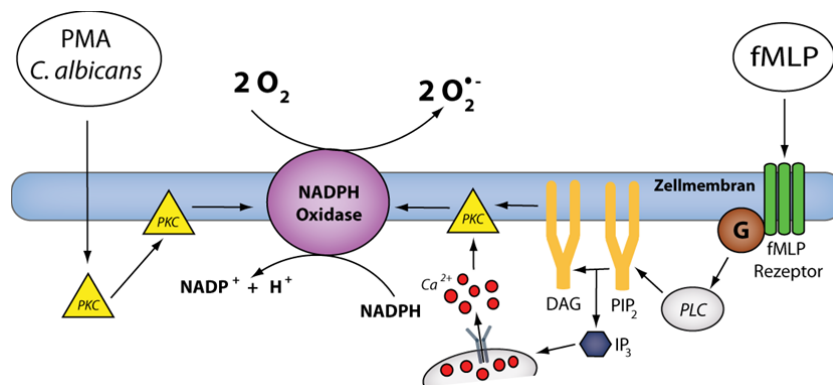


Abb: V-5: Signalkaskade des oxidativen Bursts in Abhängigkeit der Stimuli PMA, *C. albicans* und fMLP.

Inwieweit jedoch die Inkorporation von AmB für diese Änderungen im Zellstoffwechsel verantwortlich gemacht werden kann, sollte durch eine Gegenüberstellung von Leukozyten, die mit AmB-NS-RBCs und Leukozyten, die mit leeren RBCs beladen wurden, verdeutlicht werden. Beschriebene Auswirkungen von AmB auf den oxidativen Burst sind variabel und beinhalten Stimulation, Inhibition oder keine Interaktion [139]. Überraschenderweise zeigten Leukozyten, die mit leeren RBCs beladen wurden, dieselbe Reaktion auf die Stimuli PMA, fMLP und *C. albicans* wie AmB-NS-RBC-MNC bzw. -PMN, so dass ein Einfluss von AmB auf die Sauerstoffanionenproduktion ausgeschlossen werden konnte. Vielmehr stimmen die in dieser Arbeit beschriebenen Daten mit Beobachtungen von Johann und Hirt *et al.* überein, wonach die vorausgegangene PS-abhängige Phagozytose, wie im Fall der Internalisierung von AmB-NS-RBCs und leeren RBCs, zu einer transienten Abschwächung des oxidativen Bursts führen kann [129, 130, 140]. Ein plausible Erklärung für diese Beobachtung liefert der Fakt, dass PS selbst ein Aktivator der PKC ist [141]. Demnach könnte durch die PS vermittelte Phagozytose der

RBCs und der damit verbundenen Aktivierung der PKC ein relativer PKC Mangel auftreten, der für die reduzierte Burstaktivität unmittelbar nach der RBC Aufnahme verantwortlich ist. Eine weitere Ursache könnte im sogenannten „Priming“ der Leukozyten begründet liegen, wonach die Intensität der ROS Produktion von der Anwesenheit bestimmter stimulierender Zytokine (z. B. TNF- α) oder inhibitorischer Faktoren, wie PS, abhängt [135, 140]. Aktueller Forschung zufolge handelt es sich hierbei um einen transienten, reversiblen Vorgang [132]. Dies würde damit auch die nach 24 Stunden beobachtete Normalisierung der Zellfunktion (Phagozytose und oxidativer Burst) auf das Kontrollniveau erklären.

