

4 Methoden

4.1 Herstellung kolloidaler Arzneistoffträger

4.1.1 Hochdruckhomogenisation

Die Homogenisation (Feinstzerkleinerung) mittels Hochdruck-Spalt-Homogenisator (Hochdruckhomogenisator) wird seit Beginn des 20. Jahrhunderts bei der Milchproduktion verwendet. Seither hat sich die Methode in vielen Industriezweigen etabliert. Gerade in der pharmazeutischen Technologie hat sie einen breiten Anwendungsbereich, unter anderem zur Herstellung von Emulsionen (Bock et al., 1994, Müller et al., 2004), kolloidalen Lipiddispersionen wie SLN (Schwarz et al., 1994, Müller et al., 2000) oder NLC (Nanostrukturierte Lipidcarrier) (Radtke und Müller, 2001) und Nanosuspensionen von schwerlöslichen Wirkstoffen (Krause und Müller, 2001, Dunay et al., 2004, Möschwitzer et al., 2004). Aufgrund der bei dieser Methode resultierenden geringen Teilchen-/Tröpfchengröße ist eine parenterale Applikation mit den genannten Systemen prinzipiell möglich.

In der Literatur werden für die Herstellung von SLN noch weitere Methoden beschrieben, so die Herstellung aus warmen Mikroemulsionen (Gasco, 1993), die Präzipitation aus O/W-Emulsionen (Siekmann und Westesen, 1996) oder die Produktion mittels Mikromischern (Hildebrand et al., 2000). Die in dieser Arbeit zur Herstellung von SLN verwendete Hochdruckhomogenisation hat jedoch den Vorteil, dass auf die Verwendung von organischen Lösungsmitteln verzichtet werden kann. Außerdem kann die Konzentration der Lipidphase auf ca. 40% (abhängig vom Lipid) erhöht werden (Mehnert und Mäder, 2001).

Verwendet wurde der Micron LAB 40 der Firma APV Systems (Unna), der mit Drücken zwischen 100 und 1600 bar arbeiten kann. Das Volumen des Homogenisationsgutes liegt hier bei 40 ml, das Totvolumen bei 2 ml. Durch einen angepassten Aluminium-Temperiermantel war eine Produktion unter Temperaturkontrolle möglich. Das Gerät hat den Vorteil, dass damit erzielte Ergebnisse einfach auf den Produktionsmaßstab übertragbar sind, da es für den Labormaßstab direkt durch „scaling-down“ entwickelt wurde. Für die Zerkleinerung der flüssigen (geschmolzenen), inneren Lipidphase ist der kombinierte Mechanismus aus Kavitation und Turbulenz verantwortlich (Müller und Wissing, 2003).

Für die Stabilität der homogenisierten Systeme ist es häufig nötig mehrere Zyklen zu fahren, da zum Erhalt der kleinen Tröpfchen/Partikel die neu gebildeten Oberflächen erst durch Emulgatormoleküle neu besetzt werden müssen. Die den Herstellungsprozess beeinflussenden Faktoren wie Zyklenzahl, Druck und Temperatur wurden bereits ausgiebig untersucht (Schwarz, 1995, zur Mühlen, 1996, Müller et al., 1997b).

Darauf basierend wurde für die Herstellung der SLN folgendes Standardprotokoll gewählt (Chargengröße 40 g):

1. Separates Erhitzen von Lipid- und Wasserphase auf gleiche Temperatur. In der Regel enthielt die Wasserphase den Emulgator. Für Cetylpalmitat-Chargen wurde eine Herstellungstemperatur von 75°C gewählt. Bei Verwendung anderer Lipide wurde sie abhängig von deren Schmelzpunkte (mind. 10°C darüber) erhöht.
2. Vereinigung von Lipid- und Wasserphase und Herstellung einer Präemulsion mittels eines Ultra-Turrax T25 (Jahnke und Kunkel, Staufen) (30 s mit 8000U/min).
3. Hochdruckhomogenisation der Präemulsion bei 500 bar, 3 Zyklen, bei 75°C (oder entsprechender Temperatur).
4. Abfüllen der heißen Nanoemulsion in silanisierte Glasvials und abkühlen auf Raumtemperatur.

4.1.2 Herstellung von Nanopartikeln aus Gelatine

Die Herstellung der Gelatine-NP erfolgte von Herrn Jan C. Zillies in der Abteilung Pharmazie der Ludwigs-Maximilians-Universität München im Arbeitskreis von Herrn Dr. Conrad J. Coester. Im folgenden soll nur das Grundprinzip der Herstellung erläutert werden. Für eine ausführliche Darstellung sei auf die Dissertation von Herrn Zillies verwiesen (2006).

4.1.2.1 Zwei-Stufen-Desolvationstechnik

Gelatine Typ A wurde 5%ig in demineralisiertem Wasser unter Erhitzen auf 50°C gelöst. Zu dieser Lösung wurde unter Rühren Aceton hinzugefügt, wodurch die Gelatine desolvatisiert wurde und sich teilweise als Schleim absetzte. Zusätzlich verblieb im Überstand eine Mischung aus desolvatisierter und gelöster Gelatine. Da dieser Überstand hauptsächlich aus dem niedermolekularen Gelatineanteil bestand, der die Herstellung einer stabilen Gelatine-NP Suspension mit enger Größenverteilung verhindert, wurde dieser durch Dekantieren abgetrennt. Das zurück-

gebliebene Sediment wurde erneut unter Erwärmen auf 50°C in Wasser gelöst und auf einen pH von 2,5 eingestellt. Anschließend wurde durch erneute Zugabe von Aceton die Gelatine zum zweiten Male desolvatisiert. Auf diese Weise bildete sich eine Dispersion von Gelatine-NP mit einer mittleren Größe von ca. 140 nm. Danach wurde zur Quervernetzung der Partikel Glutaraldehyd hinzugegeben und das Ganze über Nacht bei ca. 500 U/min gerührt, wodurch bereits ein Großteil des Acetons abdampfen konnte. Die Partikeldispersion wurde danach bei 10.000 g zentrifugiert und durch viermaliges Waschen mit demineralisiertem Wasser aufgereinigt.

4.1.2.2 Positiv geladene Gelatine Nanopartikel und Beladung mit DNA

Um positiv geladene Gelatine-NP herzustellen, erfolgte eine Kopplungsreaktion mit 2-Aminoethyl-trimethylammoniumchlorid (Cholamin). Dafür wurde die Partikeldispersion auf einen pH-Wert zwischen 4,5 und 5,0 eingestellt und unter Rühren (500 U/min) Cholamin zugegeben. Nachdem sich das Cholamin vollständig aufgelöst hatte wurde 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimid (EDC) zugegeben. EDC aktiviert die Carboxylgruppen auf der Oberfläche der Gelatine-NP über die Bildung eines Intermediats und fördert so deren Umsetzung mit Cholamin. Die Partikeldispersion wurde dann für 4-5 h gerührt und abschließend analog der Herstellung durch mehrfaches Waschen aufgereinigt. Die Überprüfung der Reaktion erfolgte durch die Bestimmung des Zetapotentials der Nanopartikel.

Die Beladung der G-NPpos mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid (21mer) erfolgte in einem Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS-Puffer) durch zweistündiges Inkubieren der Partikeldispersion mit 5% (m/m) Oligonukleotid bei Raumtemperatur und gleichzeitigem Schütteln bei 400 U/min (Bühler-Swip KS-10, Bühler, Tübingen), da sich diese Bedingungen und dieses Mengenverhältnis zuvor als optimal herausstellten (vollständige Beladung) (Zwiorek et al., 2005). Die Überprüfung der Reaktion erfolgte (nach Abtrennung der beladenen Partikel mittels Zentrifugation) durch UV-Messung des nicht gebundenen Anteils an Oligonukleotid bei 260 nm.

4.1.3 Herstellung von „Kern-Schale-Nanopartikeln“

Die Herstellung von „Kern-Schale-Nanopartikeln“ erfolgte von Frau Silja Leyke am Fraunhofer Institut für angewandte Polymerforschung (FhIAP). Im folgenden ist die Herstellung nur in Kurzform beschrieben. Für eine ausführliche Darstellung wird auf die Dissertation von Frau Leyke (2006) verwiesen.

