

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Nanopartikel

2.1.1 Definition und Geschichte

Nanopartikel sind feste Kolloide im Durchmesserbereich zwischen 10 und 1000 nm. Sie bestehen aus makromolekularen Materialien. In ihre(r) Polymermatrix können Arzneistoffe eingeschlossen, eingekapselt, gelöst, kovalent gebunden oder an ihrer Oberfläche adsorbiert werden (Kreuter, 1983).

Nanopartikel als Arzneistoffträger wurden erstmals 1976 von Birrenbach und Speiser hergestellt (Birrenbach und Speiser, 1976). Diese Partikel bestanden aus Polyacrylamid. Der erste Wirkstoff, mit dem Nanopartikel beladen wurden, war 1977 das Norephedrin (Kopf et al., 1977). Es folgten auch Versuche mit anderen Monomeren, die 1976 zur Herstellung von Partikeln aus Polyalkylmethacrylaten führten (Kreuter und Speiser, 1976). Couvreur ließ im Jahre 1982 eine Methode zur Herstellung von Nanosphären aus Polycyanoacrylat patentieren (Couvreur et al., 1982).

2.1.2 Einsatzmöglichkeiten der Nanopartikel

Nanopartikel besitzen vielfältige Einsatzmöglichkeiten. Beispiele für ihre Anwendbarkeit und die Effektivität im Einsatz stellte Brannon-Peppas 1995 in einer Übersicht dar. Einen Review dieser Möglichkeiten veröffentlichte Kreuter (Kreuter, 1994a). Eine Auswahl wird im Folgenden aufgeführt:

- Arzneistoffträger für Chemotherapeutika (Brasseur et al., 1980, Couvreur et al., 1982, Brigger et al., 2002, Brannon-Peppas et al., 2004)
- Diagnostikum (Päuser et al., 1997, Weitschies et al., 1997)
- Depotform (Grislain et al., 1983)
- Proteinträger (Müller, 2001, Lehr und Gabor, 2004)
- Träger von Adjuvantien (Kreuter, 1994)
- Arzneistoffträger bei peroraler Anwendung (Maincent et al., 1986)

2 Theoretischer Hintergrund

- Arzneistoffträger für Ophtalmika (Diepold et al., 1989)
- Arzneistoffträger bei topischer Anwendung (Wissing, 2003, Saupe, 2004)
- Hilfsstoff zur Überwindung von Arzneimittelerresistenzen (Bennis et al., 1994, Vauthier et al., 2003)
- Behandlung von intrazellulären und systemischen Infektionen (Balland et al., 1994, Durand et al., 1997, Sordet, 1999)
- Markierung von Zellen (Härtig et al., 1992)

2.1.3 Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikel

Alkylcyanoacrylate sind hochreaktive Monomere, die in Gegenwart von OH⁻-Ionen oder anderen Nucleophilen schon an der Luft spontan polymerisieren. Die Synthese von Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikeln erfolgt im wässrigen Milieu, da bei einer Herstellung in organischer Phase an den Partikeln entsprechende Lösungsmittelreste verbleiben können. Alkylcyanoacrylate wurden intensiv untersucht. Sie werden zu den biodegradierbaren, also abbaubaren, Polymeren gezählt und zeigen frei von Restmonomer eine geringe Toxizität. In der Chirurgie werden sie als Gewebekleber eingesetzt.

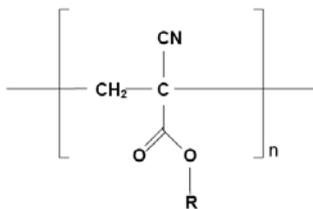


Abb. 2-1 Polybutylcyanoacrylat (PBCA), R = C₄H₉

2.1.4 Emulsionspolymerisation

Das grundlegende Herstellungsverfahren für polymere Nanopartikel ist die Emulsionspolymerisation. Für den Reaktionsmechanismus der Emulsionsreaktion gibt es zwei Theorien, wobei die Vorstellungen von Fitch (Fitch, 1973) die klassische Harkins-Smith-Ewart-Theorie abwandeln.

Nach der Harkins-Smith-Ewart-Theorie befinden sich die Monomermoleküle in ca. 1 µm großen Tröpfchen und in ca. 5 nm großen Emulgatormizellen. Die Polymerisation kann, je nach Ausgangsmonomer, durch unterschiedliche Initiatoren in Gang gesetzt werden (Birrenbach

2 Theoretischer Hintergrund

und Speiser, 1976, Kreuter, 1983). So können Ionen (siehe 2.1.4.1) und Radikale (siehe 2.1.4.2) sowie auch energiereiche Strahlung als Starter dienen. Die Starter dringen in die Mizellen ein und initiieren dort die Polymerisation. Monomermoleküle, die frei in der wässrigen Phase diffundieren, werden durch Mizellen, die wachsende Polymerketten enthalten, absorbiert. Die Monomere stammen sowohl aus anderen Mizellen, sowie besonders aus den als Reservoir dienenden Monomertröpfchen. Mit zunehmender Polymerisationsdauer werden die Monomertröpfchen aufgebraucht. Die wachsenden Partikel adsorbieren Emulgatormoleküle aus den kleiner werdenden Monomertröpfchen und aus Mizellen, in denen keine Polymerisation stattgefunden hat, und die daher nun selbst als Monomerreservoir dienen. Die rasch wachsende Oberfläche der polymerisierenden Partikel adsorbiert immer mehr Tensidmoleküle aus dem umgebenden Medium. Neugebildete Teilchen konkurrieren mit den wachsenden um die vorhandenen Emulgatormoleküle und bestimmen somit die Anzahl der Partikel pro Volumeneinheit. Ist das gesamte mizellare Tensid aufgebraucht, so ist, nach der Harkin-Smith-Ewart-Theorie, die Bildung der Partikel abgeschlossen. Ab diesem Zeitpunkt bleibt die Anzahl der Teilchen konstant.

Gegen die klassische Harkins-Smith-Ewart-Theorie spricht, dass die Emulsionspolymerisation auch ohne die Zugabe eines Emulgators durchgeführt werden kann. Daran knüpft die Theorie von Fitch an, die besagt, dass die Polymerisation in der wässrigen (äußeren) Phase initiiert wird und nicht in den Tensidmizellen (Abb. 2-2): Die initial gebildeten Monomertröpfchen dienen auch bei dieser Theorie wieder als Reservoir für Monomermoleküle (Fitch et al., 1969, 1973). Aus diesen diffundieren sie in die wässrige Phase, in der die Polymerisation durch einen Starter initiiert wird. Durch Reaktion mit weiteren Monomermolekülen setzt sich die Kettenreaktion fort, und es bilden sich Oligomer- und Polymerketten. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Wasserlöslichkeit dieser Makromoleküle immer mehr ab, und die Ketten beginnen sich zu Primärpartikeln zu verknäulen. In diesen Primärpartikeln kann die Polymerisation bis zum vollständigen Monomerumsatz weiterlaufen. Die fertigen Nanopartikel bestehen oft aus mehreren Primärteilchen, die während des Prozesses koaleszierten.

Bei dieser Theorie wird die Anzahl der Partikel nicht nur durch die Anzahl der anwesenden Mizellen, sondern auch durch die Anzahl der gebildeten Polymerisationskeime bestimmt. Die Anzahl der Polymerisationskeime hängt dabei von der Konzentration des Starters ab. Höhere Starterkonzentrationen führen bei konstanten Monomerkonzentrationen zu einer erhöhten Anzahl von Nanopartikeln mit kleinerem Molekulargewicht. Eine höhere Monomerkonzentration hat keinen Einfluß auf die Partikelanzahl, sondern führt zu einem höheren Molekularge-

2 Theoretischer Hintergrund

wicht der sich bildenden Nanopartikel, was meist mit einem größeren Partikeldurchmesser korreliert.