V.4 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, Erythrozyten als *drug carrier* für schwerlösliche Arzneistoffe am Beispiel von AmB zu etablieren sowie die Effizienz des phagozytären Systems als Arzneistofftransporter und –reservoir bei einer *C. albicans* Infektion zu evaluieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RBCs schnell und effizient mit einer AmB-NS beladen werden können, dessen molekularer prozentualer AmB-Anteil mit 41% sogar deutlich höher liegt als bei lipid-assoziierten Formulierungen wie Ambisome und ABLC. Mehr noch, AmB-NS-RBCs wurden effektiv von den Leukozyten phagozytiert. Jeder Leukozyt ingestierte zwischen 4 - 5 AmB-NS-RBCs entsprechend einer intrazellulären AmB-Akkumulation von ca. 14 - 16 pg AmB/Zelle, das eine signifikante Steigerung der intra- und extrazellulären Pilzabtötung herbeiführte. Weiterhin konnten mittels der kontinuierlichen AmB-Freisetzung *via* Diffusion stabile Wirkstoffkonzentrationen oberhalb der MHK_{90} über einen Zeitraum von 10 Tagen erreicht werden. Mit diesem DDS könnten somit in der Zukunft komplexe Dosierungsschemata vereinfacht und Wirkstoff assoziierte Toxizitäten vermindert werden. Insbesondere erhofft man sich durch die Rekrutierung der Haupteffektoren (Immunzellen) als *drug carrier*, die antifungale Immunantwort gezielt zu verstärken – ähnlich einem trojanischen Pferd. Das ist allerdings nur dann möglich, wenn die Immunzellen nach der Aufnahme der AmB-NS-RBCs ihre Funktionalität beibehalten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die AmB-NS-RBC Aufnahme der Immunzellen zu keinen permanenten Einschränkungen in der Vitalität, Phagozytose und oxidativem Burst führt. Daher muss geschlossen werden, dass das beschriebene DDS eine exzellente Alternative zu den bisher entwickelten AmB-Formulierungen darstellt und daher durchaus im Menschen klinische Anwendung finden kann insbesondere bei Infektionen mit primärem Befall des makrophagozytären Systems.

VI Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten hat die Häufigkeit invasiver Pilzinfektionen - vor allem verursacht durch *C. albicans* - dramatisch zugenommen und ist insbesondere bei immungeschwächten Patienten mit einer erheblichen Mortalität verbunden. Dabei spielen die phagozytierenden Zellen des Immunsystems, Mononzyten (MNC) und Neutrophile (PMN), eine entscheidende Rolle in der Infektionsbegrenzung und Dissemination. Das Polyenantibiotikum Amphotericin B (AmB) gehört zum therapeutischen Goldstandard; der klinische Einsatz ist jedoch durch ein fulminantes Nebenwirkungsprofil stark eingeschränkt. Anstrengungen die Toxizität mit der Synthese von AmB Analoga und Lipid-Formulierungen zu mindern, führten nicht zum Erfolg und machen die Entwicklung neuer Strategien dringend erforderlich. Daher hypothesierten wir, dass die Rekrutierung von Leukozyten zum AmB Transport einen idealen Ansatz zur gezielten Verstärkung der Pilzabwehr und Erhöhung der Wirkstoffkonzentration am Infektionsherd bildet. Um das Risiko einer AmB induzierten Zytotoxizität auf die Leukozyten zu reduzieren, wurden Erythrozyten (RBCs) aufgrund ihrer exzellenten Beladungseigenschaften als primäre Medikamententransporter genutzt. Die AmB-Beladung der RBCs erfolgte mit einer AmB-Nanosuspension (AmB-NS, Partikelgröße 65 nm) *via* hypotoner Hämolyse und führte zu Beladungskonzentrationen von 3.81 pg/RBC, entsprechend einer Einschlusseffizienz von 15 – 19% sowie einem prozentualen molekularen AmB Anteil von 41 mol%, der damit deutlich höher lag als bei anderen Lipid-assoziierten Formulierungen. Durch die zusätzliche Inkorporation von Magnetit konnten AmB-NS-RBCs im MRT visualisiert werden und offerieren somit die Möglichkeit des therapeutischen Monitorings. Die leukozytäre Erkennung und Aufnahme der AmB-NS-RBCs war PS vermittelt und sehr effizient. Innerhalb von 4 hr internalisierten > 98% der Leukozyten 4 - 5 AmB-NS-RBCs pro Zelle, das einer AmB-Endkonzentrationen von 14 - 16 pg pro PMN bzw. MNC entsprach. Dies führte bei Inkubation mit *C. albicans* zu einer sofortigen und dauerhaften Hemmung der intra-und extrazellulären Pilz-Aktivität. Die durch Diffusion freigesetzte AmB-Menge lag dabei über den gesamten Beobachtungszeitraum weit oberhalb der MHK_{90} , jedoch ohne offensichtliche Zytotoxizität für die Immunzellen. Lediglich eine transiente, AmB unabhängige Reduktion der Phagozytosekapazität um ~30% und der ROS-Bildung um ~50% konnte identifiziert werden, die sich nach 24 hr wieder normalisierten. Daher muss geschlussfolgert werden, dass das beschriebene DDS eine exzellente Alternative zu den bisher entwickelten AmB-Formulierungen darstellt, angesichts der überragenden intra- und extrazellulären Pilzabtötung unter Erhaltung der leukozytären Funktionalität.

