

Tab.15: Die gefundenen Proteine werden als prozentualer Anteil der insgesamt detektierten Proteinmenge angegeben. Es wurden alle Plasmaproteine aufgenommen, deren Anteil mehr als 0,5% an der insgesamt detektierten Proteinmenge betrug.

Protein	Präparation			
	a	b	c	d
<b>Albumin</b>	4,12	4,541	3,835	4,789
<b>APO J</b>	16,109	1,973	#	7,272
<b>APO E</b>	2,918	0,881	5,257	6,868
<b>APO D</b>	1,762	1,602	1,133	1,022
<b>APO AI</b>	10,436	2,378	2,762	4,698
<b>APO AII</b>	2,001	#	#	#
<b>APO AIV</b>	5,211	4,181	8,451	7,522
<b>APO CII</b>	1,257	#	#	1,430
<b>APO CIII</b>	2,378	#	#	2,539
<b>a-1-Antitrypsin</b>	1,723	1,886	2,097	1,426
<b>Ceruloplastin</b>	0,709	2,389	1,505	1,320
<b>Transferrin</b>	0,846	1,633	1,116	1,290
<b>Plasminogen</b>	0,506	1,713	#	#
<b>Angiotensinogen</b>	0,832	#	#	#
<b>Antithrombin</b>	#	1,741	1,178	1,138
<b>Fibrinogen</b>	6,811	11,474	7,478	7,258
<b>Immunglobulin G</b>	10,339	22,675	21,761	23,371
<b>Immunglobulin A</b>	0,679	1,193	1,345	1,495
<b>u. P.* (413, 364, 345, 120, 367)</b>	#	0,832	1,682	0,794

#: nicht detektiert

u. P.\*: unbekanntes Protein nach Anderson u. Anderson, 1991

Albumin ist das größte und am häufigsten im Plasma vorkommende Protein und war auf allen 4 Zubereitungen in ähnlicher Menge vorhanden.

Die Apolipoproteine (APO) nahmen einen großen Anteil der auf der Oberfläche der Partikel adsorbierten Proteine ein, besonders auf **a** mit insgesamt 39,5%. Die geringste Gesamtmenge an Apolipoproteinen war auf den mit Polysorbat 80 beschichteten Partikeln mit 10,1%

vorhanden. APO J, APO E, APO AI und APO AIV waren die mengenmäßig am häufigsten vorkommenden Apolipoproteine, die zum Teil Unterschiede bis zu 16,1% zwischen den Gruppen zeigten. APO J war mit 16,1% auf **a** am stärksten vertreten und war damit gleichzeitig auch das am häufigsten detektierte Protein auf allen untersuchten Nanopartikelgruppen. Es kam auf **b** nur in geringer Menge und auf **c** gar nicht vor. APO AI zeigte ein adäquates Verteilungsmuster wie APO J. Auch hier war es auf **a** in hohen, auf **d** in mittleren Konzentrationen und auf **b** und **c** nur gering vertreten. Die auf **c** mit 5,2% und auf **d** mit 6,8% gefundenen APO E-Mengen lagen über denen von **a** und **b**. APO AIV war in ähnlich Verhältnissen auf den Präparationen verteilt, aber in geringeren Konzentrationen.

Immunglobulin G war auf allen Partikelzubereitungen in Konzentrationen von 10,3% bis 23,4% vertreten. IgG gilt neben C3 als eines der wichtigsten Opsonine, welches für die Erkennung und Elimination von körperfremden Bestandteilen verantwortlich ist. Über die Höhe der IgG-Werte soll hier keine Wertung erfolgen, da es während der Waschschriffe zu einer weiteren Adsorption von IgG auf partikulären Systemen kommen kann (Blunk, 1994; Lück, 1997). Auf die anderen detektierten Proteine soll an dieser Stelle aufgrund ihres geringen Anteils nicht weiter eingegangen werden.

Da das Komplementsystem im Plasma, durch den eingesetzten Gerinnungshemmer Natriumzitat inaktiviert ist, wurde das Adsorptionsverhalten nach Inkubation im Serum mit untersucht.

