

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretischer Hintergrund	4
2.1 Nanopartikel	4
2.1.1 Definition und Geschichte.....	4
2.1.2 Einsatzmöglichkeiten der Nanopartikel	4
2.1.3 Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikel.....	5
2.1.4 Emulsionspolymerisation	5
2.1.4.1 Anionische Emulsionspolymerisation.....	7
2.1.4.2 Radikalische Emulsionspolymerisation	8
2.1.5 Kern-Schale-Nanopartikel.....	10
2.1.6 Beladungs- und Freisetzungseigenschaften von Nanopartikeln.....	11
2.1.6.1 Beladungseigenschaften	11
2.1.6.2 Freisetzungseigenschaften	12
2.1.7 Degradation von Nanopartikeln	12
2.1.8 Toxizität von Nanopartikeln.....	15
2.1.8.1 Untersuchung an Tieren	16
2.1.8.2 Untersuchung an Zellkulturen.....	16
2.1.9 Drug Targeting	17
2.1.9.1 Körperverteilung nach intravenöser Applikation.....	17
2.1.9.2 Beeinflussung der Körperverteilung	18
2.2. Das Retikuloendotheliale System (RES)	20
2.2.1 Makrophagen.....	20
2.3. Toxoplasmose	22
2.3.1 Biologie von <i>Toxoplasma gondii</i>	22
2.3.2 Der Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i>	23
2.3.3 Morphologie von <i>Toxoplasma gondii</i>	26
2.3.4 Invasion von Wirtszellen und Entstehung der parasitophoren Vakuole	27

Inhaltsverzeichnis

2.3.5 Asexuelle Vermehrung und Austritt aus der parasitophoren Vakuole.....	29
2.3.6 Immunabwehr gegen <i>Toxoplasma gondii</i>	29
2.3.6.1 Wie Toxoplasmen in Wirtszellen überleben	30
2.3.7 Green Fluorescence Protein (GFP)	31
2.3.8 Infektionsquellen für den Menschen	32
2.3.9 Das Krankheitsbild Toxoplasmose.....	34
2.3.9.1 Postnatale Toxoplasmose	34
2.3.9.2 Pränatale Toxoplasmose.....	35
2.3.10 Therapie der Toxoplasmose	36
2.3.10.1 Substanzen der Toxoplasmose-Therapie.....	37
2.3.10.1.1 Standard-Therapie bei Toxoplasmose	37
2.3.10.1.1.1 Pyrimethamin	37
2.3.10.1.1.2 Sulfadiazin.....	38
2.3.10.1.1.3 Folinsäure	39
2.3.10.1.2 Spiramycin	39
2.3.10.1.3 Clindamycin	40
2.3.10.1.4 Atovaquon	41
2.3.10.1.5 Azithromycin.....	42
2.3.10.1.6 Kortikosteroide.....	42
2.3.10.1.7 Entwicklung neuer Therapeutika.....	42
2.3.10.2 Derzeitige Behandlungsstrategien.....	43
2.3.10.2.1 Therapie bei postnatal erworbener Toxoplasmose.....	43
2.3.10.2.2 Therapie während der Schwangerschaft	44
2.3.10.2.3 Therapie der konnatalen Infektion	44
2.3.10.2.4 Therapie der HIV-assoziierten Toxoplasmose.....	45
3 Material	47
3.1 Arzneistoffe	47
3.1.1 Spiramycin	47
3.1.2. Pentamidin.....	49
3.2. Hilfsstoffe und Fluoreszenzmarker	51
3.2.1 Poloxamer 188.....	51

Inhaltsverzeichnis

3.2.2 Dextran 70.000	52
3.2.3 Rhodamin B.....	52
3.3 Weitere Materialien und Geräte zur Herstellung der Nanopartikel.....	53
3.4. Toxoplasmenstamm	54
3.5 Zelllinie.....	54
3.6 Zellkulturmedium für die Kultivierung der Zellen und Toxoplasmen.....	54
3.7 Weitere Materialien für die Zellkulturversuche	54
4 Methoden.....	55
4.1 Herstellungsverfahren	55
4.1.1 Herstellung der Kern-Schale-Nanopartikel	55
4.1.1.1 Herstellung der Polystyren-Kerne	55
4.1.1.2 Umhüllung der Kerne mit Polybutylcyanoacrylat	56
4.1.2 Herstellung der Referenz-Kern-Schale-Nanopartikel	56
4.1.2.1 Polystyren-Kerne mit einer Polymethylmethacrylat-Schale	56
4.1.2.2. Polystyren-Kerne mit einer Polystyren-Schale	57
4.1.3 Herstellung reiner PBCA-Partikel.....	58
4.2 Charakterisierung der Nanopartikel.....	59
4.2.1 Partikelgrößenmessung mittels dynamischer Lichtstreuung.....	59
4.2.2 Partikelladungsbestimmung mittels Zetapotential-Messung	60
4.2.3 Oberflächenhydrophobie von Nanopartikeln	63
4.2.4 Bestimmung der Oberflächenladungsdichte	64
4.2.5 Degradation der Nanopartikel	65
4.2.5.1 Spektralphotometrische Untersuchung des enzymatischen Abbaues	65
4.2.5.2 Alkalische Hydrolyse	66
4.2.6 Wirkstoff-Gehaltsbestimmung	67
4.2.6.1 HPLC-Analytik	67
4.2.6.1.1 Pentamidin.....	67
4.2.6.1.2 Spiramycin	67