VII. Literaturverzeichnis

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 2011; 36: 1-53.
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
3. Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1060-8.
4. Ozyilmaz E, Aydogdu M, Sucak G, et al. Risk factors for fungal pulmonary infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients: the role of iron overload. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 1528-33.
5. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-63.
6. Vincent JL, Anaissie E, Bruining H, et al. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. *Intensive Care Med* 1998; 24: 206-16.
7. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1695-703.
8. Tuite A, Mullick A, Gros P. Genetic analysis of innate immunity in resistance to *Candida albicans*. *Genes Immun* 2004; 5: 576-87.
9. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, et al. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 *Aspergillus* Study Group. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 250-60.
10. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica* 2002; 81: 101–110.
11. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2004; 12: 317-24.
12. Berman J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 595-601.
13. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 327-35.

14. Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71: 348-76.
15. Fradin C, Hube B. . Transcriptional Profiling of *Candida albicans* in Human Blood. *Microbe* 2006; 1: 76-80.
16. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 1997; 90: 939-49.
17. Bahn YS, Staab J, Sundstrom P. Increased high-affinity phosphodiesterase PDE2 gene expression in germ tubes counteracts CAP1-dependent synthesis of cyclic AMP, limits hypha production and promotes virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 2003; 50: 391-409.
18. Mitchell AP. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 687-92.
19. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 400-28.
20. Netea MG, Marodi L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol* 2010; 31: 346-53.
21. Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 2003; 21 Suppl 2: S12-23.
22. Brown GD. Innate Antifungal Immunity: The Key Role of Phagocytes. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 1-21.
23. Speth C, Rambach G, Wurzner R, Lass-Flörl C. Complement and fungal pathogens: an update. *Mycoses* 2008; 51: 477-96.
24. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 825-52.
25. Phan QT, Belanger PH, Filler SG. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect Immun* 2000; 68: 3485-90.
26. Vonk AG, Netea MG, van der Meer JW, Kullberg BJ. Host defence against disseminated *Candida albicans* infection and implications for antifungal immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 891-903.
27. Sobel JD, Revankar SG. Echinocandins--first-choice or first-line therapy for invasive candidiasis? *N Engl J Med* 2007; 356: 2525-6.

28. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 503-35.
29. Heit MC, Riviere, J.E. *Antifungal and antiviral drugs*. 7th ed. Ames (USA): Iowa State University; 1995.
30. Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68: 151-62.
31. Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci* 2008; 97: 2405-25.
32. Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 308-29.
33. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002; 359: 1135-44.
34. Cohen BE. Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J Membr Biol* 2011; 238: 1-20.
35. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 183-8.
36. Zumbuehl A, Stano P, Heer D, Walde P, Carreira EM. Amphotericin B as a potential probe of the physical state of vesicle membranes. *Org Lett* 2004; 6: 3683-6.
37. Cohen BE. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int J Pharma* 1998; 162: 95-106.
38. Bates DW, Su L, Yu DT, et al. Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B. *Kidney Int* 2001; 60: 1452-9.
39. Herbrecht R, Natarajan-Ame S, Nivoix Y, Letscher-Bru V. The lipid formulations of amphotericin B. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 1277-87.
40. Janknegt R, de Marie S, Bakker-Woudenberg IA, Crommelin DJ. Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. *Clinical pharmacokinetics*. *Clin Pharmacokinet* 1992; 23: 279-91.
41. Bekersky I, Boswell GW, Hiles R, et al. Safety, toxicokinetics and tissue distribution of long-term intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome): a 91-day study in rats. *Pharm Res* 2000; 17: 1494-502.
42. Hann IM, Prentice HG. Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17: 161-9.