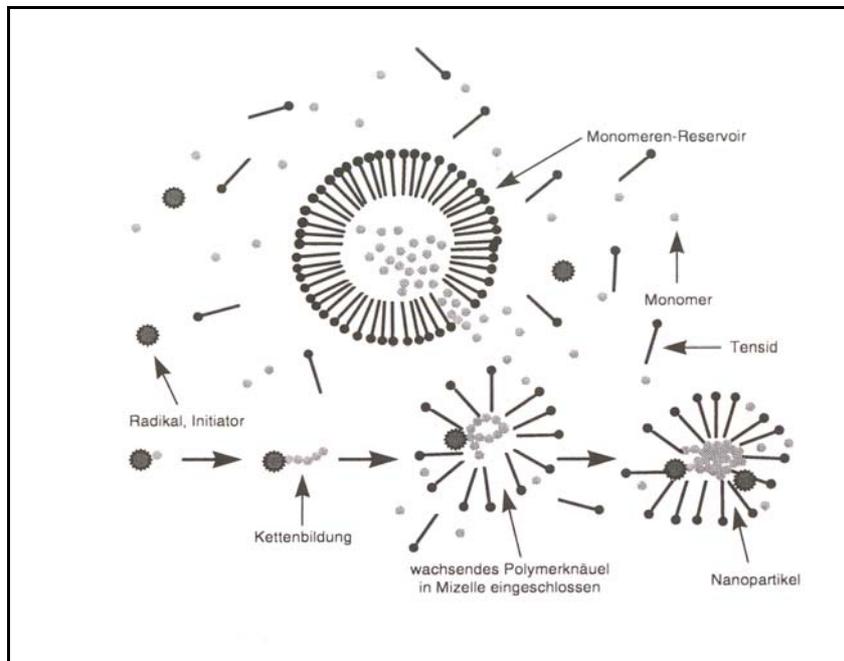


Abb. 2-2 Emulsionspolymerisation nach Fitch

2.1.4.1 Anionische Emulsionspolymerisation

Die Herstellung von Polyalkylcyanoacrylat (PBCA)-Nanopartikeln erfolgt über eine anionische Emulsionspolymerisation. Die Reaktion startet durch den nucleophilen Angriff von z.B. OH^- -Ionen auf das β -C-Atom des Monomers. In rein wässrigem Medium liegen OH^- -Ionen aufgrund der Autoprotolyse des Wassers vor. Sie starten die Reaktion. Um eine zu hohe Konzentration an Hydroxidionen zu vermeiden, die zu einer schnellen unkontrollierten Polymerisation mit großen Partikeldurchmesser führen würde, muss ein pH-Wert eingestellt werden, der im sauren Bereich, bei etwa 2 (<3), liegt (Douglas, 1984). Das durch den nucleophilen Angriff entstehende mesomeriestabilisierte Carbanion kann nun seinerseits als Nucleophil ein weiteres Monomermolekül angreifen. Der Kettenabbruch erfolgt durch Reaktion mit einem Proton, das ebenfalls durch die Autoprotolyse des Wassers entsteht und somit als Inhibitor der Reaktion agiert.

2 Theoretischer Hintergrund

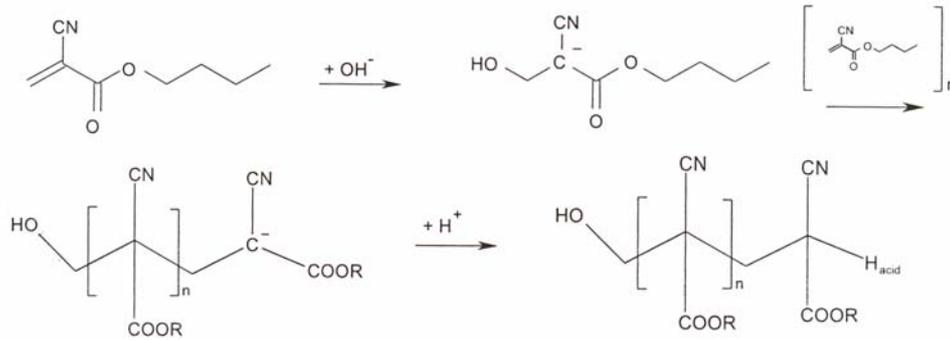


Abb. 2-3 Mechanismus der Alkylcyanoacrylat-Polymerisation, R = Methyl, Ethyl, Butyl etc.

Der Einfluß von Temperatur, pH-Wert, Monomerkonzentration und die Art und Konzentration der Stabilisatoren auf den Polymerisationsverlauf ist im Gegensatz zu den Alkylmethacrylaten sehr komplex. Ein weiterer Faktor, der die Partikelgröße beeinflussen kann, ist die Rührgeschwindigkeit. Durch zunehmende Rührgeschwindigkeit wird immer mehr kinetische Energie in das System eingebracht, die dazu führen kann, dass die Grenzflächenspannung zwischen den Partikeln überwunden wird, was zu einer Koaleszenz führt (Kreuter, 1994). Douglas untersuchte den Einfluß der Art und der Konzentration von zugesetzten Stabilisatoren auf den resultierenden Partikeldurchmesser (Douglas, 1985). Er konnte zeigen, dass Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel durch Variation des Stabilisators reproduzierbar in einem Größenbereich von 100 bis 700 nm hergestellt werden können. Aus der Polymerisation von Alkylcyanoacrylaten resultieren ungeladene, zur Koagulation neigende Kolloidteilchen. Um ihren effektiven Einsatz und eine ausreichende Lagerstabilität zu sichern, nutzt man sterische Stabilisatoren. Ihre Auswahl wird durch die Toxizitätsanforderungen und ihre Grenzflächenaktivität bestimmt. Verbindungen aus der Klasse der amphiphilen Blockcopolymere, wie das in dieser Arbeit verwendete Poloxamer 188, gehören zu den effektivsten sterischen Stabilisatoren, da sie neben hydrophoben Molekülteilen, die eine hohe Affinität zu der Partikeloberfläche besitzen, auch stabilisierende Molekülregionen besitzen, die im Dispersionsmedium solvatisiert sind.

2.1.4.2 Radikalische Emulsionspolymerisation

Neben PBCA-Nanopartikeln, die mit der anionischen Emulsionspolymerisation hergestellt werden, wurde in dieser Arbeit auch mit Polymethylmethacrylat (PMMA)- und Polystyren-

2 Theoretischer Hintergrund

(PS)- Nanopartikeln gearbeitet, die vorzugsweise nach dem Reaktionsmechanismus der radikalischen Emulsionspolymerisation synthetisiert werden.

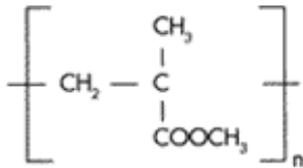


Abb. 2-4 Strukturformel von Polymethylmethacrylat (PMMA)

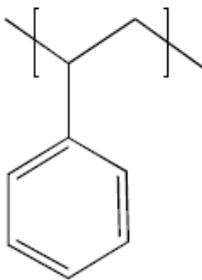


Abb. 2-5 Strukturformel von Polystyren (PS)

Radikalische Polymerisationen werden durch freie Radikale oder durch γ -Strahlen ausgelöst und über wachsende Makroradikale fortgepflanzt. Als Radikalstarter wurde in dieser Arbeit Kaliumperoxidisulfat, das oberhalb von 45°C thermisch zerfällt, verwendet. Es enthält eine homolytisch leicht spaltbare O-O-Bindung. Die Reaktionsprodukte sind Sulfatanion-Radikale. Dieser Zerfallsschritt stellt die Initiierungsreaktion dar:

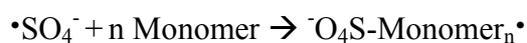


Die Startreaktion besteht in der Anlagerung des Initiatorradikals an ein Monermolekül unter Bildung eines Monomerradikals. Die Geschwindigkeit der Startreaktion wird durch den Verbrauch an Initiatorradikalen und die Bildung von Monomerradikalen bestimmt. Peroxide können durch Reaktion mit Sauerstoff, der selbst ein Biradikal darstellt, reaktive Aldehyde bilden, die dann den Polymerisationsprozeß beschleunigen (Elias, 1981). Der dadurch entstehenden, unkontrollierten Polymerisation wird durch Synthese unter Sauerstoffausschluss entgegengewirkt. Der Startreaktion folgt die Kettenfortpflanzungsreaktion (Propagation), die

2 Theoretischer Hintergrund

gekennzeichnet ist durch die Reaktion der wachsenden Makroradikale mit weiteren Monomermolekülen. Die radikalische Polymerisation wird durch eine Kettenabbruchreaktion beendet. Dabei kann der Kettenabbruch durch die Kombination zweier Makroradikale, Disproportionierung durch Übertragung von Wasserstoffatomen oder durch die Reaktion eines Makroradikals mit einem Initiatorradikal erfolgen. Wie auch bei der anionischen Polymerisation nimmt die Wasserlöslichkeit mit zunehmender Kettenlänge ab und die Ketten beginnen, sich zu Primärpartikeln zu verknäulen.