Im ersten Schritt erfolgte die Synthese von fluoreszenzmarkierten „Polystyrol-Kernen“ mittels klassischer Emulsionspolymerisation (Paulke et al., 1992). Bei diesem Verfahren wurde der Emulgator (Natriumdodecylsulfat, SDS) in demineralisiertem Wasser gelöst. Nach Zugabe des Monomers (Styrol), Quervernetzlers und Fluoreszenzfarbstoffs (Rhodamin B) wurde die Emulsion mit Stickstoff begast, bis zur Reaktionstemperatur aufgeheizt und die Polymerisation durch Zugabe der Initiatorlösung (Kaliumperoxodisulfat, KPS) gestartet. Nach der Reaktionszeit wurde die Latexdispersion abgekühlt und zur Entfernung von Restmonomeren und Emulgator mittels Dialyse gegen demineralisiertes Wasser aufgereinigt.

Der zweite Syntheseschritt („Saatpolymerisation“) erfolgte mit 1 g der „Polystyrol-Kerne“ als Polymerisationskeime für 2 g Butylcyanoacrylat. Beides wurde im Reaktionsgefäß zusammen mit 5 mg Arzneistoff in demineralisiertem Wasser bei pH 2 vermischt und zur Reaktion gebracht (Scherer, 1992). Die resultierenden „Kern-Schale-Nanopartikel“ (MC81cs unbeladen bzw. arzneistoffbeladen) wurden nach Neutralisation mit Natriumhydroxid erneut mittels Dialyse gegen demineralisiertes Wasser gereinigt.

4.2 Charakterisierung kolloidaler Arzneistoffträger

4.2.1 Zwei-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (2-DE)

Die zwei-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (2-D PAGE oder 2-DE) war in dieser Arbeit die zentrale Methode zur Charakterisierung von Arzneistoffträgern. Sie ist ein hochauflösendes Verfahren zur Auftrennung komplexer Proteingemische aufgrund zweier, voneinander unabhängiger Parameter. Die Trennung der Proteine erfolgt in der ersten Dimension (isoelektrische Fokussierung, IEF) nach ihrer Ladung (nach dem pI) und in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) nach dem Molekulargewicht (MW).

Bereits in den 60er Jahren wurden die ersten Elektrophoresen durchgeführt, die lösliche Proteine nach unterschiedlichen Parametern auftrennten. Ein entscheidender Durchbruch gelang jedoch Mitte der 70er Jahre, als Klose (1975) und O'Farrel (1975) durch Denaturierung der Proteine während der Probenaufbereitung erstmals ganze Zellinhalte in tausende Proteinspots auftrennten. Diese hochauflösende 2-DE hat im Vergleich zur nativen 2-DE den Vorteil, auch schwerlösliche und strukturgebundene Proteine zu erfassen. Bjellqvist et al. (1982) konnten mit der Entwicklung der „immobilisierten pH Gradienten“ eine weitere

Verbesserung der Methode etablieren, die die Kathodendrift (Righetti und Drysdale, 1973), den gravierendsten Nachteil der Fokussierung in der ersten Dimension mit den herkömmlichen Trägerampholyten, überwand. Das ständig wachsende Interesse an dieser Methode führte zu weiteren zahlreichen Verbesserungen und Ergänzungen, die heute die Auftrennung von mehr als 10.000 Proteinspots ermöglichen (Klose und Kobalz, 1995).

Die 2-DE findet beispielsweise wichtige Anwendungen bei der Untersuchung von Proteinen in der klinischen Diagnostik (Hochstrasser und Tissot, 1991) oder in der Genomforschung (Jungblut und Wittmann-Liebold, 1995). So können nicht nur vergleichende Untersuchungen von gesundem und krankem Gewebe stattfinden, sondern in Kombination mit anderen Methoden auch geschädigte Gene durch ihre Überexpression der codierten Proteine identifiziert werden.

Die Durchführung der 2-DE erfolgte in der vorliegenden Arbeit im wesentlichen nach der von Hochstrasser et al. (1988) beschriebenen Methode. Blunk konnte dieses 2-DE-Protokoll für die Analytik von Plasmaproteinadsorptionsmustern auf kolloidalen Arzneistoffträgern modifizieren und etablieren (Blunk, 1994). Das Standardprotokoll umfasst folgende Teilprozesse:

1. Inkubation der Partikel in Plasma
2. Separation der Partikel von überschüssigem Plasma
3. Desorption der adsorbierten Proteine von der Oberfläche der Partikel
4. Elektrophoretische Auftrennung
5. Anfärbung der Proteine
6. Auswertung der 2-DE-Gele

4.2.1.1 Probenvorbereitung

4.2.1.1.1 Inkubation

Die Proteinadsorption wurde in dieser Arbeit unter Verwendung gleicher Oberflächen der Partikel routinemäßig in Citrat-stabilisiertem Humanplasma untersucht. Das Humanplasma wurde von gesunden Freiwilligen gespendet (Deutsches Rotes Kreuz (DRK), Berlin) und bei -70°C gelagert.

Durch die in der Literatur vorliegenden Adsorptionsstudien war ersichtlich, dass die Adsorption eines bestimmten Proteins sich in Abhängigkeit vom Medium, in dem es

vorher gelöst war, deutlich verändert (Vroman et al., 1980, Vroman und Adams, 1986, Brash, 1987, Blunk, 1994, Cornelius et al., 2002b). Dabei spielen vor allem die Konkurrenzreaktionen mit anderen Proteinen eine große Rolle. Um die physiologischen Bedingungen *in vivo* zu simulieren, wurden deshalb die routinemäßigen Studien in Vollplasma durchgeführt und eine Inkubationstemperatur von 37°C gewählt. Nur so konnte gewährleistet werden, dass auch im Plasma nur gering konzentrierte Proteine, die aber im Adsorptionsprozess und/oder in der Organverteilung große Bedeutung besitzen, zur Analytik gelangten.

Zusätzlich wurden jedoch auch unterschiedlich starke Verdünnungen von Plasma mit bidestilliertem Wasser untersucht, um Erkenntnisse über die Kinetik der ersten Phase der Proteinadsorption (Subsekundenbereich) auf SLN zu gewinnen (siehe Kapitel 5.1.4).

Für die routinemäßigen Studien wurde eine Inkubationszeit von 5 min gewählt, weil im Allgemeinen die ersten 5 min nach i. v. Injektion für die Organverteilung der Partikel *in vivo* entscheidend sind. Im Falle einer Erkennung durch das MPS sind nach dieser Zeit nämlich bereits 90% der injizierten Dosis aus dem Blutstrom eliminiert (O'Mullane et al., 1987), d. h. zu diesem Zeitpunkt wurde das für die Elimination verantwortliche Proteinmuster bereits adsorbiert bzw. im Falle keiner Erkennung durch das MPS jenes Proteinmuster, das die Partikel vor einer Elimination geschützt hat. Im letzteren Fall wurde eine verlängerte Zirkulationszeit der Partikel im Blutstrom festgestellt (Illum et al., 1987, Cattell et al., 2003). In der Literatur befinden sich einige Studien, die die Zeitabhängigkeit der Proteinadsorption auf Oberflächen beschreiben (Vroman et al., 1980, Vroman und Adams, 1986, Blunk et al., 1996, Brash, 2000). Um mögliche Veränderungen der Proteinzusammensetzung auf der Partikeloberfläche während verlängerter Zirkulationszeit zu detektieren, wurde zusätzlich die Adsorption in Abhängigkeit von der Zeit untersucht (siehe Kapitel 5.1.4).

4.2.1.1.2 Partikelseparation: Zentrifugation und Gelfiltration

4.2.1.1.2.1 Zentrifugation

Nach Ende der Inkubationszeit galt es, die Partikel wieder vom Plasma abzutrennen. Dies geschah in den vorherigen Arbeiten (Blunk, 1994, Thode, 1996, Lück, 1997, Harnisch, 1998, Gessner, 2001, Lind, 2002, Schmidt, 2002) sowie in der vorliegenden Arbeit routinemäßig durch Zentrifugation (Biofuge 22R, Heraeus

Sepatech, Hanau), wobei sich Geschwindigkeit und Dauer nach Art der Partikel richtete (vgl. Kapitel 5.1.1.1.1).

Partikelproben, deren Dichten höher sind als die des Inkubationsmediums (z. B. Polymernanopartikel oder Gelatine Nanopartikel), bilden am Boden des Zentrifugationsgefäßes (2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße „Safe-Lock“, Eppendorf, Hamburg) einen Pellet. Hingegen ergibt sich bei der Untersuchung von O/W-Emulsionen durch die geringere Dichte der Ölphase eine scharf abgegrenzte „Emulsions-Schicht“ als Überstand mit einem klaren Unterstand aus Plasma.

