

4. Ergebnisse

4.1 *in vitro*-Ergebnisse

Es war aus sicherheitstechnischen und arbeitsrechtlichen Gründen nicht möglich, die für den Tierversuch hergestellten, radioaktiv markierten PMMA-Nanopartikel auf ihre physikochemische Eigenschaften hin zu untersuchen. Aus diesem Grunde wurden nichtmarkierte PMMA-Partikel für die *in vitro*-Untersuchungen auf gleiche Weise hergestellt und hinsichtlich Größe, Verhalten im Plasma, Zetapotential und Proteinadsorptionsvermögen charakterisiert. Da sich die radioaktiv markierten Partikel nur durch den Austausch eines Kohlenstoffisotops unterscheiden, können die *in vitro*-Untersuchungen und *in vivo*-Ergebnisse vergleichend betrachtet werden.

4.1.1 Größenmessung

a) Größenbestimmung der Partikel in Aqua dest.:

Als ein wesentliches Kriterium partikulärer Systeme, die intravenös verabreicht werden sollten, wurde die Größe der einfachen und der beschichteten Partikel bestimmt.

Die Nanopartikelzubereitungen: **a**: PMMA-Nanopartikel,

b: mit 1% Polysorbat 80,

c: mit 1% Poloxamer 407,

d: mit 1% Poloxamin 908 beschichtete PMMA-Nanopartikel,

wurden im Größenmeßgerät LS-230 vermessen. Die Größe der Partikelaggregate wurde durch die Zeit und die Stärke des Ultraschallbades bestimmt. Folgende Zeiten (10 min, 20 min, 30 min) wurden für die Festlegung der optimalen Beschallzeit getestet, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Tab. 10: Aggregatgrößen (nm) der Partikelzubereitungen **a**, **b**, **c**, **d** nach 10, 20, 30 Minuten im Ultraschallbad, angegeben als Modalwert der Aggregatpopulation, für die Präparationen a wurden zwei Werte aufgeführt, da es sich um zwei Populationen handelt, a1: Modalwert der Population unter 1000 nm und a2: Modalwert der Population über 1000 nm

Beschallzeit [min]	a1 (<1000 nm) [nm]	a2 (>1000 nm) [nm]	b [nm]	c [nm]	d [nm]
10	205	4878	358	393	432
20	205	4444	117	393	474
30	205	4444	117	393	339

Nach einer Zeit von 20 min sind die Partikelaggregate auf einer Größe, die auch durch eine weitere Beschallzeit nicht wesentlich weiter reduziert werden konnte. Die mit Polysorbat 80 beschichteten Partikel wiesen den geringsten Durchmesser auf. Um die Verteilung der

Aggregate nach einer Beschallzeit von 20 min besser interpretieren zu können, wurden die Partikelverteilungen der einzelnen Zubereitungen in einer Volumenverteilungsdiagramm graphisch dargestellt.