Im Gegensatz zu Polyalkylcyanoacrylaten, die durch anionische Polymerisation hergestellt werden, werden mittels radikalischer Polymerisation hergestellte Nanopartikel u.a. durch inkorporierte Initiatorfragmente stabilisiert. Sie bilden die meist geladenen Endgruppen der Polymerketten und finden sich konzentriert an der Grenzfläche zum Wasser wieder. Die Koagulation der Nanopartikel wird so durch elektrostatische Abstoßungskräfte verhindert (Fitch, 1973, Kreuter, 1983). Die geladenen, hydrophilen Endgruppen der meist hydrophoben Polymerketten, die aus dem Zerfall des Radikalbildners stammen, sind chemisch-kovalent mit den Polymerelementen verbunden und können in vielen Fällen auch durch Hydrolyse nicht wieder entfernt werden (Fitch et al., 1969):



2.1.5 Kern-Schale-Nanopartikel

Kern-Schale-Nanopartikeln sind Partikel, die aus einem Polymerkern und einer umgebenden Polymerschale bestehen. Zur Darstellung von Kern-Schale-Nanopartikeln hat sich die Synthesemethode der Saat-Emulsionspolymerisation sehr bewährt. Sie bietet den Vorteil, zunächst die Kerndispersion ohne aufpolymerisierte Schale untersuchen zu können (Dingenouts et al. 1998). Dafür wurde in dieser Arbeit zunächst die PS-Kerndispersion mittels einer herkömmlichen radikalischen Emulsionspolymerisation von Styren in Wasser hergestellt (siehe 2.1.4.2). Als Initiator wurde Kaliumperoxidisulfat (KPS) verwendet, was zu chemisch gebundenen, anionischen Ladungen auf der Teilchenoberfläche führte. Als Emulgator wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt. Vor der weiteren Verwendung der Kerndispersion wurde sie ausgiebig mittels Dialyse gegen entionisiertes Wasser gereinigt. Auf diesem Wege war es möglich, den Emulgator SDS nahezu vollständig zu entfernen, so dass elektrostatische die Stabilisierung der PS-Teilchen nur auf den Ladungen der eingebauten Initiatorbruchstücke beruhte. Im zweiten Schritt der Synthese erfolgte das Aufpolymerisieren der Schale (PBCA, PMMA bzw. PS) auf die PS-Kerne. Dazu wurden im Falle der PBCA-Schale eine anionische Polyme-

2 Theoretischer Hintergrund

risation und im Falle der PMMA- und PS-Hülle eine radikalische Polymerisation durchgeführt.

Folgender Mechanismus liegt der Schalenbildung zugrunde: Die Reaktion startet in der wässrigen Phase, in der sowohl der Initiator (KPS, OH^-) als auch das Monomer gelöst bzw. verteilt vorliegen. Ab einem kritischen Polymerisationsgrad werden die wachsenden Oligomere des künftigen Schalenmaterials wasserunlöslich. Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Oligomerketten und den Kernteilchen kommt es zu einer Adsorption der Ketten an der Kernoberfläche. Gemäß der Hydrophobie-/Hydrophilie-Abfolge-Regel bleibt die entstehende Schale auch Schale, wenn sie hydrophiler als der Kern ist. Sonst erfolgt bei Polymerisationen in Wasser oft eine Inversion der Kern-Schale-Systeme.

2.1.6 Beladungs- und Freisetzungskarakteristik von Nanopartikeln

2.1.6.1 Beladungscharakteristik

Zur Beladung von Nanopartikeln mit Arzneistoffen oder anderen biologisch aktiven Substanzen können zwei unterschiedliche Methoden angewendet werden:

Bei der direkten (inkorporativen) Beladung wird der Arzneistoff vor oder während der Partikelherstellung im Polymerisationsmedium gelöst (Couvreux et al., 1980, 1982). Während der Polymerisation wird er dann in das poröse Partikelgerüst inkorporiert und zum Teil an der Oberfläche adsorbiert. Voraussetzung für diese direkte Beladung ist, dass der Arzneistoff die erforderlichen Reaktionsbedingungen übersteht und selbst nicht mit dem Polymer reagiert. Das Ausmaß der Beladung hängt vor allem von der Hydrophilie/Lipophilie des Arzneistoffs ab.

Beispiele für eine erfolgreiche inkorporierte Beladung von PBCA-Nanopartikeln sind unter anderem Loperamid (Alyautdin et al., 1997) oder Doxorubicin (Gulyaev et al., 1999).

Bei der indirekten (adsorptiven) Beladung wird der Arzneistoff erst nach der Herstellung der Nanopartikel zu der Partikelsuspension gegeben. (Douglas et al., 1986). Nach einiger Zeit stellt sich ein Arzneistoff-Gleichgewicht zwischen Lösung und Partikeloberfläche ein. Der Arzneistoff wird ausschließlich durch physikalische Wechselwirkungen, vor allem Wasserstoff-Brücken, an der Partikeloberfläche gebunden. Auf diese Weise können Arzneistoffe an Nanopartikel angelagert werden, die die Polymerisation stören würden oder deren Stabilität durch den Angriff von Radikalen bzw. reaktiven Ionen beeinträchtigt werden würde. Einige

2 Theoretischer Hintergrund

Arzneistoffe vertragen auch deutlich von pH 7 abweichende Polymerisationsbedingungen nicht.

Beispiele für die adsorptive Beladung von Nanopartikeln sind die Beladung von Primaquin an PACA-Nanopartikel (Gaspar et al 1992), die von PMMA- Nanopartikeln mit Pentamidin (Durand et al., 1997) oder die Beladung von PBCA-Nanopartikeln mit Captopril (Scherer, 1992) oder Mitoxantron (Reszka et al., 1997).

2.1.6.2 Freisetzungskarakteristik

Je nach Bindung des Arzneistoffes an die Nanopartikel erfolgt die entsprechende Freisetzung. An der Partikeloberfläche adsorbierte Arzneistoffe werden durch Desorption freigesetzt, während in der Polymermatrix molekulardispers verteilter Arzneistoff durch Diffusion aus der Polymermatrix an die Grenzschicht wieder ins umgebende Medium gelangt. Bei Arzneistoffen, die kovalent gebunden sind, erfolgt die Freisetzung in der Regel während des Polymerabbaus (Wallis und Müller, 1989). Eine Alternative stellt die Hydrolyse bzw. enzymatische Spaltung oberflächenständiger Bindungen zum Wirkstoff dar.

Die Kinetik der Freisetzung ist, vor allem bei degradierbaren Nanopartikeln, häufig sehr komplex, da sich Desorption, Diffusion aus der Polymermatrix und Degradation des Polymers überlagern.

Die bisher gewonnenen Freisetzungsdaten zeigen vielfach einen zweiphasigen Verlauf (Illum et al. 1986): Die Initialphase (α -Phase) ist charakterisiert durch eine schnelle Freisetzung des an der Oberfläche adsorbierten Arzneistoffes (burst release). Die anschließende wesentlich langsamere Freisetzung des inkorporierten Arzneistoffes wird als die β -Phase bezeichnet. Bisher liegt noch kein mathematisches Modell vor, das die *in-vitro* Kinetik der Wirkstofffreisetzung allgemeingültig beschreibt.

2.1.7 Degradation von Nanopartikeln

Der Begriff der Degradation umfasst die komplexen Abbauvorgänge der Matrix polymerer Träger. Die Anforderungen, die an Nanopartikel als kolloidale Arzneistoffträger in Hinblick auf die Degradation gestellt werden, sind folgende:

- sie sollen der Degradation im Körper so lange widerstehen, bis der Wirkstoff am Zielort angekommen ist und ihn dann erst freigeben, damit er seine therapeutische Wirkung entfalten kann

2 Theoretischer Hintergrund

- sie sollen nach der Erfüllung ihrer Aufgabe als Wirkstoff-Carrier rasch zu untoxischen Produkten abgebaut und eliminiert werden.