Im ersten Fall konnte das überstehende Medium leicht mit Hilfe einer Pipette abgezogen werden. Im zweiten Fall wurde die „Lipid-Schicht“ zweimal mit einer Kanüle durchstoßen und das Plasma anschließend vorsichtig mit Hilfe einer Spritze abgezogen, ohne dass sichtbare Mengen der Fetttröpfchen mit entfernt wurden (Harnisch und Müller, 1998).

In beiden Fällen wurden die zurückbehaltenen Partikel in einem geeigneten Waschmedium redispersiert und erneut zentrifugiert, um das Waschmedium danach auf die selbe Weise zu entfernen wie zuvor das Plasma. Danach folgten noch zwei weitere Waschschriffe.

Der Einfluss des verwendeten Waschmediums, die Effektivität des Waschprozesses und die Stabilität des erhaltenen Proteinadsorptionsmusters wurden für Polystyrol-Partikel (Blunk, 1994) und Emulsionen (Harnisch und Müller, 1998) bereits untersucht.

Die Abtrennung, der in dieser Arbeit vornehmlich untersuchten SLN vom überschüssigen Plasma mittels Zentrifugation, stellte sich bei den meisten Formulierungen als Problem dar, da die Dichten der verwendeten Lipide oft im Bereich des Wassers lagen. Eine Trennung vom Inkubationsmedium bzw. vom Waschmedium war deshalb auf diese Weise nicht möglich oder verlief nur unzureichend (keine eindeutig getrennten Schichten). Diederichs (1996) konnte ein ähnliches Trennungsproblem mit Liposomen mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) lösen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode auf SLN übertragen und als alternative Separationsmethode für SLN validiert und etabliert (siehe Kapitel 5.1.1).

4.2.1.1.2.2 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine chromatographische Trennmethode, mit der es möglich ist, ein Stoffgemisch nach der unterschiedlichen Molekülgröße der einzelnen

Komponenten aufzutrennen (Größenausschlusschromatographie). Als Trennmittel wird ein inertes, gequollenes Trägermaterial verwendet, das im Allgemeinen aus einem drei-dimensionalen Netzwerk von quervernetzten Makromolekülen aus Agarose oder Dextran besteht. Die Wahl des zu verwendenden Trennmittels hängt von der Größe und chemischen Natur der zu trennenden Moleküle/Partikel ab. Als Elutionsmittel dienen in der Regel Wasser oder wässrige Puffersysteme.

Das Trennprinzip der Größenausschlusschromatographie ist in Abb. 4.1-1 dargestellt. Die kleinen Moleküle des zu trennenden Gemisches können in die Poren der Gelmatrix diffundieren. Je kleiner die Moleküle sind, umso mehr Poren sind für sie im Gel zugänglich. Dagegen können größere Moleküle an den Poren vorbeiwandern und somit die Säule als erstes verlassen. Die Moleküle erscheinen deshalb in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße im Eluat (Molekülsiebeffekt).

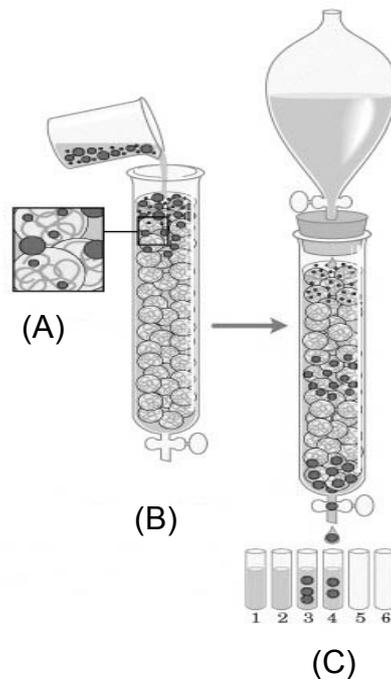


Abb. 4.2-1: Trennprinzip der Größenausschlusschromatographie: Die Probe mit den zu trennenden Molekülen/Partikeln wird auf die Säule aufgegeben (B). Dabei diffundieren v. a. die kleineren Moleküle in die Poren der Gelmatrix (A), während größere an den Poren vorbei wandern und somit die Säule als erstes verlassen (C) (Amersham, 1993).

Die Trennung der SLN vom Inkubationsmedium erfolgte mit einer C 10/20 Säule (1 cm x 20 cm) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), die mit 10 ml Sepharose 2B (Amersham Pharmacia Biotech) als Trennmittel befüllt wurde. Sepharose 2B ist ein 2%iges aufgereinigtes Agarosegel, welches nur noch sehr wenige geladene Gruppen (Sulfat- und Carboxylgruppen) enthält. Trotzdem besteht noch das geringe Risiko einer Adsorption von basischen Proteinen an diesen

Gruppen. Um dies auszuschließen, musste der Eluent eine Ionenstärke von mindestens 0,02 aufweisen (Amersham, 1993, Diederichs, 1996). Dies erfolgte durch Verwendung eines 5 mM Phosphatpuffers pH 7,4, der genau diese Ionenstärke aufwies.

Nach vorsichtigem Aufbringen der Probe auf das Gelbett, erfolgte die Trennung mit diesem Eluenten bei einer Flussrate von 18 ml/h, die mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Masterflex, Cole-Parmer Instrument Company, Barrington, USA) eingestellt wurde. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 1 ml aufgefangen und anschließend bei der Kalibrierung der Methode durch UV-Messung (Uvikon 940 Photometer, Kontron Instruments, Eching) bei einer Wellenlänge von 279 nm und 350 nm vermessen. So konnte berechnet werden, in welchen Fraktionen sich SLN oder Plasma bzw. beides befand (vgl. Kapitel 5.1.1.1.1). Anschließend wurde die Säule mit dem dreifachen Bettvolumen mit dem Puffer gewaschen, um diese für die nächste Probe zu reinigen.

4.2.1.1.3 Proteindesorption und Vorbereitung für die IEF

Nach der Partikelaufreinigung durch Zentrifugation bzw. Gelfiltration erfolgte die Desorption der zuvor an den Partikeloberflächen adsorbierten Proteine mit einer solubilisierenden, SDS-enthaltenden Lösung („Lösung D“, genaue Zusammensetzung siehe Anhang) durch 5 min Inkubation bei 95°C (Cook und Retzinger, 1992). Die Effektivität dieser Desorption wurde für unmodifizierte Polystyrol-Partikel (Blunk, 1994) bzw. für PEG-modifizierte Polystyrol-Partikel (Gessner et al., im Druck 2005) mittels BCA-Proteinassay mit über 90% angegeben. Danach wurde die Mischung mit einer zweiten Lösung versetzt, die unter anderem Harnstoff und ein zwitterionisches Tensid (CHAPS) enthielt (genaue Zusammensetzung siehe Anhang). Der Harnstoff bewirkt dabei die Dissoziation der Wasserstoffbrücken und Aufhebung der elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb der Proteine, CHAPS löst die hydrophoben Bindungen der Proteine. Durch die vollständige Aufspaltung der Proteinkomplexe werden so auch die schwerlöslichen Proteine in Lösung gebracht, sodass alle Proteinketten in der anschließenden hochauflösenden 2-DE erfasst werden können (Hochstrasser et al., 1988). Das CHAPS bildet außerdem Mischmizellen mit dem zuvor zugesetzten SDS, was für die anschließende IEF eine notwendige Bedingung ist, da SDS die Eigenladungen der Proteine maskieren würde.

Bei der Untersuchung von SLN und Emulsionen musste zudem nach Zugabe dieser Lösungen erneut 10 min zentrifugiert werden, um Lipid-Reste aus der Probe zu

entfernen, die sonst die IEF stören würden (Harnisch und Müller, 1998). Danach wurden 100 µl der wässrigen Lösung der 2-DE zugeführt.

4.2.1.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der IEF wandern die Proteine gemäß ihrer Eigenladung in einem elektrischen Feld bis zu dem Punkt in einem pH-Gradienten Richtung Anode bzw. Kathode, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist. Dieser pH-Wert ist der pI des jeweiligen Proteins. Entfernt es sich – aufgrund von Diffusion - wieder von diesem Punkt, erhält es wieder eine Ladung, wodurch es wieder zum pI wandert.

Der Theorie nach ist die IEF also eine Gleichgewichtsmethode (Endpunktmethode). Bei den früher verwendeten Trägerampholyten war jedoch der pH-Gradient, bestehend aus einem Gemisch von amphoteren, kleinmolekularen Oligoamino- und Oligocarbonsäuren, nicht stabil, sondern wanderte mit Zunahme der Fokussierungszeit zunehmend in Richtung Kathode. Das entstehende IEF-Muster war deshalb stark zeitabhängig und nur bedingt reproduzierbar.