43. Dupont B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49 Suppl 1: 31-6.
44. Antoniadou A, Dupont, B. . Lipid formulations of amphotericin B: where are we today? *Journal de Mycologie Médicale* 2005; 15: 230-8.
45. Mullen AB, Carter KC, Baillie AJ. Comparison of the efficacies of various formulations of amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2089-92.
46. van Etten EW, van Vianen W, Roovers P, Frederik P. Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: effects on ultrastructure, in vitro activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1598-603.
47. Bekersky II, Fielding RM, Buell D, Lawrence II. Lipid-based amphotericin B formulations: from animals to man. *Pharm Sci Technolo Today* 1999; 2: 230-6.
48. Wong-Beringer A, Jacobs RA, Guglielmo BJ. Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 603-18.
49. Anaissie EJ, Mattiuzzi GN, Miller CB, et al. Treatment of invasive fungal infections in renally impaired patients with amphotericin B colloidal dispersion. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 606-11.
50. Hamidi M, Tajerzadeh H. Carrier erythrocytes: an overview. *Drug Deliv* 2003; 10: 9-20.
51. ADAM Education [Available from: <http://www.beltina.org>]
52. Emedicine.Medscape. Schematic diagram of the components of the red cell membrane. 2011 [Available from: www.emedicine.medscape.com]
53. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993; 30: 171-92.
54. Pennell RB. Composition of normal human red cells. In: Surgenor DM, editor. *The Red blood Cell*, New York: New York: Academic Press.; 1974. p. 93-146.
55. Ihler GM, Glew RH, Schnure FW. Enzyme loading of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; 70: 2663-6.
56. Hamidi M, Zarrin A, Foroozesh M, Mohammadi-Samani S. Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals. *J Control Release* 2007; 118: 145-60.
57. Millan CG, Marinero ML, Castaneda AZ, Lanao JM. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *J Control Release* 2004; 95: 27-49.

58. Rossi L, Serafini S, Pierige F, et al. Erythrocyte-based drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2: 311-22.
59. Magnani M, Rossi L, Fraternali A, et al. Erythrocyte-mediated delivery of drugs, peptides and modified oligonucleotides. *Gene Ther* 2002; 9: 749-51.
60. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963; 100: 119-30.
61. Gothoskar AV. Resealed Erythrocytes: A Review. *Pharmaceutical Technology* 2004: 140-58.
62. Kinoshita K, Jr., Tsong TT. Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 1923-7.
63. Deloach J, Ihler G. A dialysis procedure for loading erythrocytes with enzymes and lipids. *Biochim Biophys Acta* 1977; 496: 136-45.
64. Pierige F, Serafini S, Rossi L, Magnani M. Cell-based drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 286-95.
65. Jaitely V, Kanaujia P, Venkatesan N, Jain S, Vyas SP. Resealed erythrocytes: drug carrier potentials and biomedical applications. *Indian Drugs* 1996; 33: 589-94.
66. Moeschwitzer JP, Lemke A. Inventor. Method for the gentle production of ultrafine particle suspensions. Deutschland. 2005.
67. Freudig B, Tesch S, Schubert H. Production of Emulsions in High-Pressure Homogenizers - Part II: Influence of Cavitation on Droplet Breakup. *Engineering in Life Sciences* 2003; 3: 266-70.
68. Karbstein H, Schubert H. Einflußparameter auf die Auswahl einer Maschine zum Erzeugen feindisperser O/W-Emulsionen. *Chem Ing Tech* 1995; 67: 616-9.
69. Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 785-96.
70. Buttle I. O/W-Emulsionen für die intravenöse Applikation von Arzneistoffen. Berlin: Freie Universitaet Berlin, Germany; 2005; 9-24.
71. Götze T, Buske N, Gansau C. Inventor. Process for preparation of magnetite nanoparticles. Deutschland.
72. Campanha NH, Pavarina AC, Brunetti IL, et al. *Candida albicans* inactivation and cell membrane integrity damage by microwave irradiation. *Mycoses* 2007; 50: 140-7.
73. International Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the NCCLS. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts; 2004.