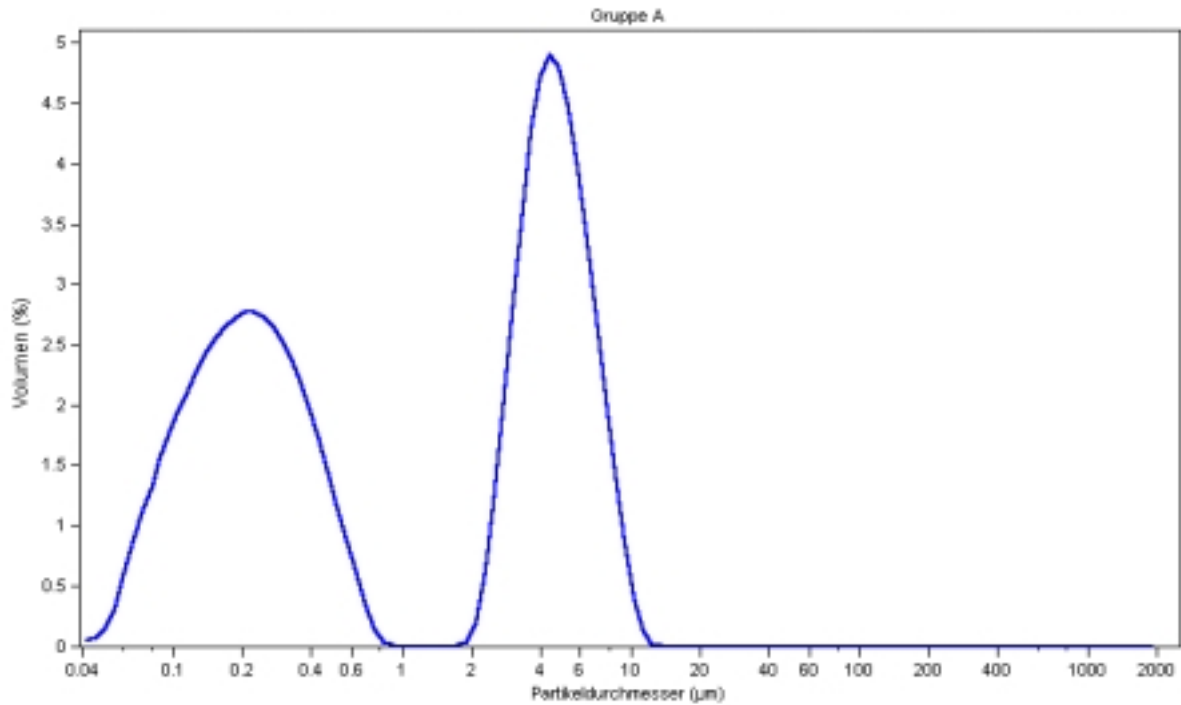


Abb. 5: Volumenverteilungskurve der Präparation **a** nach einer Beschallzeit von 20 min

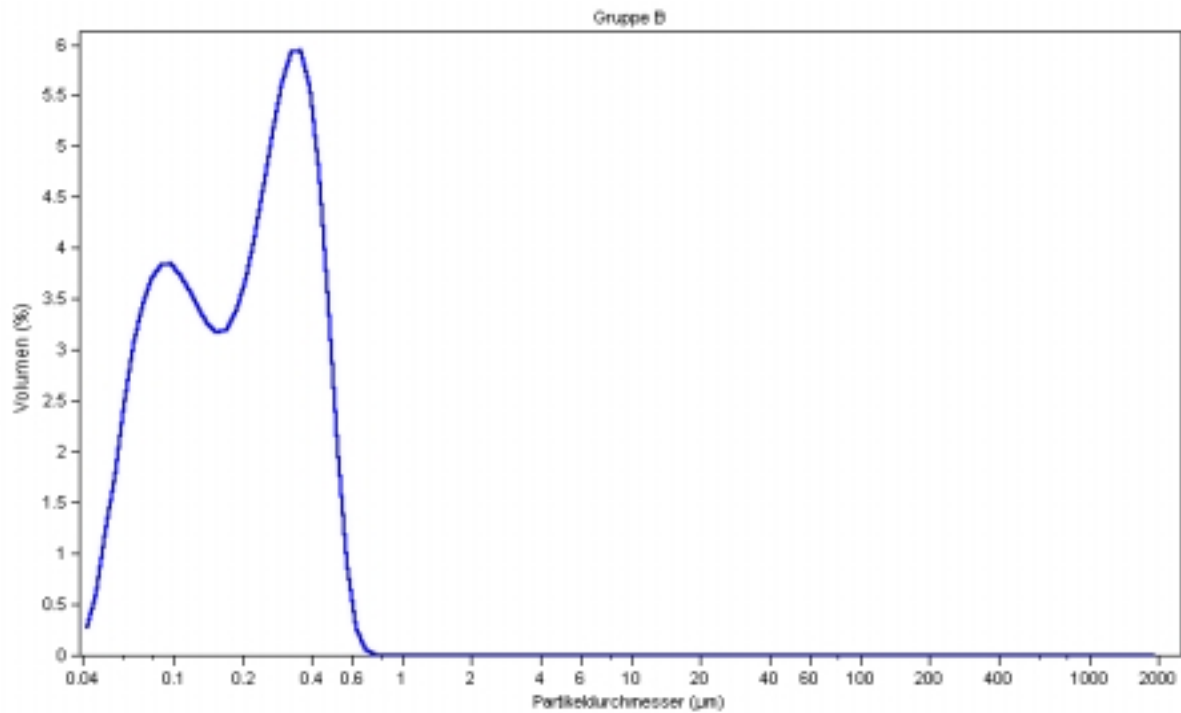


Abb. 6: Volumenverteilungskurve der Präparation **b** nach einer Beschallzeit von 20 min