Zu den nicht abbaubaren (nicht biodegradierbaren) Kunststoffmaterialien gehört zum Beispiel Polystyren oder Polyacrylamid, das in kolloidaler Form nur für Impfstoffe oder Entwicklungsexperimente eingesetzt wird (Kreuter, 1988). Sie blockieren als Nanopartikel das retikuloendothetiale System (RES), in dem sie bei einer intravenösen Gabe in einer großen Menge die phagozytierenden Zellen übersättigen. Diese Zellen sind damit praktisch nicht mehr fähig, Krankheitserreger zu vernichten. Dadurch wird der Schutzmechanismus und somit die ganze körpereigene Abwehr stark beeinträchtigt.

Polymethylmethacrylat (PMMA)- Nanopartikel sind zwar biodegradierbar, allerdings nur mit einer sehr geringen Abbaugeschwindigkeit (Kreuter et al., 1983b). Sie werden nach einer subkutanen Applikation erst nach 160 Tagen signifikant ausgeschieden und eignen sich deshalb für den Einsatz als Adjuvans bei Impfstoffen. Als Arzneistoffträger für eine orale oder parenterale Applikation sind sie aufgrund ihrer nur geringen Abbaurate nicht geeignet (Kreuter und Speiser, 1976).

Polybutylcyanoacrylat (PBCA)- Nanopartikel, die in dieser Arbeit zum Einsatz kommen, sind wie auch andere abbaubare Nanopartikel (z.B. Albumin-Partikel, Polylactide), für eine orale und auch parenterale Applikation geeignet.

Die Biodegradation von Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikeln ist auf zwei Wegen möglich:

- Weg 1: Alkalische Hydrolyse der Esterbindung unter Bildung wasserlöslicher Polycyanocarbonsäure (Lenaerts et al, 1984).
- Weg 2: Reverse Knoevenagel-Reaktion: Zerstörung der Polymerkette unter Bildung von Formaldehyd und Alkylcyanoacrylat (Vezin und Florence, 1980). Der entstehende Formaldehyd wurde für die in Zellkulturen beobachtete Zytotoxizität verantwortlich gemacht.

2 Theoretischer Hintergrund

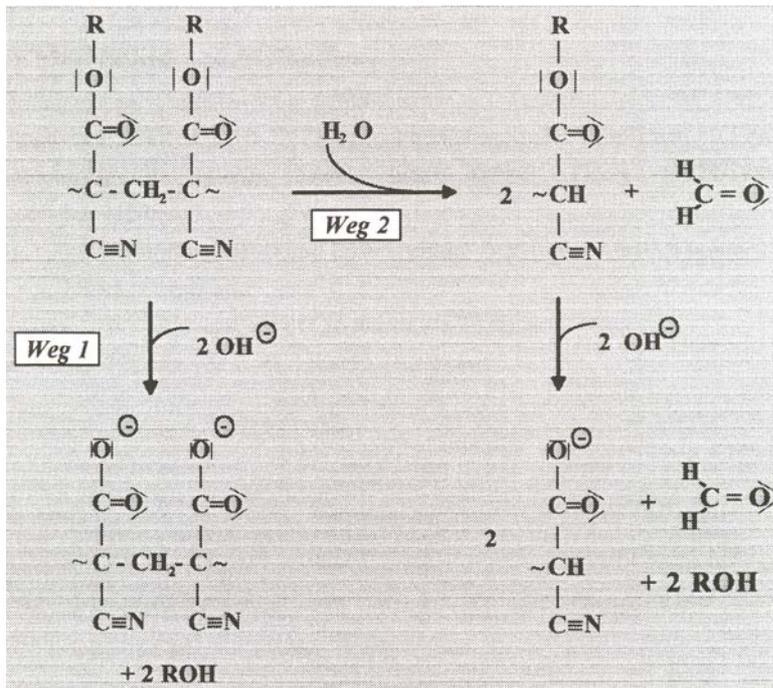


Abb. 2-6 Abbau von Poly(alkylcyanoacrylat) nach Lenaerts

Verlauf und Resultat der alkalischen Hydrolyse sind sowohl vom pH-Wert als auch von den Oberflächeneigenschaften der Partikel abhängig (Veziin und Florence, 1980). In der Startphase dominiert die Oberflächenerosion (Lherm et al., 1989).

Da der Weg 1 bedeutend schneller abläuft als der Weg 2 und noch durch Esterase beschleunigt wird, stellt er den Hauptabbauweg unter physiologischen Bedingungen dar. Für diese Hypothese spricht, dass bei *in-vitro*-Experimenten zur Polymerdegradation das Molekulargewicht des Polymers praktisch gleich bleibt und parallel zum Abbau die Bildung des Alkohols aus den Alkylresten läuft. Im Gegensatz zum 2. Weg, bei dem die Polymerkette zerstört wird, bleibt sie beim Hauptabbauweg intakt, wird aber durch die entstehenden Carboxylreste immer hydrophiler, bis sie schließlich wasserlöslich ist.

Der Abbau zu Formaldehyd (Weg 2) spielt *in-vivo* nur eine untergeordnete Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Formaldehyd zwar abgespalten wird aber zu einem großen Anteil wieder an das andere C-H azide Ende der Polymerkette bindet (siehe Abb. 2-7) (Bootz et al., 2005). Dies ist aus toxikologischer Sicht wichtig (Couvreur et al., 1984).

2 Theoretischer Hintergrund

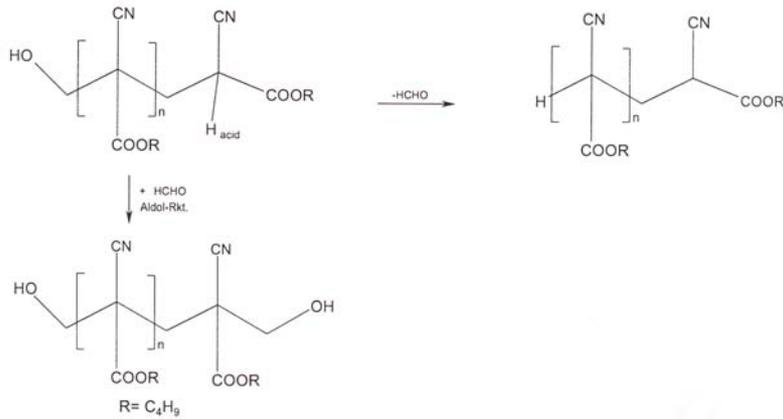


Abb. 2-7 Bildung der PBCA-Derivate. Abspaltung und Addition von Formaldehyd

Die Geschwindigkeit der Polymerdegradation ist abhängig von der Länge der Esterseitenkette (Müller et al., 1990, Müller, 1992). Ist bei inkorporativ beladenen Nanopartikeln die Abbaugeschwindigkeit des Polymers größer als die Diffusionsgeschwindigkeit des Arzneistoffes aus den Partikeln, so wird die Arzneistofffreisetzung durch die Degradationsgeschwindigkeit bestimmt (Henry-Michelland et al., 1987).

Nach i.v. Gabe von Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikeln wird das Polymer durch Esterasen schnell abgebaut und die sich dabei bildenden, hydrophilen Polycyanocarbonsäuren können nach Erreichen eines Molekulargewichts unter 5000 über die Niere ausgeschieden werden. Nanopartikel aus Polymethylmethacrylat sind zwar auch biodegradierbar, allerdings nur mit einer sehr langsamen Abbaugeschwindigkeit. Nach Erreichen eines bestimmten Molekulargewichts wird das PMMA biliär eliminiert. Das nichtabbaubare Polystyren kann nicht ausgeschieden werden und würde bei i.v. Gabe bei Partikeldurchmessern > 50 nm quantitativ im Körper verbleiben. Aus diesem Grund werden Polystyren-Nanopartikel nicht in *in-vivo* Studien eingesetzt, sondern nur in *in-vitro*-Untersuchungen als Modell- oder Referenzpartikel.

2.1.8 Toxizität von Nanopartikeln

Bei Arzneistoffträgern, wie zum Beispiel Polyalkylcyanoacrylat (PACA)-Nanopartikeln ist die Toxizität der unbeladenen Partikel genauso wichtig, wie die Frage, ob sich Arzneistoffe, die an Partikel gebunden sind, in ihrer Toxizität verändern. Studien über toxikologische Aspekte wurden in der Vergangenheit vielfach durchgeführt (Kante et al., 1982, Kreuter, 1983a, Couvreur et al., 1984, Douglas et al., 1985, Lherm et al., 1989, Müller, 1991a).