Deshalb werden heute, so auch in dieser Arbeit, nur noch „immobilisierte pH-Gradienten“ (IPG) zur IEF verwendet. IPG's unterscheiden sich grundsätzlich von mit Trägerampholyten erzeugten pH-Gradienten, da sie in die Gelmatrix einpolymerisiert sind und somit im elektrischen Feld nicht wandern. Der Gradient ist zeitstabil, was bedeutet, dass ein zeitunabhängiges Fokussierungsmuster entsteht, was die Reproduzierbarkeit der Spot-Positionen entlang der IEF-Achse im 2-DE Gel erheblich erhöht (Görg et al., 1988a und b). Der Gradient wird durch Copolymerisation von Acrylamid mit Acrylamidderivaten mit puffernden Gruppen, den sogenannten Immobilinen, hergestellt. Diese Immobiline sind chemisch definierte Einzelsubstanzen (schwache Säuren und Basen), mit denen man mittels eines Gradientenmischers genau definierte und chargenunabhängige pH-Gradienten herstellen kann (Görg et al., 1998).

Bei dieser Arbeit kamen für routinemäßige Untersuchungen Immobiline DryStrips der Firma Amersham Pharmacia Biotech zum Einsatz. Diese IPG-Gelstreifen besitzen einen nichtlinearen Gradienten von pH 3-10. Dies hat den Vorteil, dass der neutrale pH-Bereich von pH 5-7, in dem sich die meisten Proteine wiederfinden, aufgeweitet ist. Das hat aber gleichzeitig den Nachteil, dass z. B. der pH-Bereich von pH 4,5-5,1, in dem sich sieben unterschiedliche Proteinspots von Apolipoproteinen mit ähnlichem MW befinden (ApoC-III, ApoC-II und ApoA-II (Haeberli, 1995)), sehr schlecht

aufgelöst ist. Diese drei Proteinspezies kommen jedoch auf manchen Systemen (v. a. SLN und Emulsionen) in sehr großen Mengen vor. Weiterhin ist zu beachten, dass Ihnen eine hohe Bedeutung für die Organverteilung zukommt (Weisgraber et al., 1990) (vgl. Kapitel 5.1.1.3). Deshalb wurde für ausgewählte SLN-Formulierungen zusätzlich eine 2-DE Untersuchung mit IPG's mit linearem Gradienten von pH 3-10 durchgeführt (Blue IPG-Strips pH 3-10, Serva, Heidelberg), um diesen Bereich besser aufzulösen.

Allen industriell gefertigten IPG-Gelstreifen ist gemeinsam, dass sie getrocknet und tiefgefroren erworben werden (Lagerung bei -70°C) und vor der eigentlichen IEF in einer speziellen Rehydratisierungslösung (Zusammensetzung siehe Anhang) mindestens 8 h quellen müssen. Diese Quellung erfolgte in dieser Arbeit volumenkontrolliert zusammen mit der Probe (Gesamtvolumen 350 μl) in einem Rehydratisierungs-Tray der Firma Amersham Pharmacia Biotech.

Danach wurde die IEF mit einer Multiphore II (Amersham Pharmacia Biotech) mit einem Gesamtvoltstundenprodukt von 20.375 Vh nach dem Protokoll von Bjellqvist et al. (1993) durchgeführt (Tab. 4.2-1). Als Spannungsquelle diente ein Netzgerät der Firma Consort (Turnhout, Belgien).

Tab. 4.2-1: Durchführung der IEF nach Bjellqvist et al. (1993)

Programmstufe	Spannung [V]	Dauer [h]	[Vh]
1	150	0,5	75
2	300	1	300
3	1.500	1	1.500
4	3.500	1	3.500
5	5.000	3	15.000
gesamt		6,5	20.375

4.2.1.3 Äquilibration und SDS-PAGE

Die Elektrophorese unter Verwendung von SDS wurde von Shapiro et al. eingeführt (1967). SDS bindet an hydrophobe Bereiche der Proteine in einem festen Mengenverhältnis von ca. 1,4 g SDS pro 1 g Protein (Westermeier, 1990). Es bilden sich anionische Mizellen mit einer konstanten Nettoladung pro Masseneinheit Protein, d. h. die Eigenladungen der Proteine werden überdeckt. Die Stokesschen Radien der Mizellen sind proportional zum MW der Proteine, d. h. je größer das MW der Proteine, desto größer werden die SDS-Mizellen. In der nachfolgenden SDS-

PAGE trennt man also effektiv nach Größe und zieht dann Rückschlüsse auf das MW. Die elektrophoretische Mobilität der Proteine ist dann eine lineare Funktion der Logarithmen der MW. Die SDS-Elektrophorese erfolgt in den meisten Fällen in Polyacrylamid-Gelen. Die Porengröße in den Gelen lässt sich über die Acrylamid-Konzentration und den Vernetzungsgrad einstellen. Letzterer ist vom Mengenverhältnis des Quervernetzers zu Acrylamid abhängig (Westermeier, 1990). Die Proteine gelangen im Verlaufe der SDS-PAGE zu einem Punkt, an dem sie aufgrund ihrer Größe im immer enger werdenden Netzwerk des Gels stecken bleiben.

Um eine optimale Beladung der Proteine mit SDS zu erreichen, wurden die IPG-Streifen nach der IEF in zwei Schritten mit SDS-haltigen Lösungen äquilibriert (siehe Anhang). Im ersten Äquilibrierungsschritt (15 min Einwirkzeit) soll DTE-Zusatz noch nicht reduzierte bzw. durch Oxidation während der IEF wieder gebildete Disulfidbrücken spalten. Der Zusatz von Iodoacetamid zur zweiten Äquilibrierungslösung (20 min Einwirkzeit) alkyliert die Thiolgruppen der denaturierten Proteinketten und schützt diese so vor einer erneuten Oxidation. Außerdem wird dadurch überschüssiges DTE entfernt, welches zu vertikalen Streifen im Gel führen würde (langsam in Lösung gehende Proteine – „point streaking“) (Görg et al., 1995). Auch die nachfolgende Silberfärbung würde durch DTE gestört werden. Die Äquilibrierung der IPG-Streifen wurde im Rehydratisierungs-Tray (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt und die Lösungen dabei mit einer Schüttelmaschine (Bühler-Swip KS-10, Bühler, Tübingen) bewegt.

Nach erfolgter Äquilibrierung wurden die IPG-Streifen an die Platten-Gele für die zweite Dimension angelegt und mit einem 0,5%igen Agarosegel fixiert (Hanash et al., 1987). Dem Agarosegel wurde Bromphenolblau zugegeben, um die Fließfront der SDS-PAGE anzufärben.

Die verwendeten Polyacrylamid-Gele hatten eine Totalacrylamid-Konzentration von 9-16% und eine Quervernetzer-Konzentration von 2,67%, bezogen auf den Acrylamidgehalt (Hochstrasser et al., 1988). Als Quervernetzer wurde zu Beginn der Arbeit, in Anlehnung an das Protokoll der Vorgängerarbeiten, Piperazindiacrylamid (PDA) (Bio-Rad, München) verwendet. Er wurde im Verlaufe der Arbeit durch das wesentlich preiswertere BIS (N,N'-Methylen-bis-acrylamid, Serva, Heidelberg) ersetzt, ohne dabei eine stärkere Hintergrundfärbung der Gele zu erhalten, womit der

Hersteller von PDA den hohen Preis rechtfertigt. Offenbar genügte der Zusatz von Natriumthiosulfat (Hochstrasser und Merrill, 1988), um die Hintergrundfärbung zu reduzieren und die Qualität der entwickelten Gele zu verbessern. Die Gele wurden unter Verwendung eines Gradientenmischers (Model 395 Gradient Former, Bio-Rad), einer Gießkammer (Protean II Multi-Gel Casting Chamber, Bio-Rad) und Glasplatten der Firma Bio-Rad hergestellt. Die Platten-Gele hatten eine Größe von 16 cm x 16 cm bei einer Dicke von ca. 1,5 mm. Die SDS-PAGE wurde mit 8 Gelen gleichzeitig durchgeführt, wobei sich jeweils 4 Gele in einem Elektrophorese-Tank befanden (Protean II Multi Cell, Bio-Rad). Als Spannungsquelle diente ein PowerPac 1000 (Bio-Rad), das eine Stromstärke von 40 mA pro Gel lieferte. Die Elektrophorese wurde bei Erreichen der Bromphenolblau-Fließfront des unteren Endes der Platten-Gele beendet. Die durchschnittliche SDS-PAGE dauerte 4 h, wobei die Spannung von Anfangs etwa 170 V auf ca. 400 V am Ende anstieg.