Tab. 16: Gesamtpotanzahl und Gesamtpotvolumen der auf den Präparationen **a**, **b**, **c**, **d** adsorbierten Serumproteine

<b>Präparation</b>	<b>Gesamtpotanzahl</b>	<b>Spotvolumen</b>
<b>a</b>	718	549,3
<b>b</b>	87	26,6
<b>c</b>	157	57,5
<b>d</b>	291	144,3

Auf allen Partikelzubereitungen wurde im Vergleich zu den Plasmaproben ein wesentlich geringeres Spotvolumen detektiert.

Tab. 17: Die gefundenen Proteine werden als prozentualer Anteil der insgesamt detektierten Proteinmenge angegeben. Es wurden alle Serumproteine aufgenommen, deren Anteil mehr als 0,5% an der insgesamt detektierten Proteinmenge betrug.

Protein	Präparation			
	a	b	c	d
<b>Albumin</b>	1,193	22,745	12,222	10,069
<b>APO J</b>	17,629	#	#	10,873
<b>APO E</b>	2,778	#	#	3,606
<b>APO D</b>	#	#	#	#
<b>APO AI</b>	9,43	8,448	15,772	5,168
<b>APO AII</b>	0,804	4,226	#	#
<b>APO AIV</b>	3,134	1,623	21,433	11,305
<b>APO CII</b>	0,549	#	1,06	2,227
<b>APO CIII</b>	1,911	#	#	3,92
<b>a-1-Antitrypsin</b>	6,312	3,433	2,423	2,986
<b>Ceruloplastin</b>	#	#	#	0,669
<b>Transferrin</b>	0,844	#	2,618	2,206
<b>Plasminogen</b>	#	#	1,762	0,645
<b>Angiotensinogen</b>	1,748	#	#	#
<b>Antithrombin</b>	#	#	#	#
<b>Immunglobulin G</b>	9,124	34,942	9,314	20,438
<b>Immunglobulin A</b>	#	3,872	2,906	2,271
<b>C3a</b>	1,209	#	#	#
<b>C3B</b>	1,304	5,179	5,392	1,647
<b>C3*</b>	0,944	#	#	#
<b>u. P.* (120, 345, 364, 367, 413)</b>	6,515	#	1,837	1,484

#: nicht detektiert

u. P.\*: unbekanntes Protein nach Anderson u. Anderson, 1991

Die Komplementfaktoren C3a und C3\* konnten nur auf **a** gefunden werden, C3B aber auf allen Gruppen. Auf **b** und **c** befand sich ca. die vierfache Menge an C3B im Vergleich zu **a**

und **d**. C3 besitzt eine zentrale Rolle in der Aktivierung der Komplementkaskade. Das Spaltprodukt C3b aus dem C3-Gesamtkomplex ist maßgeblich an der Vermittlung der Phagozytose und der Lyse von Membranen beteiligt, kann aber, bedingt durch seine kovalente Bindung an die Partikeloberfläche, nicht mit den hier beschriebenen Desorptionsmethoden gelöst und detektiert werden

Albumin ist im Vergleich zu den Plasmaproben auf **a** nur in einer Menge von 1,19% vorhanden, auf **b** aber um das Zwanzigfache und auf **c** und **d** um das Zehnfache erhöht.

Die Apolipoproteine waren auf **a**, **c** und **d** mit 35-38% ebenfalls die dominierenden Proteine.

Das Verhältnis der Apolipoproteine der einzelnen Nanopartikelzubereitungen untereinander ähnelt den Verhältnissen nach Inkubation im Plasma.

#### 4.1.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um die Polymethylmethacrylat-Nanopartikel in Form und Gestalt besser charakterisieren zu können, wurden die Partikel mit einem Transmissionselektronenmikroskop bei einer Vergrößerung von 10.000 und 150.000 untersucht. Auf den Bildern (siehe Abb. 10) ist deutlich zu sehen, daß die Nanopartikel eine rund bis oval aufweisen. Die Größen für die einzelnen Partikel können mit Hilfe der Meßleiste bestimmt werden. Wie schon anhand der Volumenverteilungskurve (siehe Abb. 5) der Nanopartikel erkennbar, liegt der überwiegende Anteil der Partikel unter und um 100 nm. Da die Nanopartikel für die elektronenmikroskopische Untersuchung speziell (z.B.:Trocknungsprozeß) vorbereitet werden mußten, kann über das Aggregationsverhalten der Partikel keine Aussage getroffen werden.