2 Theoretischer Hintergrund

Insgesamt wird die Zytotoxizität der heute verwendeten Partikelmaterialien *in-vitro* und *in-vivo* als gering eingestuft. Daher werden sie für den Einsatz am Menschen als geeignet angesehen (Kante et al., 1982).

Bei oraler Anwendung von PACA-Nanopartikeln ist die Belastung des Organismus durch (toxische) Abbauprodukte geringer als bei parenteraler Anwendung, weil nur ein geringer Teil der verabreichten Partikel absorbiert wird (Kayser et al., 1991).

2.1.8.1 Untersuchung an Tieren

Die akute Toxizität (LD_{50}) wird bei Ratten für Polybutylcyanoacrylat mit 230 mg / kg Körpergewicht und für Polyhexylcyanoacrylat mit 285 mg / kg Körpergewicht angegeben (Kreuter, 1983a).

2.1.8.2 Untersuchung an Zellkulturen

Eine Reihe von PACA-Partikeln wurde *in-vitro* an unterschiedlichen Zellkulturen getestet, zum Beispiel Fibroblasten (Gipps et al., 1987, Lherm et al., 1989), Hepatozyten (Kante et al., 1982) und Makrophagen (Kante et al., 1982).

Kante et al., (1982) zeigten, dass toxische Effekte an Hepatozyten auftraten, wenn auch erst in einer hohen Konzentration (2×10^4 Partikel pro Zelle). Kreuter (1983a) führte dies auf die Abbauprodukte und deren Akkumulation durch fehlenden Abtransport zurück.

Gipps et al. (1987) untersuchten verschiedene PACA-Nanopartikel an Fibroblasten-Zellkulturen. Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluß der Alkylseitenkette, der verwendeten Tenside und der Partikelkonzentration auf die Zellkultur zu untersuchen. Im Hinblick auf die Partikelkonzentration konnten sie zeigen, dass es eine direkte Proportionalität zwischen der Konzentration und den toxischen Effekten gibt. Unter einer Konzentration von 0,2% werden praktisch keine toxischen Effekte beobachtet. Ebenso konnten sie zeigen, dass auch Nanopartikel-freie Tensidlösungen toxische Effekte aufweisen. So liegt die LD_{50} von Poloxamer 188 bei $> 1\%$. Daraus lässt sich ableiten, dass der Einfluß der Tenside bei Toxizitätsuntersuchungen nicht vernachlässigt werden sollte.

Lherm et al. (1989) untersuchten an Fibroblastenkulturen verschiedene PACA-Nanopartikel, die mit Polysorbat 20 stabilisiert waren. Es zeigte sich, dass die Zytotoxizität mit steigender Alkylseitenkette abnimmt. Dieses wird damit erklärt, dass der Abbau langkettiger Alkylseitenketten langsamer abläuft und zusätzlich Alkohole mit zunehmender Kettenlänge untoxischer werden.

2 Theoretischer Hintergrund

Im Gegensatz zu den Ergebnissen an Fibroblasten-Zellkulturen konnte bei Versuchen an Makrophagen kein Zusammenhang zwischen Toxizität und Länge der Alkylseitenkette gezeigt werden (Cruz et al., 1997). In diesen Zellen spielt neben löslichen, toxischen Faktoren, die nach der Phagozytose der Partikel freigesetzt werden, die Assoziation von Nanopartikeln und Lipopolysacchariden und die dadurch ausgelöste Überproduktion toxischen Stickstoffmonoxids die entscheidende Rolle.

Bei Toxizitätsuntersuchungen muss allerdings beachtet werden, dass die Untersuchungen an Zellkulturen nur beschränkt aussagekräftig sind. Zellkulturen sind biologische Systeme, die sich nicht vollkommen standardisieren lassen und daher von Zellreihe zu Zellreihe andere Reaktionen auf Nanopartikel auftreten können. Zum anderen muss beachtet werden, dass Degradationsprodukte in den Zellen akkumulieren können.

2.1.9 Drug Targeting

Unter Drug Targeting versteht man die zielgerichtete Heranführung kolloidaler Arzneistoffträger oder anderer Arzneiformen an das entsprechende Zielgewebe.

Die Bindung an oder der Einschluss von Wirkstoffen in den Arzneistoffträger ermöglicht es, die Körperverteilung der aktiven Substanz zu verschieben. Das Ziel dieser Verschiebung ist es, den Wirkstoff möglichst nur am Wirkort und nicht in der Peripherie verfügbar zu machen, eine hohe Zellgängigkeit und kontrollierte Freigabe zu erreichen, die Blutzirkulationszeit zu verlängern und die Toxizität für den Organismus zu verringern. Damit kann erreicht werden, dass eine zielgerichtete Gabe von Medikamenten möglich ist, dass die Einnahmedosis verringert werden kann, sowie dass eine Verkürzung der Behandlungsdauer erfolgen kann.

So konnte zum Beispiel Couvreur et al. (1982) zeigen, dass die Toxizität des stark cardiotoxischen Zytostatikums Doxorubicin durch Bindung an Polyisobutylcyanoacrylat-Nanopartikel erheblich gesenkt werden konnte, während sich die Wirksamkeit aber nicht verminderte.

2.1.9.1 Körperverteilung nach intravenöser Applikation

Nach intravenöser Applikation kolloidaler Arzneistoffträger werden diese in den meisten Fällen vom Körper als fremd erkannt und durch Aufnahme in Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES, siehe 2.2) aus dem Blutstrom eliminiert. Dabei ist das Verteilungsmuster hauptsächlich von der Größe und den Oberflächeneigenschaften, wie Ladung und Oberflä-

2 Theoretischer Hintergrund

chenhydrophobizität, der Partikel abhängig. Die Partikel werden zu 60-90% in der Leber, 2-15% in der Milz und 3-10% in der Lunge aufgenommen (Müller, 1991). Ein geringer Anteil kann auch in das Knochenmark gelangen, allerdings müssen dazu die Partikel kleiner als 70 nm sein. Die Verteilung der Partikel im Lebergewebe erfolgt zu etwa 75% in den Kupfer'schen Sternzellen und etwa zu 25% in den Endothelzellen der Leber.

Arzneistoffe, die an kolloidale Träger gebunden sind, können somit gezielt in Geweben, die Partikel aufnehmen, transportiert werden.

2.1.9.2 Beeinflussung der Körperverteilung

Das retikuloendothetiale System des Körpers hat die Aufgabe, körpereigen entstandene Abbauprodukte sowie eingedrungene Fremdkörper zu entfernen. Um den Zellen das Erkennen körperfremder Bestandteile zu ermöglichen, werden diese durch eine so genannte Opsonisierung markiert (Müller und Heinemann, 1989). Unter Opsonisierung versteht man den Prozess der Proteinadsorption auf Partikeloberflächen in Verbindung mit der Erkennung von solchen Partikeln durch das körpereigene Immunsystem. Zu den Opsoninen gehören zum Beispiel Immunglobuline und Fibrinogen. Neben den Opsoninen gibt es auch Dysopsonine, die die Aufnahme durch das RES verhindern (wie Humanes Serum Albumin). Die Oberflächeneigenschaften und damit die Opsonisierung und Phagozytose der Partikel können beeinflusst werden, indem man vor der Injektion Stoffe an der Oberfläche adsorbieren lässt (Coating). Aufgrund ihrer hohen Oberflächenaktivität und der Vielzahl möglicher Varianten kommen hier vor allem Tenside zum Einsatz (Illum und Davis, 1987, Wallis und Müller, 1990, Müller, 1991, Müller und Wallis 1993). Durch Inkubation mit nichtionischen Tensiden wird die Anlagerung von Opsoninen an die Partikeloberfläche verhindert und infolge dessen die Verweildauer im Blut erhöht und so die Körperverteilung zum Teil erheblich beeinflusst (Illum und Davis, 1987, Müller, 1991, Tröster et al., 1992, Müller, 1992a).