4.2.1.4 Silberfärbung

Nach der Auftrennung wurden die Proteinspots durch die sehr sensitive Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,1 ng Protein pro mm² Polyacrylamidgel (Merrill et al., 1982) und damit ca. 100 mal höher als bei einer Proteinfärbung mit Coomassie Blau (Westermeier, 1990). Silberionen besitzen eine hohe Affinität zu den funktionellen Gruppen und Peptidbindungen der Proteine. Sie binden an diese und einige werden durch diese Gruppen in sogenannte Silberkeime umgewandelt.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Proteine in den Gelen fixiert (Fällbad mit unvergälltem Ethanol und Essigsäure). Danach folgten zwei Sensitivierungsschritte: Glutaraldehyd und Naphthalindisulfonsäure fördern die Anlagerung von Silberionen an die Proteine (Rabilloud, 1990 und 1992). Anschließend erfolgte die Behandlung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung (Oakley et al., 1980). Im letzten Schritt wurde mit zitronensäurehaltiger Formaldehyd-Lösung entwickelt, wodurch die Silberionen im Gel zu metallischem Silber reduziert wurden. Dies geschieht in der Nähe der Silberkeime viel schneller als im übrigen Gel (Autokatalysator), sodass sich die Proteinspots schneller dunkelbraun bis schwarz anfärben. Um eine zu starke Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde das Verfahren durch Absenken des pH-Wertes (Einlegen in verdünnter Essigsäure) nach ca. 7 min gestoppt. Zwischen sämtlichen Schritten dieser Färbung lagen intensive Waschphasen (genaues

Färbeprotokoll siehe Anhang). Der gesamte Färbeprozess wurde auf einer Schüttelmaschine (Bühler-Swip KS-10) durchgeführt.

4.2.1.5 Auswertung der Elektrophorese-Gele

4.2.1.5.1 Qualitative Auswertung

Die routinemäßige Identifizierung von Proteinspots aus Humanplasma und –serum wurde anhand des Vergleichs mit 2-DE-Referenzgelen aus der Literatur vorgenommen (Anderson und Anderson, 1991). Auch für Plasma- und Serumproben von anderen Spezies, wie Ratte (Haynes et al., 1998) oder Maus (Skehel et al., 2000), sind Referenzgele publiziert, die für die Identifizierung der Proteinspots herangezogen wurden. Zusätzlich steht über www.expasy.ch der ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server der Universität Genf zur Verfügung, der unter SWISS-2DPAGE Referenzgele unterschiedlicher Organismen und Gewebe veröffentlicht (vgl. Abb.4.1-2).

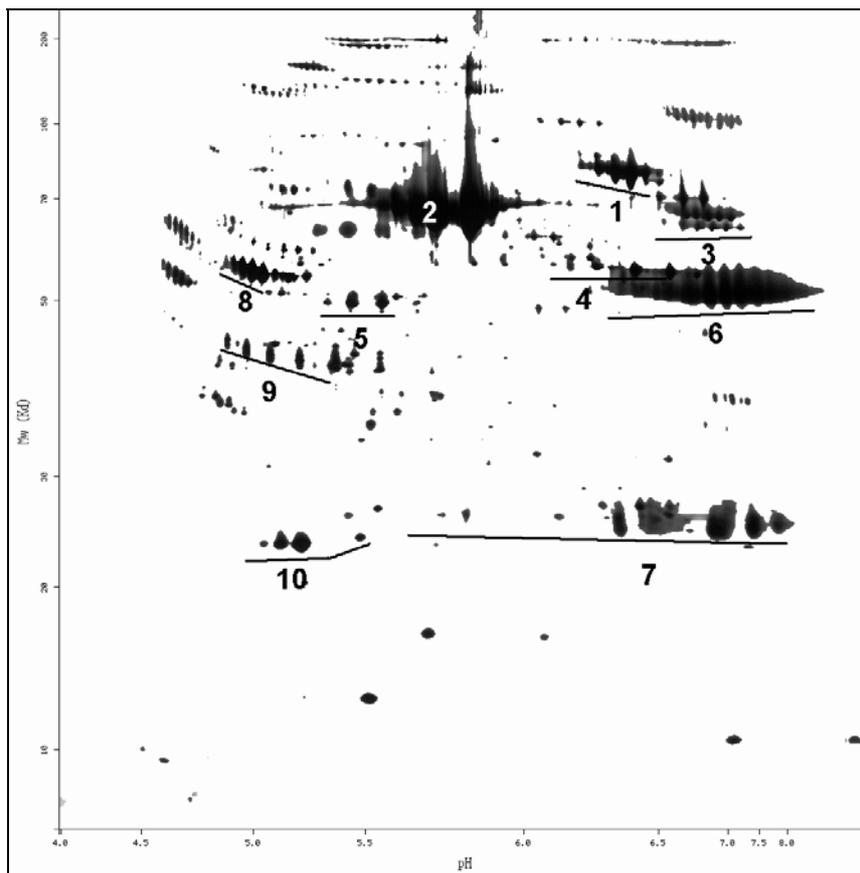


Abb. 4.2-2: 2-D-Pherogramm von Humanplasma (nach SWISS-2DPAGE unter www.expasy.ch) (1) Transferrin, (2) Albumin, (3) Fibrinogen α Kette, (4) Fibrinogen β Kette, (5) Fibrinogen γ Kette, (6) Immunglobulin schwere Kette gamma (IgG γ), (7) Ig leichte Ketten, (8) α 1-Antitrypsin, (9) Haptoglobin β Kette, (10) Apolipoprotein A-I (ApoA-I).

Der Vorteil der Datenbanken ist hierbei die ständige Aktualisierung und die damit verbundene ständige Berücksichtigung von neu identifizierten Proteinen, die auf älteren Referenzgelen nicht eindeutig bezeichnet waren.

4.2.1.5.2 Quantitative Auswertung

Für die quantitative Auswertung mussten die 2-DE-Gele (2-D-Pherogramme) in eine digitale Form umgewandelt werden. Dies erfolgte mit einem ImageScanner der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Die Gele wurden dabei stets im „Graustufenmodus“ (entspricht 64 Helligkeitsstufen) und einer Auflösung von 300 dpi (dots per inch) eingescannt. Die Maßeinheit dpi gibt dabei an, wie viele Punkte (dots) auf einem Zoll (1 Zoll = 2,54 cm) gedruckt werden können.

Für die Auswertung wurde dann die Software MELANIE III (**M**edical **E**lectrophoresis **A**nalysis **I**nteractive **E**xpert System) (Bio-Rad) verwendet. Die ursprüngliche MELANIE-Version ging aus der ELSIE-Software hervor, die zur Auswertung von Radiogrammen entwickelt wurde (Olson und Miller, 1988). Die daraus begründete, zur Quantifizierung der Proteine verwendete Einheit „cpm“ (counts per minute), wurde beim Wechsel von MELANIE II zur MELANIE III-Version durch die Angabe als dimensionsloses Volumen (Vol) ersetzt. Die Proteinmengen werden bei allen Software-Versionen aus der optischen Dichte der Pixel eines Spots und dessen Fläche auf dem 2-D-Pherogramm berechnet.

Die Spoterkennung erfolgte aufgrund der hohen Komplexität der Proteinmuster über einige komplexe mathematische Algorithmen. Die Software ermöglicht die Auswertung nach parametrischen (Spots wird gaußsche Form zugeordnet) oder nicht-parametrischen Gesichtspunkten. Da letztere bei der Berechnung stärker die Form der Spots berücksichtigt (Miller, 1989), wurde sie in der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung verwendet. Für nähere Betrachtungen der MELANIE-Software und der zugrunde liegenden Algorithmen sei auf Appel et al. (1991, 1997a, 1997b) und Raman (2002) verwiesen.

Es ist zu beachten, dass jedes Protein eine charakteristische, von anderen Proteinen unterschiedliche Affinität zu Silberionen besitzt (Nielsen und Brown, 1984). Daraus folgt, dass Spots unterschiedlicher Proteine, die die gleiche absolute Proteinmenge enthalten, durchaus unterschiedlich gefärbt sein können (Poehling und Neuhof, 1981). Eine absolute Quantifizierung ist deshalb streng genommen nur für gleiche Proteinspots auf unterschiedlichen Gelen möglich. Des weiteren ist zu beachten,

dass aufgrund der schwierigen Probenaufbereitung die Anzahl der rückgewonnenen Partikel von einer Probe zur anderen schwanken kann. Deshalb erfolgte in der vorliegenden Arbeit, in den meisten Fällen, die Betrachtung der prozentualen Anteile bestimmter Proteine am insgesamt detektierten Muster, um geringfügig unterschiedliche Bedingungen zwischen verschiedenen Läufen zu kompensieren.