Inhaltsverzeichnis

4.2.7	Absättigung der Nanopartikel mit Proteinen.....	68
4.2.7.1	Absättigung mit Antikörpern	68
4.2.7.2	Absättigung mit Rinderserumalbumin	68
4.2.7.3	Absättigungsrate mit Proteinen	68
4.2.8	Zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE).....	68
4.2.8.1	Erste Dimension: isoelektrische Fokussierung	69
4.2.8.2	Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese	69
4.2.8.3	Auswertung von zweidimensionalen Gelen	70
4.3	Mikrobiologische Methoden.....	71
4.3.1	Durchflußzytometrie	71
4.3.1.1	Probenvorbereitung und Messung der Zellen im Durchflußzytometer.....	74
4.3.1.1.1	Perfect Counting Beads	74
4.3.1.1.2	Lebend-Tod-Farbstoff	75
4.3.2	Mikroskopie und Fotografie.....	75
4.3.5	Statistik.....	76
5.	Ergebnisse und Diskussion	77
5.1	Kern-Schale-Nanopartikel.....	77
5.1.1	Herstellung und Partikelgröße.....	77
5.1.1.1	Polystyren-Kerne.....	77
5.1.1.2	Umhüllung der Kerne.....	79
5.1.1.3	Reine PBCA-Nanopartikel.....	81
5.1.2	Partikelladung.....	82
5.1.2.1	Einzelmessungen.....	82
5.1.2.2	Titrationen	86
5.1.2.2.1	pH-Titrationen	86
5.1.2.2.2	Salztitrationen.....	95
5.1.3	Degradation der Nanopartikel	102
5.1.3.1	Enzymatischer Abbau	102
5.1.3.2	Hydrolytischer Abbau	106
5.1.4	Bestimmung des Wirkstoffgehalts	108
5.1.5	Oberflächenhydrophobie.....	110

Inhaltsverzeichnis

5.1.6 Oberflächenladungsdichte	115
5.1.7 Absättigung der Nanopartikel mit Proteinen.....	116
5.1.7.1 Absättigung mit Proteinen.....	117
5.1.7.2 Zetapotential der abgesättigten Nanopartikel.....	118
5.2 Entwicklung des <i>in-vitro</i> Modells.....	120
5.2.1 Auswahl der geeigneten Nanopartikel	121
5.2.2 Auswahl der geeigneten Nanopartikel- und Parasitenkonzentrationen.....	124
5.2.3 Auswertung mit Hilfe der Durchflusszytometrie	128
5.3 Anwendung des <i>in-vitro</i> Modells	133
5.3.1 Wirkung von Nanopartikeln ohne Wirkstoff	133
5.3.2 Auswirkung von Nanopartikeln mit Arzneistoff.....	136
5.3.2.1 Pentamidin.....	136
5.3.2.2 Spiramycin	140
5.3.2.3 Fazit.....	143
5.3.3 Veränderung der Reihenfolge von Infektion und Behandlung	144
5.3.4 Überprüfung der Referenzpartikel in der Zellkultur	146
5.3.4.1 Pentamidin.....	146
5.3.4.2 Spiramycin	150
5.3.4.3 Fazit.....	153
5.3.4.4 Reine PBCA-Partikel als Referenzpartikel	154
5.3.5 Absättigung der Nanopartikel mit Proteinen.....	155
5.3.5.1 Pentamidin.....	156
5.3.5.2 Spiramycin	160
5.3.5.3 Fazit.....	163
5.4. Plasmaproteinadsorption auf Kern-Schale-Nanopartikeln	164
5.4.1 Adsorptionsmuster nach Inkubation in fetalem Kälberserum (FKS).....	165
5.4.1.2 Fazit.....	167
5.5 Weiterführende Diskussion	168
6. Zusammenfassung	171

Inhaltsverzeichnis

7. Summary	175
8. Anhang	179
9 Abkürzungsverzeichnis.....	187
10. Literaturverzeichnis.....	188
Publikationsliste.....	202
Danksagungen.....	203
Lebenslauf	205