Die von Müller und Heinemann (1989) aufgestellte Theorie der differenzierten Opsonisierung besagt, dass in Abhängigkeit der Oberflächeneigenschaften der Partikel unterschiedliche Opsonine angelagert werden können, die durch unterschiedliche Makrophagen-Subpopulationen erkannt werden.

Illum (Illum et al. 1987a) gelang es erstmalig, Polystyrenpartikel durch Coating mit Poloxamin 908 vor der Aufnahme durch das RES zu schützen. Des Weiteren gelang ihr mit Polysty-

2 Theoretischer Hintergrund

renpartikeln, die von einer Poloxamer 407-Schicht überzogen wurden, eine gezielte Anreicherung der Partikel im Knochenmark (Illum und Davis, 1987).

Von einer weiteren Forschergruppe wurden zwei Tenside als besonders geeignet für die Veränderung der Körperverteilung identifiziert (Tröster et al. 1990, 1992). Bei diesen Substanzen handelte es sich um Poloxamin 1508 und Polysorbat 80. Poloxamin 908, das ein hydrophiles Blockcopolymer ist, hat sich als Mittel der Wahl erwiesen, um die Aufnahme von PMMA-Nanopartikeln in der Leber zu reduzieren (um ca. 60% im Vergleich zu nicht gecoateten Partikeln) und die Konzentration im Blut erheblich zu erhöhen (ca. 23%). Durch Coaten der PMMA-Nanopartikel mit Polysorbat 80 konnte ebenfalls eine Verteilung der Partikel in nicht zum RES gehörenden Organen erzielt werden. Ein Zielorgan dieser gecoateten PMMA-Partikel war das Gehirn, in welchem die Partikel in größerem Ausmaß akkumulierten. Auf diese Beobachtung aufbauende Versuche mit Polysorbat 80-gecoateten PBCA-Nanopartikeln bewiesen, dass auch sie über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn geschleust werden konnten. Auf diese Weise gelang es, die Modellarzneistoffe Dalargin und Loperamid ins Gehirn zu transportieren (Kreuter et al., 1995, Alyautdin et al., 1997).

Die Stabilität und die Dicke der Tensidschicht sind von der Polarität der eingesetzten Partikel abhängig. Die Blockcopolymere adsorbieren mit ihrem hydrophoben Polypropylenoxid-Teil an der Partikeloberfläche. Dadurch wächst die Dicke der gecoateten Tensidschicht mit der Hydrophobie der Nanopartikel und umgekehrt führen hydrophile Oberflächen zu einer reduzierten Adsorption von Blockcopolymeren und zu einer dünneren Schicht (Müller, 1991). Somit resultiert die Gesamtpolarität der gecoateten Nanopartikel aus der Hydrophilie des eingesetzten Copolymers und der Dicke der Tensidschicht. Das Ausmaß und die Art der adsorbierten Serumbestandteile werden damit durch die Polarität der Partikel, eventuell an ihrer Oberfläche vorhandene funktionelle Gruppen und die Art des eingesetzten Tensids bestimmt. Die Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht ist letztendlich für die Verteilung der Nanopartikel im Körper verantwortlich. Diese komplexen Zusammenhänge machen es nahezu unmöglich, z.B. allein durch Messung der Partikelladung und der Oberflächenhydrophobizität die Körperverteilung der Nanopartikel vorherzusagen (Müller, 1991).

Neben der Adsorption von Tensiden kann die Körperverteilung von Nanopartikeln auch durch Opsonisierung mit Immunglobulinen oder bestimmten Proteinen (Lesermann, 1980) oder die Anbindung von gegen das Zielorgan gerichteten Antikörpern erfolgen (Cudd et al., 1990). Eine weitere Veränderung der Organverteilung lässt sich erreichen durch die Magnetisierung von Nanopartikeln und das Anlegen magnetischer Felder (Weitschies et al., 1997).

2 Theoretischer Hintergrund

Die kleinsten Kapillaren des menschlichen Körpers haben einen Durchmesser von 7 μm , weshalb nur Partikel $< 7 \mu\text{m}$ im Blutkreislauf zirkulieren können. Größere Teilchen oder Aggregate werden von den arteriellen Lungenkapillaren nach der i.v.-Injektion herausgefiltert (Douglas et al., 1987).

2.2. Das Retikuloendothetiale System (RES)

Das retikuloendothetiale System (RES), das über viele Organe des Körpers verbreitet ist, beschreibt eine Funktionseinheit von Zellen, die zur Phagozytose und Speicherung von Stoffen und Partikeln befähigt sind. Zu diesen zählen die Monozyten, inklusive der dazugehörigen Stammzellen, und die von ihnen abstammenden Makrophagen der verschiedenen Gewebe des Körpers (Baas, 1994).

Bereits im Jahr 1924 prägte der Freiburger Pathologe Aschoff aufgrund von Versuchen mit Lebendfarbstoffen den Begriff "retikuloendotheliales System", welcher neben Makrophagen und Monozyten retikuläre Zellen der lymphatischen Organe sowie Endothelzellen des Gefäßsystems umschloss, die allesamt angefärbt worden waren. Da die retikulären Zellen und die Endothelzellen – mit Ausnahme der histiozytären Retikulumzellen – heute nicht mehr als phagozytierend betrachtet werden und anderen Zelllinien entstammen als die Monozyten, wurde die Definition auf die oben angeführte aktualisiert. Dementsprechend wurden neuere, präzisere Bezeichnungen wie "retikulohistiozytäres System" (RHS) oder "mononukleär-phagozytierendes System" (MPS) eingeführt. Allerdings findet sich im einschlägigen, internationalen Schrifttum, insbesondere in der angloamerikanischen Literatur, vorherrschend noch immer die traditionelle Bezeichnung "RES" (Baas, 1994). Diese wird deshalb auch in der vorgelegten Arbeit verwendet.

2.2.1 Makrophagen

Makrophagen sind ein Teil der unspezifischen (angeborenen) Immunantwort und gehören zu den Leukozyten. Sie gehen aus den von myeloischen Stammzellen abstammenden Monozyten des Knochenmarks hervor. Haben die Monozyten die Blutstrombahn nach einer Dauer von ca. zwei Tagen verlassen und sind in das umliegende Gewebe migriert, kann für ihre weitere Differenzierung in einer engeren Definition zwischen der ruhenden Form der Histiozyten und der aktivierten Form der Makrophagen unterschieden werden. Die ubiquitären Zellen weisen in den unterschiedlichen Geweben histologisch zum Teil charakteristische Differenzierungen

2 Theoretischer Hintergrund

auf. Makrophagen findet man in den Lymphknoten, der Milz und dem Bindegewebe. In der Leber kommen sie als Kupffer'sche Sternzellen vor, im ZNS als Mikrogliazellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen, im Knochenmark als Osteoklasten und im Bereich des Darmes als peritoneale Makrophagen.

Die Abwehr der unterschiedlichsten Fremdstoffe und Erreger durch die Aufnahme in diese Zellen, die so genannte Endozytose, ist wohl die bekannteste interzelluläre Aktion der Makrophagen. Die Endozytose kann durch zwei verschiedene Mechanismen erfolgen und zwar durch die Phagozytose oder die Pinozytose.

Die Phagozytose beschreibt die Aufnahme und intrazellulären Abbau zahlreicher Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren oder Protozoen. Auch veränderte und geschädigte Zellen oder Zelldebris sowie Antigen-Antikörper-Komplexe werden auf diese Weise beseitigt.

Die Pinozytose ist eine nicht rezeptorvermittelte Aufnahme von kleinen Mengen extrazellulärer Flüssigkeit mitsamt allen darin gelösten Stoffen.

Hat ein Makrophage einen Fremdstoff aufgenommen, so verdaut er diesen. Dazu stehen ihm verschiedene Enzyme wie Superoxidase, Myeloperoxidase, hydrolytische Enzyme, Lactoferrin, Lysozym, andere an Entzündung und unspezifischen Abwehrmechanismen beteiligte Proteine (z. B. Prostaglandine, Interleukin 1) und Faktoren, die die Funktion anderer Zellen bzw. Zellsysteme modulieren (z. B. mitogenes Protein, TNF- α) zur Verfügung.

Makrophagen haben einen Durchmesser von 12-15 μm und stellen 5-8% der im Körper vorhandenen Leukozyten dar. Im Zytoplasma der Makrophagen sind viele Zellorganellen vorhanden: das endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, Mitochondrien, freie bzw. aggregierte Ribosomen und verschiedene membranbegrenzte, phagozytische Vakuolen (Lysosomen, Mikrosomen und „optisch dichte Granula“).