Die Prozentangaben suggerieren zwar auch tatsächliche Mengenverhältnisse der Proteine eines Gels untereinander, sie sind jedoch aufgrund der beschriebenen Proteinspezifität bezüglich der Silberfärbung stets nur als semiquantitative Aussage zu betrachten. Dennoch lassen sich hierdurch die Unterschiede der Adsorptionsmuster der untersuchten Arzneistoffträger gut herausarbeiten (Blunk, 1994), auch weil nochmals deutlich darauf hingewiesen sein soll, dass insbesondere jeweils die prozentualen Anteile *eines* Proteins (z. B. ApoE) auf *mehreren* Gelen von Interesse waren.

Aufgrund des enormen Zeitaufwandes (mindestens 5 Tage von der Inkubation bis zum Ende der quantitativen Auswertung) und der hohen Kosten (ca. 200 Euro für 8 Gele) der 2-DE-Analytik war eine größere Anzahl von Stichproben nicht realisierbar, weshalb von Blunk (1994) exemplarisch die Reproduzierbarkeit der Methode bestimmt wurde. Die ermittelten Messwerte waren normalverteilt und der Variationskoeffizient der Hauptproteine (prozentualer Anteil am Gesamtmuster von > 10%) lag zwischen 3-10%. Mit abnehmendem Mittelwert wurden die Variationskoeffizienten tendenziell immer größer, sodass Anteile unter 2% mit Variationskoeffizienten nicht selten über 20% behaftet waren.

Nachdem die typischen Standardabweichungen der Methode bestimmt waren, beschränkte man sich in der Folgezeit auf eine Stichprobengröße von $n = 2$ (maximal $n = 3$) und bestimmte trotzdem (strenggenommen unzulässigerweise) die entsprechenden „Standardabweichungen“. So sollte geklärt werden, ob die ermittelten Werte die für diese Methode üblichen Schwankungen zeigen. Um die Vergleichbarkeit zu wahren, sind in der vorliegenden Arbeit die Mittelwerte der prozentualen Anteile der Proteine am insgesamt detektierten Muster, wie in den Vorgängerarbeiten, in Balkendiagrammen und die „Standardabweichungen“ mit Fehlerbalken dargestellt (wissentlich, dass dies bei $n = 2$ eigentlich nicht zulässig ist). Es wurde also vorausgesetzt, dass die Messwerte normalverteilt sind.

4.2.2 Teilchengrößenanalytik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verwendeten Partikel hinsichtlich ihrer Partikelgröße (Photonenkorrelationsspektroskopie) und Partikelgrößenverteilung bzw. der Größe ihrer Oberfläche (Laserdiffraktometrie) charakterisiert. Beides sind in der Arbeitsgruppe Müller bereits lange etablierte Methoden, so dass sie daher nur in Kürze dargelegt werden. Ausführliche Beschreibungen zur Theorie und Durchführung der Messverfahren finden sich bei Müller und Schuhmann (1996).

4.2.2.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist ein dynamisches Laserstreulichtverfahren, das Teilchen im Größenbereich von ca. 5 nm bis 5 µm erfasst. Als Ergebnis erhält man zum einen den mittleren Teilchendurchmesser und zum anderen den Polydispersitätsindex (PI) der Probe, der ein Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung ist.

Für das Messverfahren werden Schwankungen in der Streulichtintensität der Probe ausgenutzt. Dispergierte Teilchen bewegen sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung des Dispersionsmittels mit einer bestimmten Diffusionsgeschwindigkeit. Dadurch kommt es zu zeitabhängigen Intensitätsschwankungen des Laserlichts. Kleinere Partikel weisen eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit auf als größere Partikel, so dass die zeitlichen Intensitätsschwankungen schneller sind. Diese Intensitätsschwankungen werden mit einem Photomultiplier erfasst und mit Hilfe eines Korrelators in eine Autokorrelationsfunktion überführt, an die eine theoretische Korrelationsfunktion angepasst wird. Über die Korrelationsfunktion wird die Diffusionskonstante (D) ermittelt, und mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich dann der mittlere hydrodynamische Teilchenradius berechnen:

$$r = \frac{k T}{6 \pi \eta D}$$

r = mittlerer hydrodynamischer Teilchenradius

k = Boltzmannkonstante

T = absolute Temperatur

η = dynamische Viskosität des Dispersionsmittels

D = Diffusionskonstante

Der PI als Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung errechnet sich aus der Abweichung der Korrelatorfunktion von der Autokorrelationsfunktion. Bei einem idealen monodispersen System wären beide Funktionen deckungsgleich und der PI somit Null. Ab einem PI von 0,5 gelten die Messergebnisse als nicht auswertbar (Schuhmann, 1995). Handelsübliche Fettemulsionen zur parenteralen Anwendung weisen einen PI zwischen 0,10 und 0,25 auf (Schuhmann, 1995).

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Zetasizer 4 (Malvern Instruments, Malvern, UK), bestehend aus optischer Einheit, 5 mW Helium-Neon-Laser (632,8 nm) und Korrelator verwendet. Die Proben wurden mit destilliertem Wasser auf ideale Streulichtintensitäten verdünnt, um Mehrfachstreuungen zu vermeiden. Die Messungen erfolgten im Winkel von 90°.

4.2.2.2 Laserdiffraktometrie (LD)

Das Messprinzip der Laserdiffraktometrie (LD) ist die Beugung von (Laser)licht an dispergierten Teilchen. Der Größenbereich der LD liegt (abhängig vom Messgerät) zwischen 40 nm bis 2000 µm. Jedes Teilchen, auf das der Laserstrahl trifft, erzeugt auf der Brennebene einer nachgeschalteten Fourier-Linse ein charakteristisches, radialsymmetrisches Beugungsmuster. Die Erfassung der Beugungsintensitäten erfolgt auf einem aus Ringsegmenten bestehendem Multielementdetektor. Kleine Partikel erzeugen aufgrund ihrer stark gekrümmten Oberfläche große Beugungswinkel, und die stärkste Intensität des gebeugten Lichts gelangt auf die äußeren Ringsegmente des Detektors (bei größeren Partikeln entsprechend auf die inneren Ringsegmente). Bei der Messung von polydispersen Dispersionen kommt es zur Überlagerung der Beugungsmuster der einzelnen Partikelgrößen. Man erhält eine Gesamtverteilungskurve, die eine Volumenverteilung ist, d. h. man kann die prozentualen Anteile bestimmter Partikelgrößen an der Gesamtpopulation erkennen.

Die Berechnung der Partikelgrößenverteilung kann mit zwei verschiedenen Modellen erfolgen. Die Fraunhofer-Theorie dient zur Auswertung von Partikelpopulationen, die größer sind als die Wellenlänge des verwendeten Laserlichts (Müller und Schuhmann, 1996). Dagegen werden nach der Theorie von Mie der reale Brechungsindex von Teilchen und Dispersionsmedium sowie der Anteil des absorbierten Laserlichts durch die Partikel (imaginärer Brechungsindex) mit einbezogen, so dass auch Teilchen im Submikronbereich korrekt messbar sind (Zimmermann, 1995).

Für die vorliegende Arbeit wurde ein LS230 der Firma Coulter Electronics (Krefeld) verwendet. Dieses Messgerät ermöglicht zusätzlich zum Prinzip der LD durch Streuung von polarisiertem Licht (PIDS-Technologie - Polarization Intensity Differential Scattering) die hochauflösende Erfassung von Teilchen $< 1 \mu\text{m}$. Dadurch wird die Erfassung des ganzen Messbereiches von 40 nm bis 2000 μm in einer Messung ermöglicht (Müller und Schuhmann, 1996).