74. Erythrocyte, platelet, leucocyte. [Available from: http://mcqs.leedsmedics.org.uk/Year%202/PatEval/Haematology/Haem_IntroMC.html]
75. English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods* 1974; 5: 249-52.
76. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Traganos F. The cell cycle effects of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 803: 93-100.
77. Rosenberry TL, Chen JF, Lee MM, Moulton TA, Onigman P. Large scale isolation of human erythrocyte membranes by high volume molecular filtration. *J Biochem Biophys Methods* 1981; 4: 39-48.
78. Chaturvedi V, Ramani R, Pfaller MA. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2249-51.
79. Park K. Trojan monocytes for improved drug delivery to the brain. *J Control Release* 2008; 132(2): 75.
80. Perfect JR, Savani DV, Durack DT. Uptake of itraconazole by alveolar macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 903-4.
81. Pallister CJ, Johnson EM, Warnock DW, Elliot PJ, Reeves DF. In-vitro effects of liposome-encapsulated amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B-deoxycholate (Fungizone) on the phagocytic and candidacidal function of human polymorphonuclear leucocytes. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 313-20.
82. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 226-35.
83. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31: 1-9.
84. Bacso Z, Everson RB, Eliason JF. The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res* 2000; 60: 4623-8.
85. Busetto S, Trevisan E, Patriarca P, Menegazzi R. A single-step, sensitive flow cytometric assay for the simultaneous assessment of membrane-bound and ingested *Candida albicans* in phagocytosing neutrophils. *Cytometry A* 2004; 58: 201-6.
86. Orpegen Pharma. Phagoburst. 2002: 1-5. [Available from: <http://www.biocarta.com/TDS/10-0200.pdf>.]
87. FACS Canto Users Guide. BD Biosciences. [Available from: www.bdbiosciences.com]

88. Wilhelm S, Gröbler B, Gluch M, Heinz H. Confocal Laser Scanning Microscopy. 2008; 4-7. [Available from: [http://www.zeiss.de/\\$file/60-1-0030_confocal-principles.pdf](http://www.zeiss.de/$file/60-1-0030_confocal-principles.pdf)]
89. Del Favero A. Management of fungal infections in neutropenic patients: more doubts than certainties? *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: 135-7.
90. Keck CM, Muller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 62: 3-16.
91. Jain KK. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Med Princ Pract* 2008; 17: 89-101.
92. Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, et al. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *Faseb J* 2005; 19: 647-9.
93. Pitt E, Johnson CM, Lewis DA, Jenner DA, Offord RE. Encapsulation of drugs in intact erythrocytes: an intravenous delivery system. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 3359-68.
94. Gopal VS RKA, Usha NA, Karthik A, Udupa N. Effective drug targeting by Erythrocytes as Carrier Systems. *Curr Trends Biotechnol Pharm* 2007; 1: 18-33.
95. Ways P, Hanahan DJ. Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. *J Lipid Res* 1964; 5: 318-28.
96. Manosroi A, Kongkaneramt L, Manosroi J. Characterization of amphotericin B liposome formulations. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30: 535-43.
97. Baginski M, Czub J, Sternal K. Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: molecular modeling studies. *Chem Rec* 2006; 6: 320-32.
98. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001 [Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>]
99. Campanero MA, Espuelas, M. S., Azanza, J. R., Irache, J. M. Rapid Determination of Intramacrophagic Amphotericin B by Direct Injection HPLC. *Chromatographia* 2000; 52: 827-30.
100. Mouri R, Konoki K, Matsumori N, Oishi T, Murata M. Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 2008; 47: 7807-15.
101. Laurent S, Boutry S, Mahieu I, Vander Elst L, Muller RN. Iron oxide based MR contrast agents: from chemistry to cell labeling. *Curr Med Chem* 2009; 16: 4712-27.