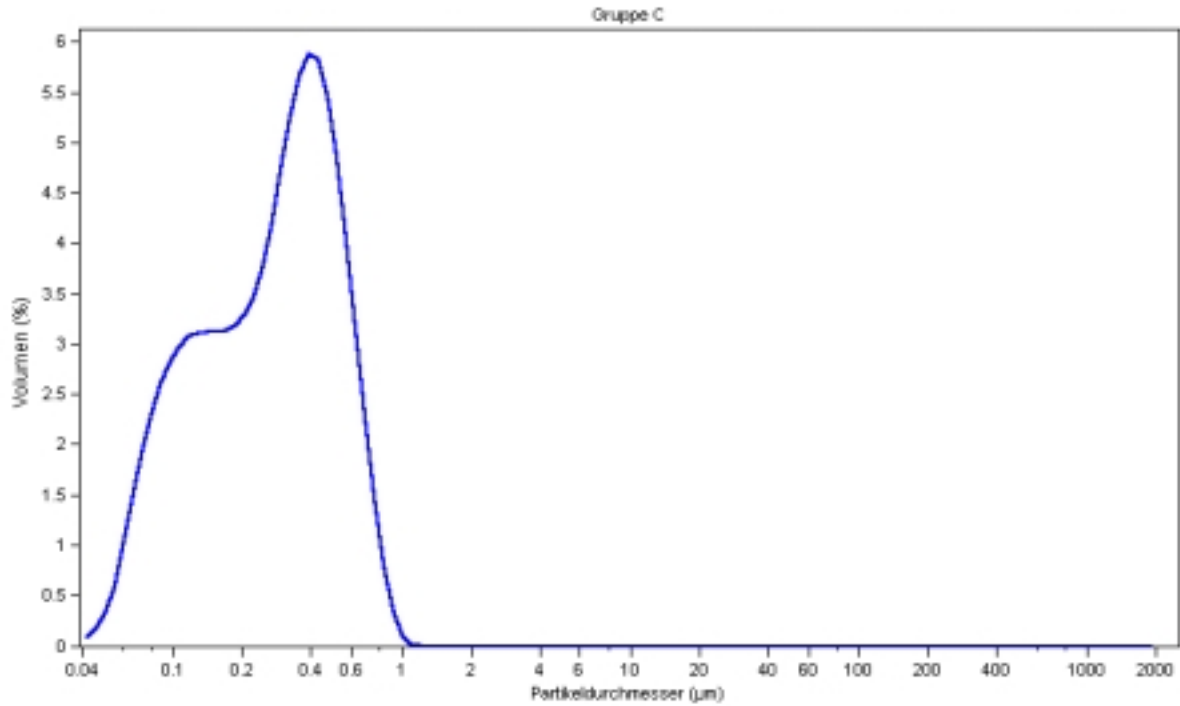


Abb. 7: Volumenverteilungskurve der Präparation **c** nach einer Beschallzeit von 20 min