Zur Berechnung der Partikelgrößenverteilung von SLN wurde die Mie-Theorie verwendet, da die Partikelgrößen im Submikronbereich lagen. Müller und Schuhmann (1996) konnten für Lipidsysteme unter Verwendung eines Brechungsindex des Dispersionsmediums Wasser von 1,33, einem Brechungsindex der Lipidpartikel von 1,456 und einer Lichtabsorption der Lipidpartikel von 0,01 gut reproduzierbare Werte erhalten, die auch mit PCS Messungen korrelierten, so dass diese Werte für die Berechnungen von Lipidsystemen in dieser Arbeit übernommen wurden. Als charakteristische Parameter dienten die Durchmesser $d_{50\%}$, $d_{90\%}$, $d_{95\%}$ und $d_{99\%}$. $D_{50\%}$ bedeutet z. B., dass 50% der gemessenen Partikel unterhalb des gemessenen Wertes liegen.

4.2.3 Zetapotential und Laser-Doppler-Anemometrie

Partikel in dispersen Systemen besitzen eine Oberflächenladung, die meist negativ ist. An die Oberfläche lagern sich negative, dehydratisierte Ionen an (innere Helmholtzschicht) und darauf positive Gegenionen (äußere Helmholtzschicht). Weiter entfernt vom Partikel befindet sich die diffuse Schicht, die im Gegensatz zur fixierten Helmholtzschicht durch Anlegen eines elektrischen Feldes abgeschert wird. Das Zetapotential (ZP) ist definiert als das unter Einwirkung eines elektrischen Feldes an der Scherebene messbare Potential (Müller, 1996).

Je größer der Betrag des ZP, desto größer ist die elektrostatische Abstoßung zwischen den dispergierten Teilchen, und desto stabiler ist folglich das System. So sind bei marktüblichen parenteralen Fettemulsionen mit physikalischer Langzeitstabilität z. B. ZP-Werte zwischen -30 mV bis -60 mV messbar (Müller, 1996). Durch zusätzliche sterische Stabilisierung kann jedoch auch bei geringeren Werten Aggregation bzw. Koaleszenz verhindert werden.

Die Messung des ZP erfolgt über die Laser-Doppler-Anemometrie. Angesichts der hohen Bedeutung des ZP, unter anderem für die pharmazeutischen Technologie, wird hier davon abgesehen, alle Feinheiten der Meßmethode zu diskutieren. Deshalb

wird auf eine komplette Abhandlung über das ZP verwiesen (Müller, 1996) und das Messprinzip nur in Kürze vorgestellt.

Zur Bestimmung des ZP wird die elektrophoretische Beweglichkeit der geladenen Teilchen im elektrischen Feld messtechnisch ausgenutzt. Die Teilchengeschwindigkeit ist proportional zur herrschenden Feldstärke. Der Proportionalitätsfaktor ist gleichbedeutend mit der elektrophoretischen Mobilität der Teilchen, die wiederum nach Helmholtz-Smoluchowsky ins ZP konvertiert werden kann.

Die Messungen wurden an einem Zetasizer 4 (Malvern Instruments, Malvern, UK) durchgeführt. Die Feldstärke betrug 20 V/cm, und alle Messungen wurden in bidestilliertem Wasser durchgeführt, das mit NaCl-Lösung auf eine Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ eingestellt wurde. Der pH-Wert der Messlösung wurde mit einem pH-Meter CG840 (Mettler-Toledo, Steinbach) mit Glaselektrode (BlueLine[®], Schott, Mainz) bestimmt.

4.2.4 Bestimmung der Oberflächenhydrophobie

4.2.4.1 Bengalrosa-Adsorptionsstudien

Bengalrosa ist ein hydrophober Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 542,7 nm. Er kann zur Bestimmung der Oberflächenhydrophobie von Partikeln herangezogen werden, indem man den Verteilungskoeffizienten des Farbstoffs zwischen der Partikeloberfläche und dem Dispersionsmedium photometrisch bestimmt (Müller, 1991 und 1997). Demnach findet sich im Dispersionsmedium umso weniger Farbstoff wieder, je hydrophober die Oberfläche der Partikel ist.

Pro untersuchter Partikelsorte wurden vier bis fünf Dispersionen mit ansteigender Partikelkonzentration hergestellt. Danach wurden 1,5 ml dieser Dispersionen jeweils mit 3,0 ml einer Lösung (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) von Bengalrosa (Sigma) vermischt und 3 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Partikel mittels Zentrifugation abgetrennt und die Überstände bei 542,7 nm vermessen (Uvikon 940, Kontron). Die auf der Partikeloberfläche adsorbierte Menge Bengalrosa ergab sich aus der Differenz der ursprünglich eingesetzten Bengalrosa-Menge und der nach Ende der Inkubationszeit im Dispersionsmedium ermittelten Menge. Für jede einzelne Partikelkonzentration (bzw. Partikeloberfläche) wurde der Bengalrosa-Verteilungskoeffizient Q berechnet. Beim Auftragen von Q gegen die zugehörige Partikeloberfläche ergibt sich eine Gerade, deren Steigung (ml/m^2) ein Maß für die mittlere

Oberflächenhydrophobie ist. Da im Zähler des Quotienten Q die Konzentration von Bengalrosa auf den Partikeln steht, ist die Steigung der Geraden umso größer, je höher die Oberflächenhydrophobie der Partikel ist.

4.2.4.2 Kontaktwinkelmessungen

Die Bestimmung der Oberflächenhydrophobie über den Bengalrosa-Verteilungskoeffizienten war für SLN nicht sinnvoll, da die auf der Partikeloberfläche adsorbierten Tensidmoleküle durch den hydrophoben Farbstoff verdrängt werden können, was das Messergebnis verfälschen würde. Deshalb erfolgte bei SLN lediglich eine Abschätzung der Oberflächenhydrophobie über die Bestimmung des Kontaktwinkels von Wasser auf den entsprechenden Lipiden.

Um freie Oberflächenenergien (bzw. die Polarität) von Festkörpern zu bestimmen, kann der Benetzungswinkel (auch als Kontaktwinkel bezeichnet) als charakteristische Größe gemessen werden (Abb. 4.2-3) (Tröster und Kreuter, 1988).

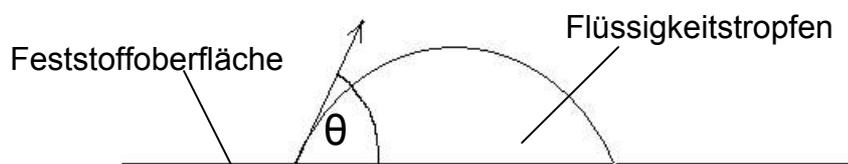


Abb. 4.2-3: Der Kontaktwinkel θ lässt sich anhand der Gestalt, die ein Flüssigkeitstropfen auf einer ebenen, festen Oberfläche einnimmt, beobachten.

Je nach Affinität der betreffenden Flüssigkeit zum Feststoff, der Oberflächenspannung der Flüssigkeit und der Oberflächenspannung des Feststoffs bilden sich verschiedene Tropfenformen aus. Dabei bedeutet ein Kontaktwinkel unter 90° eine gute und ein solcher über 90° eine schlechte Benetzung.

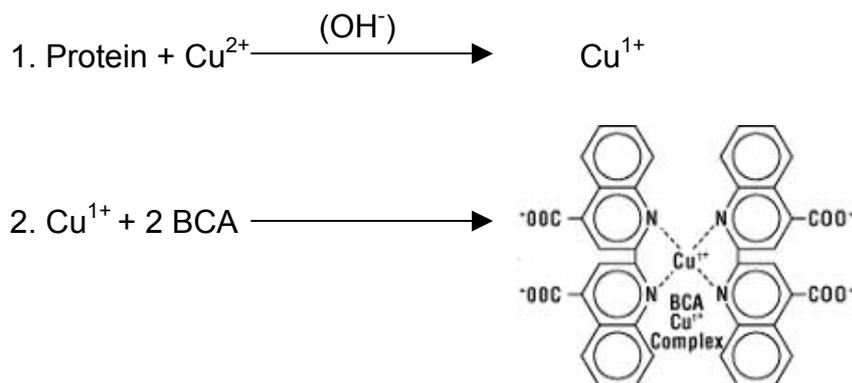
Um eine entsprechend glatte Oberfläche zu erhalten, wurden die Bulkwaren der zu bestimmenden Lipide vor der eigentlichen Messung mit Hilfe einer Hydraulikpresse (Specac, Orpington, UK) zu einem dünnen, glatten Pressling komprimiert. Danach erfolgten die Messungen nach der „Sessil Drop Methode“ mit einem Krüss G1 Goniometer (Krüss GmbH, Hamburg), in dem an das Profil eines Tropfens „Aqua purificata“ eine Tangente angelegt wurde und der entsprechende Winkel mit Hilfe einer Speziaskala abgelesen wurde. Es wurden jeweils 10 Tropfen auf die dünne

Lipid-Schicht aufgebracht und anschließend ein Mittelwert aus den Einzelmessungen gebildet.