102. Hahn PF, Stark DD, Saini S, et al. Ferrite particles for bowel contrast in MR imaging: design issues and feasibility studies. *Radiology* 1987; 164: 37-41.
103. Hafeli UO. Magnetically modulated therapeutic systems. *Int J Pharm* 2004; 277: 19-24.
104. Corredor E, Testillano PS, Coronado MJ, et al. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. *BMC Plant Biol* 2009; 9: 45.
105. Bowen CV, Zhang X, Saab G, Gareau PJ, Rutt BK. Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells. *Magn Reson Med* 2002; 48: 52-61.
106. Braehler M, Georgieva R, Buske N, et al. Magnetite-loaded carrier erythrocytes as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nano Lett* 2006; 6: 2505-9.
107. Beckmann N, Cannet C, Babin AL, et al. In vivo visualization of macrophage infiltration and activity in inflammation using magnetic resonance imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2009; 1: 272-98.
108. Johnson J, Kent, T., Koda, J., Peterson, C., Rudge, S., Tapolsky, G. The MTC technology: a platform technology for the site-specific delivery of pharmaceutical agents. *European Cells and Materials* 2002; 3: 12-5.
109. Skotland T, Sontum PC, Oulie I. In vitro stability analyses as a model for metabolism of ferromagnetic particles (Clariscan), a contrast agent for magnetic resonance imaging. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 28: 323-9.
110. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 67-78.
111. Romero EL, Morilla MJ. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert Opin Drug Deliv* 2008; 5: 805-23.
112. Dou H, Destache CJ, Morehead JR, et al. Development of a macrophage-based nanoparticle platform for antiretroviral drug delivery. *Blood* 2006; 108: 2827-35.
113. Roilides E, Walsh TJ, Rubin M, Venzon D, Pizzo PA. Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 196-201.
114. Vaysse J, Gattegno L, Bladier D, Aminoff D. Adhesion and erythrophagocytosis of human senescent erythrocytes by autologous monocytes and their inhibition by beta-galactosyl derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 1339-43.
115. Cambos M, Scorza, T. Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance: role in hemolytic disorders. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 159-71.

116. Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* 2001; 155: 649-59.
117. Bennett MR, Gibson DF, Schwartz SM, Tait JF. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ Res* 1995; 77: 1136-42.
118. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, et al. *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York: Scientific American Books; 2004: 411-20.
119. Kramer SD, Lombardi D, Primorac A, Thomae AV, Wunderli-Allenspach H. Lipid-bilayer permeation of drug-like compounds. *Chem Biodivers* 2009; 6: 1900-16.
120. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953-64.
121. Smolewski P, Darzynkiewicz, Z. Current methods for measurement of apoptosis. *Acta Haematol Pol* 2003; 34: 35-47.
122. Chunn CJ, Starr PR, Gilbert DN. Neutrophil toxicity of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 226-30.
123. Vonk AG, Netea MG, Denecker NE, et al. Modulation of the pro- and anti-inflammatory cytokine balance by amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 469-74.
124. Reinach PS, Schoen HF. NPPB inhibits the basolateral membrane K⁺ conductance in the isolated bullfrog cornea. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1026: 13-20.
125. Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL. Lipid complexing decreases amphotericin B inflammatory activation of human neutrophils compared with that of a desoxycholate-suspended preparation of amphotericin B (Fungizone). *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 39-45.
126. Drevets DA, Campbell, P.A. Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *J Immunol Methods* 1991; 28: 31-8.
127. Lehmann AK, Sornes S, Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000; 243: 229-42.
128. Klippel N, Bilitewski, U. Phagocytosis assay based on living *Candida albicans* for detection of effects of chemicals on macrophages function. *Analytical Letters* 2007; 40: 1400-11.
129. Hirt UA, Leist M. Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. *Cell Death Differ* 2003; 10: 1156-64.