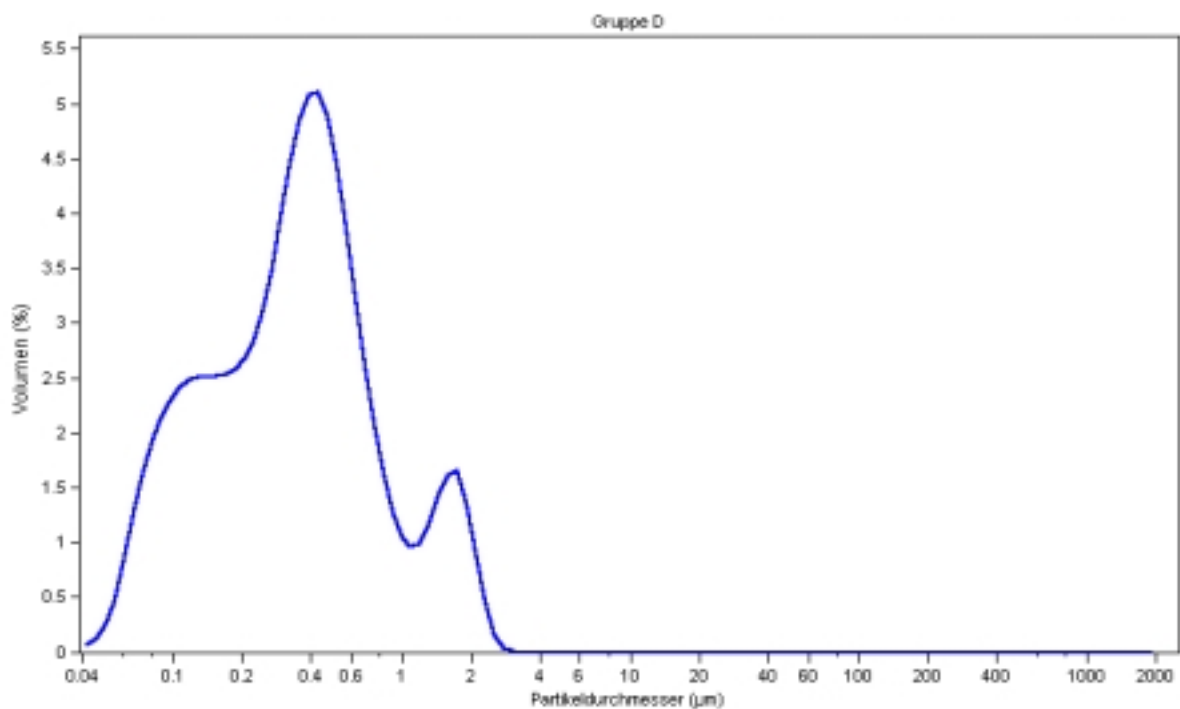


Abb. 8: Volumenverteilungskurve der Präparation **d** nach einer Beschallzeit von 20 min

Die Aggregatdurchmesser aller beschichteten Nanopartikelzubereitungen liegen unter denen der nichtbeschichteten Kontrollgruppe (**a**). Keine der untersuchten Partikelpräparationen zeigt hinsichtlich ihrer Größe (nm) eine unimodale Verteilung. Die Kurvenverläufe der beschichteten Partikel (**b**, **c**, **d**) zeigen im Bereich unter 1 µm immer eine bimodale

Verteilung. Die Volumenverteilungskurve der puren Nanopartikel zeigt einen Peak bei 205 nm und bei 4444 nm, dabei entfallen aber nur 0,00294% der Gesamtaggreatanzahl auf die Population über 1000 nm (**a2**).

Da die Nanopartikelpräparationen an einer große Anzahl von Mäusen getestet werden sollten, war es notwendig die Stabilität der Größenverteilung der Partikelzubereitungen zu überprüfen. Die einzelnen Präparationen wurden unmittelbar nach der Behandlung im Ultraschallbad und zu drei Zeitpunkten (45 min, 100 min, 3 d) vermessen. In diese Untersuchungen wurden nur die beschichteten Partikel mit einbezogen, nicht aber die Kontrolle (**a**), da es bei den puren Nanopartikeln unmittelbar nach Behandlungsende im Ultraschallbad zu erneuten Aggregationen kam, die mit bloßem Auge in Form kleiner Flocken sichtbar wurden.

Tab.11: Stabilität des Aggregatdurchmessers der beschichteten Partikelzubereitungen (**b, c, d**) 45 und 100 Minuten und 3 Tage nach Ultraschallbehandlung, angegeben als Modalwert

Zeit nach Ultraschallbehandlung	b [nm]	c [nm]	d [nm]
0 min	117	393	474
45 min	117	393	432
100 min	128	393	432
3 d	117	393	432

Da es im Verlaufe der Lagerung zum Sedimentieren der Nanopartikel kam, mußten die Proben vor Bestimmung des 3 d-Wertes 1 min mit der Hand geschwenkt werden. Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine nennenswerte Veränderung in der Größenverteilung der Partikelzubereitungen ermittelt werden, so daß die Voraussetzung für eine Verwendung der Präparationen über einen längeren Zeitraum gegeben war. Nur Ergebnisse, die mit stabilen kolloidalen Systemen erzielt wurden, können miteinander verglichen und reproduziert werden.

b) Größenbestimmung der Partikel im Plasma:

Die 4 Partikelzubereitungen (**a, b, c, d**) wurden auf ihr Verhalten im Plasma hin untersucht. Nach der oben beschriebenen Art wurden die Partikel aufbereitet und nach einer Inkubationzeit von 5 min in humanem Plasma, wurden die Präparationen im Größenmeßgerät LS-230 untersucht.