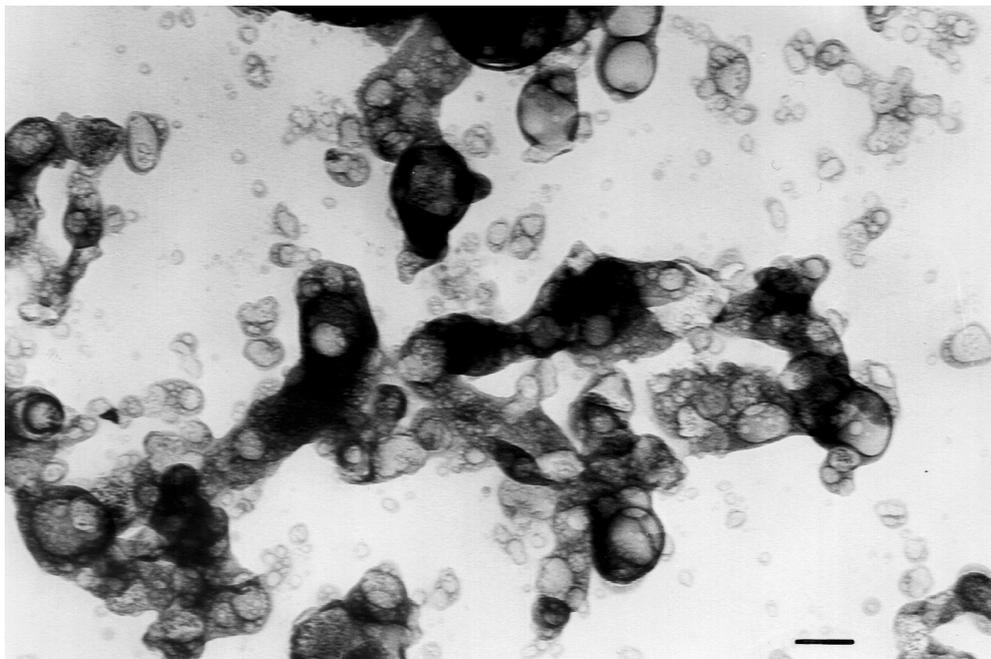


Abb. 10: PMMA-Nanopartikel, der Balken entspricht 100 nm

## **4.2 *in vivo*-Ergebnisse**

Die aus den Tierversuchen gewonnenen PMMA-Konzentrationen in den Geweben und im Blut wurden in tabellarischer und graphischer Form dargestellt. Die Körperverteilung der Nanopartikel wird als Menge (ng) PMMA-Nanopartikel pro mg Organmasse oder ml Blut angegeben. Die ermittelten Werte sind als Medianwerte mit 1. und 3. Quartil in Tabellenform aufgeführt. In den Graphiken sind, aufgrund der besseren Anschaulichkeit, nur die Medianwerte dargestellt. Die Zeitachse ist aus übersichtlichen Gründen nur bis zum vorletzten Zeitpunkt (72 h) eingezeichnet. Um die ermittelten Werte besser interpretieren zu können, wurden die Ergebnisse der statistischen Berechnungen immer im Anschluß an die jeweiligen Tabellen angegeben. Eine Darstellung der Werte als prozentualer Anteil an der gesamt applizierten Dosis ist im Anhang der Arbeit zu sehen.

### **4.2.1 Versuch I**

Im Versuch I wurde die Verteilung der i.v. applizierten <sup>14</sup>C-PMMA-Nanopartikel an B16-Melanom tragenden B6D2F1-Mäusen untersucht. Für jede Nanopartikelpräparation (A, B, C, D) wurden jeweils 5 Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 8 h; 24 h; 72 h; 168 h) untersucht. Die Tiere zeigten eine durchschnittliche Tumormasse von 1,11 g (SD ± 0,66 g). Da in der Gruppe C am Zeitpunkt 2 h nur 2 Tiere zur Verfügung standen, konnten diese Daten für die statistischen Untersuchungen nicht mit herangezogen werden. Die anderen drei Tiere verstarben während der Narkose.