4.3 Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure-Assay

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in einem Gemisch stehen verschiedene Assays zur Verfügung. Allen gemeinsam ist, dass zur Quantifizierung eine Farbreaktion herangezogen wird, die anschließend photometrisch ausgewertet wird. Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) nutzt die bathochrome Verschiebung (von rotbraun nach blau) des Absorptionsmaximums von Coomassie Blau bei der Bindung des Farbstoffes an basische und aromatische Seitenketten von Proteinen. Es ist ein schnelles, gut etabliertes Verfahren mit hoher Sensitivität. Nachteilig ist jedoch, dass sich die Proteine in Lösung befinden müssen, da der Farbstoff direkt an die Proteine gebunden wird (Lind et al., 2001b). Der Lowry-Assay nutzt die Bildung von Farbkomplexen zwischen den Peptidbindungen der Proteine mit Cu^{2+} in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). In einem zweiten Schritt wird dann die Farbreaktion durch Zugabe von Folin-Reagenz (Molybdat und Wolframat in der Wertigkeitsstufe VI) verstärkt, indem Reduktion des Reagenzes durch den Cu^{1+} -Protein-Komplex stattfindet (Lowry et al., 1951). Problematisch bei der Verwendung des Lowry-Assay ist seine Störanfälligkeit durch viele Substanzen, so z. B. durch SDS, was seine Verwendbarkeit, gerade in Verbindung mit der 2-DE, stark einschränkt (Smith et al., 1985).

Deshalb wurde in dieser Arbeit zur Proteinquantifizierung der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay verwendet, der Mitte der 80er Jahre von Smith et al. (1985) als Alternative zum Lowry-Assay entwickelt wurde. Dabei wurde das störanfällige Folin-Reagenz gegen das Natriumsalz der Bicinchoninsäure als hoch spezifisches Nachweisreagenz für Cu^{1+} ausgewählt. Das folgende Reaktionsschema zeigt den Mechanismus der Reaktion. Es entsteht ein purpurroter, vierzähliger Cu^{1+} -Komplex:



Der BCA-Assay hat gegenüber dem Lowry-Assay den weiteren Vorteil, dass er keine umständliche Zwei-Schritt-Methode ist. Das hergestellte Reagenz kann direkt mit der Probe vermischt und inkubiert werden. Der größte Vorteil ist aber, dass der farbgebende Komplex nicht wie beim Bradford-Assay an die Proteine gebunden ist, sondern sich in der wässrigen Lösung befindet. Deshalb können selbst Proteine, die kovalent an die Oberfläche von Partikeln gebunden sind, quantifiziert werden (Stich, 1990). Dadurch ist er hervorragend mit der 2-DE Analyse zu kombinieren, ohne dass nach der Probenaufbereitung die Proteine von der Oberfläche der Partikel abgelöst werden müssen (Gessner, 2001).

Verwendet wurde das BCA-200 Protein Assay Kit der Firma Pierce (Rockford, USA). Die Proben wurden zuerst wie unter 4.1.1 beschrieben aufbereitet. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Proben mit jeweils 2 ml BCA Reagenzmischung, bestehend aus 50 Teilen Reagenz A (enthält BCA in 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung) und 1 Teil Reagenz B (enthält Kupfer-II-sulfat), versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 60°C wurden die Proben zentrifugiert, um die Lipidpartikel vor der photometrischen Bestimmung abzutrennen (15 min bei 22.940 g und 7°C, um die Geschwindigkeit der Farbreaktion zu verringern). Die photometrische Vermessung erfolgte bei der Wellenlänge 562 nm mit einem UV-VIS Photometer (Uvikon 940, Kontron Instruments, Eching). Als Proteinstandard zur Erstellung der Kalibrierungsgerade wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Zu beachten ist, dass die Farbentwicklung keinen Endpunkt hat (Smith et al., 1985). Gemäß der Anleitung der Firma Pierce ist die Farbstabilität aber über einen Zeitraum von 10 min nach Inkubation und Abkühlung der Proben gegeben. Gessner (2001) konnte darüber hinaus zeigen, dass die Farbstabilität trotz 15 min Zentrifugation bei 7°C gewährleistet ist.

4.4 Durchführung der In-vivo-Studie mit Xenon-gesättigten Fettemulsionen

Diese Studie wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Georgieff an der Universitätsklinik für Anästhesiologie in Ulm durchgeführt, unter vorherigerer Genehmigung des Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm und des Regierungspräsidiums Tübingen. Für eine detaillierte Darstellung der Methoden sei auf die Dissertation von Frau Dr. Buttle (2004) verwiesen.

Die Versuche wurden mit gesunden, deutschen Hausschweinen durchgeführt. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit dem Inhalationsnarkotikum Sevofluran (Sevorane[®], Abbott). Die Narkosetiefe wurde durch hämodynamische Größen (Herzfrequenz, Blutdruck) und EEG-Monitoring (Hirnströme) überwacht. Um die klinische Wirkung der Xenon-gesättigten Fettemulsionen zu bestimmen, wurde vor der Injektion durch einen Zangentest (Schmerzstimulus) der individuelle MAC-Wert (minimale alveoläre Konzentration) für Sevofluran bestimmt. Die Fettemulsion wurde dann innerhalb von 30 sec als Bolus injiziert und anschließend über 30 min mit konstanter Geschwindigkeit infundiert. Während der Xenon-Anästhesie wurde in zweiminütigem Abstand der Zangentest durchgeführt und bei fehlender Reaktion des Tieres (Bewegung/Herzfrequenz- oder Blutdruckanstieg) die Sevofluran-Zufuhr reduziert. Die Senkung der Sevofluran-Konzentration gilt als Maß für die Eigenwirkung des Xenons bei gleich bleibender Tiefe der Narkose (Georgieff et al., 2003). Zusätzlich wurden nach vorgegebenen Zeitabständen Blutproben entnommen und die Xenon-Konzentration im Blut mittels GC/MS bestimmt. Der arterielle Messwert steht für das Ausmaß der Xenonsättigung vor der Lungenpassage. Er wurde mittels eines Katheters bestimmt, der in eine freigelegte Oberschenkel-schlagader eingebracht war. Die gemischt venösen Blutspiegel, die langsam ansteigen, sind ein Maß für die noch vorhandene Menge Xenon im Blut nach Auffüllung sämtlicher peripher Bereiche. Um zerebral-venöses Blut entnehmen zu können (gibt Aufschluss über die Aufnahme und Sättigung von Xenon im Gehirn), wurde ein Katheter ins Gehirn (genauer: in den Sinus sagittalis) gelegt.

4.5 Durchführung der *In-vitro*-Studie mit „Kern-Schale-Nanopartikeln“

Diese Studie wurde von Frau Silja Leyke am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der medizinischen Universität Berlin (Charité) durchgeführt. Im folgenden soll nur das Grundprinzip der *In-vitro*-Untersuchungen erläutert werden. Für eine ausführliche Darstellung der Methoden (insbesondere der FACS-Analyse) sei auf die Dissertation von Frau Leyke (2005) verwiesen.

Das *In-vitro*-Modell bestand aus einer Zellpopulation von Makrophagen der Maus (J 774-A1, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

Braunschweig), die mit *T. gondii GFP* (exprimiert ein grün fluoreszierendes Protein, Zentrum für Molekulare Biologie, Heidelberg) infiziert wurden.

Die Anzahl der (infizierten) Zellen bzw. der extrazellulären Parasiten wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) bestimmt. Die FACS-Analyse ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (v. a. Zellen) in einem Flüssigkeitsstrom (Adams et al., 1997). Mittels einer Trägerflüssigkeit werden die Zellen einzeln wie an einer Perlenkette durch den Messbereich geleitet, welcher aus einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge besteht. Die Proben werden so zur Emittierung von Fluoreszenzlicht angeregt, welches mittels eines Photodetektors registriert wird. Zusätzlich werden durch die Lichtstreuung Informationen über die Zellgröße gewonnen. So können gleichzeitig die Parasiten- (über die Fluoreszenz) und die Zellzahl (indirekt über die Lichtstreuung) ermittelt werden.

Die infizierten Zellen wurden mit den beschriebenen MC81cs-Partikeln behandelt und 3 Tage lang im Brutschank inkubiert. Jeden Tag wurde eine Probe gezogen und mit einem Durchflusszytometer der Firma BD Bioscience (Heidelberg) vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels CellQuest[®] Software (BD Bioscience) ausgewertet.