Tab. 12: Aggregatgrößen (nm) der Partikelzubereitungen **a**, **b**, **c**, **d** nach 5 minütiger Inkubation in humanem Plasma, angegeben als Modalwert der Aggregatpopulation, für die Präparationen **a** und **d** wurden zwei Werte aufgeführt, da es sich um zwei Populationen handelt, **a1**; **d1**: Modalwert der Population unter 1000 nm und **a2**; **d2**: Modalwert der Population über 1000 nm

	a1	a2	b	c	d1	d2
Modalwert der Aggregate [nm]	107	2106	107	107	107	1593

Es kam bei allen Präparationen im Vergleich zu den Messungen in Aqua dest. (siehe 4.1.1.a) zu einer Abnahme der Aggregatgrößen. Die Verteilung der Partikel unter 1000 nm erscheint in allen Diagrammen als eine bimodale Kurve. Werden nur die Werte unter 1000 nm zur Berechnung der Aggregatgröße berücksichtigt, so ergibt sich bei allen 4 Partikelzubereitungen ein einheitlicher Modalwert von **107 nm**. Die Population der Partikel, die bei **a** und **d** über 1000 nm lag, hatte einen Anteil von 0,0016-0,002% an der Gesamtpartikelanzahl. Die Proteine des filtrierten Plasmas konnten aufgrund ihrer geringen Größe bei der Beurteilung der Meßwerte vernachlässigt werden. Das Plasma zeigte nach der Filtration im Meßgerät einen Modalwert von 94,1 nm. Das filtrierte Plasma wurde mit Hilfe der 2-D-Elektrophorese auf das Vorhandensein aller Proteine untersucht. Im Vergleich der Gele des filtrierten und des unfiltrierten Plasmas konnten keine Unterschiede gefunden werden.

4.1.2 Zeta-Potential

Die 4 Nanopartikelgruppen wurden mit Hilfe des Zeta-Potentials hinsichtlich ihre Stabilität im wäßrigen Medium untersucht.

Tab.13 : Zetapotential der Präparationen **a**, **b**, **c**, **d**

Zetapotential [mV]	a	b	c	d
Mittelwert	-17.7	-10.4	-8,1	-4,47
Standardabweichung [+/-]	7,86	5.07	7,87	6,79

Die in der Tabelle angegebenen Mittelwerte wurden aus 4 Einzelmessungen errechnet. Bei **a** kam es während der Messungen zu makroskopisch sichtbaren Aggregationen, so daß das gemessene Zetapotential von -17,7 als das kritische Potential dieses kolloidalen Systems, bei dem es zu Aggregationen oder Ausflockungen kommt, angenommen werden kann. Durch die

Beschichtung der PMMA-Partikel (**b**, **c**, **d**) kam es zu einer Abnahme des Zetapotentials und damit zu einer Stabilitätssteigerung.

4.1.3 2-D-Elektrophorese

Um das Proteinadsorptionsvermögen der Nanopartikel bestimmen zu können, wurden die Partikel nach Inkubation im Plasma und im Serum untersucht. Die Partikel wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Jeweils 500 µl einer Partikeldispersion wurden in 2,5 ml Plasma oder Serum für 5 min bei 37°C inkubiert. Für die Differenzierung der Proteine standen 2-D-E-Referenzgele in der Literatur (Anderson und Anderson, 1991; Golaz et al., 1993) und die SWISS-2-D-PAGE-Datenbank zur Verfügung. Darin sind alle bislang identifizierten Proteine bezeichnet.

Die Gesamtmenge der auf der Oberfläche der Nanopartikelzubereitungen adsorbierten Plasmaproteine betrug für:

Tab. 14: Gesamtspotanzahl und Gesamtvolumen der auf den Präparationen **a**, **b**, **c**, **d** adsorbierten Plasmaproteine

Präparation	Gesamtspotanzahl	Spotvolumen
a	887	728,4
b	534	196,7
c	811	349,8
d	529	262,5

Auf der Oberfläche der beschichteten Partikel wurde eine wesentlich geringere Proteinmenge adsorbiert als bei den unbeschichteten. Da sich die Partikelpräparationen in ihrer Größe im Plasma nur minimal voneinander unterschieden, war es möglich, die Gesamtproteinmengen auf den Partikeln miteinander zu vergleichen. Folgende Proteine konnten auf den Nanopartikeln identifiziert werden.