2.3. Toxoplasmose

2.3.1 Biologie von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulär parasitierendes Protozoon und der Erreger der Toxoplasmose. Es wurde erstmalig 1908 von Nicolle und Manceaux aus dem nordafrikanischen Nagetier *Ctenodactylus gundi* isoliert und beschrieben (Nicolle und Manceaux, 1908). Dies führte zur Speziesbezeichnung *gondii*. Der Name *Toxoplasma* beruht auf der griechischen Bezeichnung „toxon“ für Bogen und „plasma“ für Gebilde, was auf die bogenförmigen Gestalt des Parasiten zurückzuführen ist. Seit der Entdeckung 1908 bis heute wurde *Toxoplasma gondii* in zahlreichen tierischen und klinischen Isolaten überall auf der Welt beschrieben.

Taxonomisch ist der Einzeller (Protozoa) dem Stamm Apicomplexa und darin der Klasse Sporozoea sowie der Unterklasse Coccidia und der Familie Sarcocystidae zugeordnet.

Die Bezeichnung „Apicomplexa“ bezieht sich auf den apikalen und typisch strukturierten Komplex, den alle vegetativen Stadien dieses Stammes aufweisen. Dieser Komplex beinhaltet sowohl Organellen als auch komplexe zytoskeletale Elemente (Dubey et al., 1998) und wird als Penetrationsapparat für das Eindringen in die Wirtszelle gedeutet.

Zum Stamm der Apicomplexa gehören neben *T.gondii* weitere humanpathogene Spezies, wie Plasmodien (Malaria), Coccidien, Eimerien und Cryptosporidien. *Toxoplasma gondii* kann aufgrund seiner geringen Zell- und Wirtsspezifität eine Vielzahl unterschiedlicher Zellarten und zwar nicht nur die Zellen des retikuloendothelialen Systems, sondern auch Fibroblasten oder Epithelzellen und sogar Nervenzellen in nahezu alle warmblütigen Vertebraten infizieren und sich darin replizieren (Wong und Remington, 1993). Endwirte von *T.gondii* sind ausschließlich Katzen und Katzenartige (Felidae). In ihrem Darmepithel findet die geschlechtliche Vermehrung statt und es werden Oozysten ausgeschieden, die von Zwischenwirten aufgenommen werden können. Zwischenwirte können z.B. Schafe, Schweine, Vögel, Mäuse oder der Mensch sein. Während bei Warmblütern wie Säugetieren und Vögeln vermutlich nur eine Spezies, *Toxoplasma gondii* vorkommt, treten bei Schlangen, Frösche und anderen wechselwarmen Tieren wohl noch weitere Spezies auf, z. B. das *T. hammondi*, auf (Levine, 1977).

2.3.2 Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Im Lebenszyklus von *T. gondii* sind zwei Phasen zu unterscheiden: ein feliner Teil, der in der Katze, dem Endwirt, stattfindet, und ein nichtfeliner Teil in diversen Zwischenwirten. Diese Unterteilung korreliert mit der sexuellen und asexuellen Fortpflanzung.

Innerhalb der Katze kann jedoch auch die asexuelle Fortpflanzung stattfinden. Bei der asexuellen Fortpflanzung werden hauptsächlich zwei Formen unterschieden: Zum einen die schnell replizierenden Tachyzoiten (griechisch tachys = schnell), die die akute Phase der Infektion markieren und damit für das Krankheitsbild, die Toxoplasmose, verantwortlich sind. Sie haben eine Länge von 4 - 8 μm und eine Breite von ca. 2 - 4 μm und vermehren sich alle 6 bis 8 Stunden (*in-vitro*). Im Stadium der akuten Infektion lassen sie sich im Gewebe nachweisen. Die Vermehrung erfolgt ungeschlechtlich in einer parasitophoren Vakuole innerhalb einer Mutterzelle durch Längsteilung (Endodyogenie, Abb. 2-8).



Abb. 2-8 Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der Endodyogenie (nach Seitz, 1992): (1= Tachyzoit, 2 = beginnende Tochterzellbildung, 3 + 4 = fortschreitende Tochterzellbildung, 5 + 6 = Ausschlüpfen der Tochterzellen)

Haben sich etwa 256 Parasiten angehäuft, platzt die Wirtszelle auf und die freigesetzten Parasiten können neue Zellen infizieren. Während dieser Phase der Infektion kommt es zu einer Ausbreitung der Parasiten in fast alle Organsysteme, hauptsächlich aber Leber, Lymphknoten und Lunge. Die Vermehrung der Parasiten führt zu fokalen Nekrosen und entzündlichen

2 Theoretischer Hintergrund

Reaktionen. Durch das Einsetzen der spezifischen Immunantwort des Wirtes wird die akute Infektion in der Regel überwunden.

Relativ schnell und unabhängig vom Immunsystem (also auch in Zellkulturen) entsteht die zweite Form der asexuellen Fortpflanzung, die so genannten Bradyzoiten. Sie stellen die chronische Phase der Infektion dar. Dabei differenzieren die Parasiten vom Tachyzoiten - zum sich langsam vermehrenden Bradyzoitenstadium (griechisch bradys = langsam). Bradyzoiten befinden sich innerhalb von Zysten, die eine Größe von ca. 150 μm haben und erstmals ca. 7 bis 10 Tage nach der Infektion nachweisbar sind. Zysten können mehrere tausend Bradyzoiten enthalten (Abb. 2-9). Bradyzoiten vermehren sich ebenfalls durch Endodyogenie, allerdings weisen sie eine stark reduzierte Replikationsrate und einen verlangsamteten Metabolismus auf. Die Zystenwand ist wesentlich dicker, komplexer strukturiert und mechanisch widerstandsfähiger als die Membran, die die parasitophore Vakuole umgibt (Dubey et al., 1998). Ob die Zystenwand ein Produkt des Parasiten oder der Wirtszelle darstellt, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden (Seitz, 1995). Zysten mit Bradyzoiten werden bevorzugt in der Herz- und Skelettmuskulatur, in der Retina und im Zentralen Nervensystem (ZNS) gebildet, wo sie ein Leben lang verbleiben, ohne im immunkompetenten Wirt klinische Symptome hervorzurufen (Jacquier et al., 1995, Janischek, 1991). Die besondere Affinität zum ZNS ließ sich durch experimentelle Untersuchungen an Mäusen eindeutig nachweisen. Im Gehirn fanden sich etwa zehnmal soviel Zysten wie in den übrigen Organen.

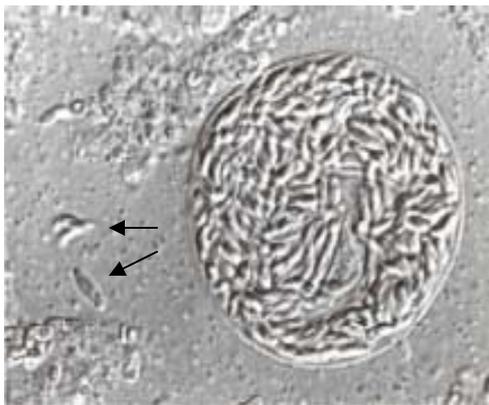


Abb. 2-9 *Toxoplasma gondii*. Zyste und Einzelparasiten (Pfeile) aus dem Gehirn einer Maus. Zystendurchmesser ca. 150 μm . (Seitz, 1992)

Werden diese Zysten durch Verzehr von infizierten und nicht gut durchgekochten Fleisch aufgenommen, löst sich die Zystenhülle im Magen auf und die säure- und magensaftresisten-

2 Theoretischer Hintergrund

ten Bradyzoiten infizieren im Dünndarm Epithelzellen, in denen sie sich wieder zu Tachyzoiten differenzieren und im ganzen Körper ausbreiten (Jacobs et al., 1957). Sie lösen erneut einen Zyklus von akuter Infektion mit anschließender chronischer Infektion und Zystenbildung aus. Hiermit ist der asexuelle Zyklus komplett.

Gelegentlich findet auch innerhalb des Wirtes eine Reaktivierung der Bradyzoiten statt, die sich wieder in Tachyzoiten differenzieren. Normalerweise verhindert dann das Immunsystem eine weitere Verbreitung des Parasiten im Körper.