130. Johann AM, von Knethen A, Lindemann D, Brune B. Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and attenuates the oxidative burst. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1533-40.
131. Wu Y, Tibrewal N, Birge RB. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 189-97.
132. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101: 890-8.
133. Birge RB, Ucker DS. Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1096-102.
134. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A* 2009; 75: 475-81.
135. Fruman DA. Bursting with PIP₃. *Blood* 2005; 106: 1139-40.
136. Casimir CM, Teahan CG. The respiratory burst of neutrophils and its deficiency. In: Hellewell PG, Williams TJ, eds. *Immunopharmacology of neutrophils*. London: Academic Press; 2001; 55-94.
137. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger - principles of biochemistry*. 5th ed. New York, USA: W. H. Freeman and Company; 2008; 12: 423-39.
138. Kaposzta R, Marodi L, Hollinshead M, Gordon S, da Silva RP. Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans*. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 19): 3237-48.
139. Marzzullo L, Souza LC, Campa A. Effect of amphotericin B associated with a lipid emulsion on the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 203-7.
140. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 965-75.
141. Mansat V, Laurent G, Levade T, Bettaieb A, Jaffrezou JP. The protein kinase C activators phorbol esters and phosphatidylserine inhibit neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin. *Cancer Res* 1997; 57: 5300-4.

O gk'Ngdgpurwh'y kf'cwu'f cvgpuej wj tgej vlej gp'I tÄpf gp'lp'f gt'gngmtqpkuej gp'Xgtukqp'o gkpgt
"
Ctdgk'plej v'xgt³4hgpvlej v0

Publikationen

V. Staedtke, M. Brähler, A. Müller, R. Georgieva, S. Bauer, N. Sternberg, A. Voigt, A. Lemke, C. Keck, J. Möschwitzer and H. Bäuml. „*In vitro* inhibition of fungal activity by macrophage-mediated sequestration and release of encapsulated amphotericin B nanosuspension in red blood cells.” **Small** (2010) 6(1): 96-103.

(Peer-reviewed Journal, Impact Faktor 2009: 6.171)

V. Staedtke, M. Fischer, M. Brähler, A. Krabi, P. Rösch, C. Watermann, A. Lemke, J. Möschwitzer, H. Bäuml. „Carrier for nanoparticles – Targeted delivery of water insoluble drugs.” Targeted Nanodelivery for Therapeutics and Molecular Imaging (Konferenz) (2005), Washington D.C., USA. (Abstract und Poster)

Hans Bäuml, **Verena Staedtke**, Maria Fischer. „Multi-Assay For Differentiation Of Ingested/Non-Ingested Yeast Populations And Simultaneous Assessment Of The Viability.” International Society for Analytical Cytology (ISAC), 23rd Annual Conference (2006), Quebec City, Quebec, Kanada. (Abstract und Poster)

Hans Bäuml, M. Brähler, A. Lemke, J. Möschwitzer, A. Müller, J. Pinkernelle, **V. Staedtke**, U. Teichgräber. „Red blood cells as carrier for nanoparticles.” 5th World Congress of Biomechanics (2006), München, Deutschland. (Konferenz)

H. Bäuml, M. Brähler, R. Georgieva, A. Höning, A. Müller, M. Müller, J. Pinkernelle, **V. Staedtke**, U. Teichgräber. „Natural carrier for nanoparticles - Targeted delivery of water insoluble drugs.” XXXIV. European Society for Artificial Organs Conference (2007), Krems, Österreich. (Konferenz)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Verena Staedtke, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Erythrozyten als Drug Carrier für schwerlösliche Substanzen am Beispiel von Amphotericin B“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Baltimore, den _____

Verena Staedtke