Unten ist ein typisches, als Kontrollgel gewonnenes, 2-D-Elektropherogramm einer reinen humanen Plasmaprobe zu sehen.

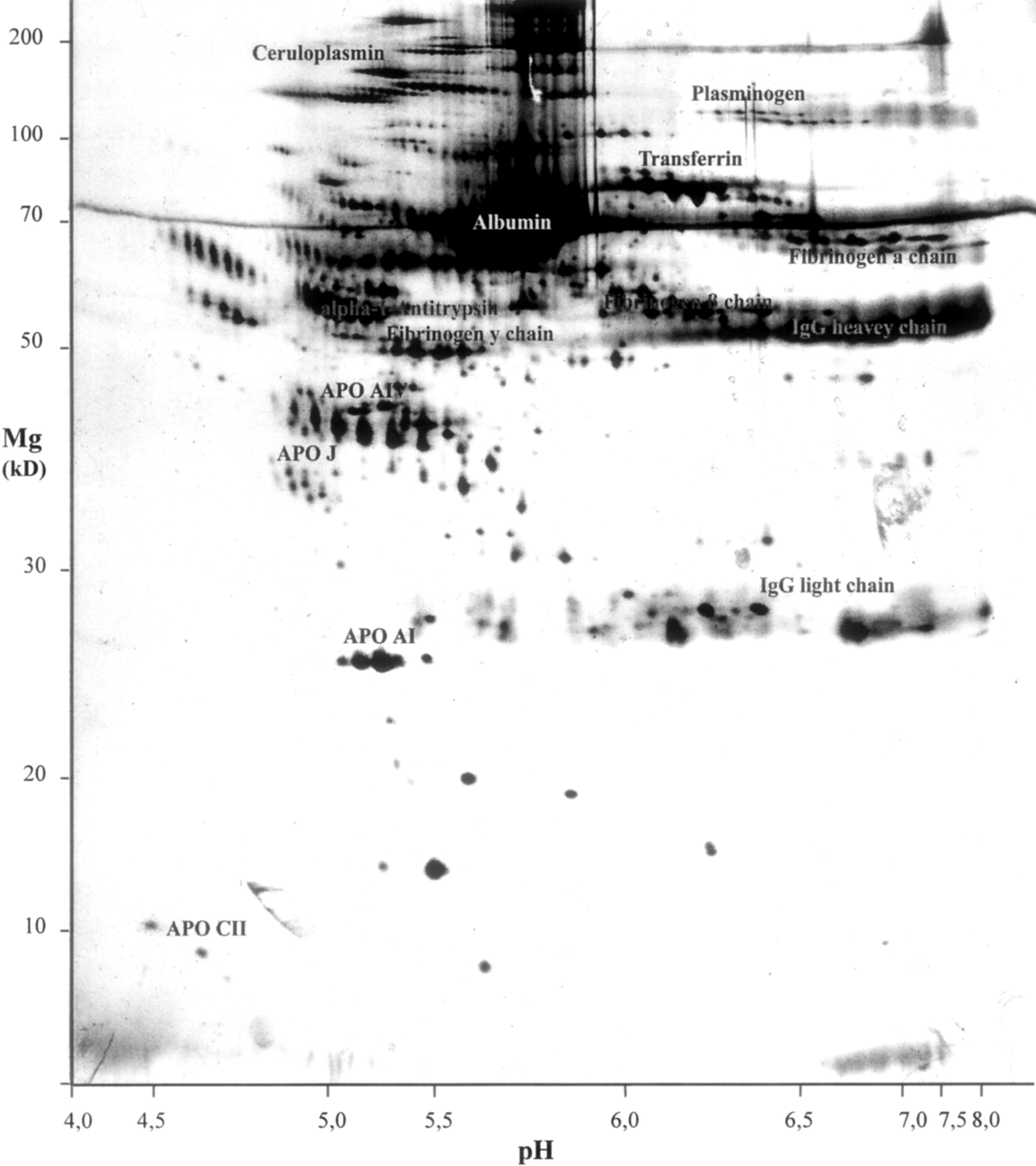


Abb. 9: 2-D-Elektropherogramm menschlicher Plasmaproteine