Der sexuelle Zyklus läuft nur in Katzen ab und ist erst seit 1970 durch die Entdeckung der sexuellen Stadien im Dünndarm dieser Tiere bekannt (Dubey et al., 1970). Frisst eine Katze zystenhaltiges Fleisch (z.B. eine infizierte Maus) oder infiziert sich durch Aufnahme sporulierter Oozysten aus der Umwelt, so wird die Zystenwand im Magen durch proteolytische Enzyme aufgelöst und die freigesetzten säure- und magesaftresistenten Bradyzoiten infizieren Epithelzellen des Dünndarms.

Ab diesem Punkt unterscheidet sich der Vermehrungszyklus stark von dem des Zwischenwirtes. Neben der einfachen Vermehrung wie in der anderen Wirtstieren auch (Schizogonie) findet im Dünndarmepithel der Katze die geschlechtliche Differenzierung und die Vermehrung der Parasiten (Gamogonie) statt. Sie beginnt mit dem Eindringen der Parasiten in die Epithelzellen des Dünndarms, wo sich sexuell differenzierte Formen bilden, die weiblichen und männlichen Gametozyten. Diese bilden nach Fusionierung Zygoten, die sich mit einer dicken Hülle umgeben und als so genannten Oozysten (10x12 µm) mit dem Kot ausgeschieden werden. Die Oozysten gelten erst dann als infektiös, wenn durch Sporulation aus der Zygote zwei Sporozysten mit je vier Sporozoiten entstanden sind (Seitz, 1995). Dieses geschieht je nach Temperatur und Feuchtigkeit innerhalb von zwei bis einundzwanzig Tagen. Bei 24°C ist dieser Vorgang nach 2 bis 3 Tagen abgeschlossen, während er bei Temperaturen um 11°C 2 bis 3 Wochen dauern kann. Unter 4°C und über 37°C findet keine Sporulation statt. Trockene Hitze (über 66°C) oder kochendes Wasser verhindern die Sporulation (Remington und McLeod, 1986).

Die ausgeschiedenen Oozysten sind außerordentlich resistent gegen Umwelteinflüsse. Unter günstigen Bedingungen, wie ausreichende Feuchtigkeit und nicht zu hohe Temperatur, können sie mehr als ein Jahr im Boden infektiös bleiben. Eine Katze kann über einen Zeitraum von sieben bis einundzwanzig Tagen täglich bis zu zwei Millionen Oozysten ausscheiden. Auch bei der ungeschlechtlichen Entwicklung (Schizogonie) gibt es eine Besonderheit in den Katzenartigen (Felidae). Dabei entstehen ebenfalls toxoplasmenhaltige Vakuolen, in denen

2 Theoretischer Hintergrund

sich die Parasiten im Unterschied zum Zwischenwirt durch Endopolygenie vermehren. Aus einer Mutterzelle bilden sich dabei nicht nur zwei, sondern 32 Tochterindividuen heraus (Wildführ, 1975), die bei Ruptur der Vakuole ins Gewebe gelangen. Es können auch Gewebszysten als Dauerstadium gebildet werden.

Zusammenfassend lassen sich drei Entwicklungsstadien der *T. gondii* nennen:

1. sichelförmige Trophozoiten (auch Endo- oder Tachyzoiten genannt),
2. runde Gewebszysten, die in ihrem Inneren mehrere tausend Bradyzoiten (Zystozoiten) enthalten, und
3. ovale Oozysten

2.3.3 Morphologie von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasmen besitzen die klassischen Organellen einer eukaryontischen Zelle, wie den Zellkern, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und den Golgiapparat. Darüber hinaus weisen Toxoplasmen den so genannten Apikalkomplex auf, der das taxonomische Kriterium für die Zuordnung zu dem Stamm der Apicomplexa liefert. Dieser Apikalkomplex ist am vorderen Ende der Parasiten lokalisiert und besteht aus mehreren charakteristischen Strukturen: dem Conoid, einem stumpfen hohlem Kegel aus spiralförmig angeordneten Fibrillen, dem vorderen Polring und sekretorische Organellen, den Micronemen und den keulenförmigen Rhoptrien (Black und Boothroyd, 2000). Das Conoid kann während der Invasion in die Wirtszelle ausgefahren werden und kreisende Bewegungen ausführen (Morissette und Sibley, 2002). Weitere sekretorische Organellen sind die über den ganzen Parasiten verteilten „dense granules“, die elektronendichte Granula. Jedes dieser sekretorischen Organellen enthält Enzyme, die während der Infektion zur Unterstützung des Eindringens in die Wirtszelle freigesetzt werden (Black und Boothroyd, 2000). Zwischen dem Apikalkomplex und dem Zellkern befindet sich der so genannte Apicoplast. Es ist ein Plastid im Cytoplasma der Toxoplasmen, das erstmalig 1997 beschrieben wurde (Fichera und Roos, 1997). Ursprünglich stammt es aus einer Endosymbiose von *T. gondii* mit einer Alge. Bei der Weiterentwicklung der Toxoplasmen wurde dieses Algen-Plastid zurückbehalten.

Umschlossen ist der Parasit von einer Pellikel aus drei Membranen: der Plasmamembran und zwei dicht aneinander liegenden Membranen, die den inneren Membrankomplex bilden. Die Zellmembran weist Mikroporen auf, die der Nahrungsaufnahme dienen.

2 Theoretischer Hintergrund

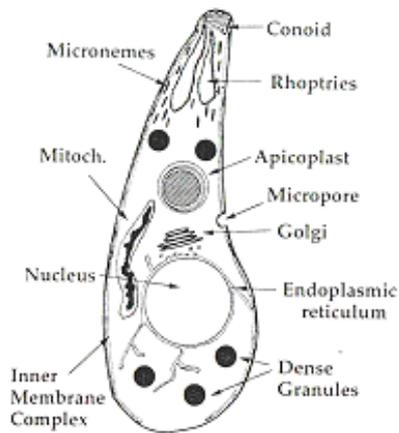


Abb. 2-10 *Toxoplasma gondii* Organellen (Black und Boothroyd, 2000)

2.3.4 Invasion von Wirtszellen und Entstehung der parasitophoren Vakuole

Da sich *T. gondii* nur intrazellulär replizieren kann, muss es zur Vermehrung in die Wirtszelle eindringen. Die Invasion der Parasiten in die Wirtszelle ist ein aktiver Prozess, der in nur 15 bis 30 Sekunden abläuft und dessen Mechanismus gut untersucht ist (Opitz und Soldati, 2002). Er lässt sich in vier Phasen einteilen:

- 1) Erkennen der Zelle und Reorientierung
- 2) Feste Bindung an die Wirtszelle
- 3) Invasion und Einstülpung der parasitophoren Vakuole
- 4) Verschließen der parasitophoren Vakuole

Als einziges Mitglied des Stammes der Apicomplexa kann *T. gondii* alle kernhaltigen Zellen von Vertebraten, Insekten und Fischen infizieren (Werk, 1985). Es konnte gezeigt werden, dass das extrazelluläre Matrixprotein Laminin, das mit hoher Affinität an die Parasitenoberfläche bindet, an der Anheftung des Parasiten an die Wirtszelle beteiligt ist. An den Parasiten angeheftet, wirkt Laminin als Vermittler zwischen dem Parasiten und ubiquitär vorkommenden $\beta 1$ -Integrin-Rezeptoren der Wirtszelle (Furtado, 1992). Nach dieser ungerichteten Adhäsion an die Wirtszelle reorientiert sich der Parasit so, dass der Apikalkomplex der Wirtszelle gegenüberliegt. Während dieser Umorientierung erfolgt eine Ausschüttung des Micronemeninhaltes durch Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration. Diese sezernierten Micronemenproteine stabilisieren die Adhärenz zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle. Während des Eindringens sezerniert der Parasit den Inhalt seiner Rhoptries in die Zelle. Es handelt

2 Theoretischer Hintergrund

sich um ein Proteingemisch aus mindestens acht Proteinen, ROP1 bis ROP8 (Black und Boothroyd, 2000). Beim Eindringen in das Zellzytoplasma, eine Art Einstülpung, nimmt der Parasit Teile der Wirtszellmembran mit. Die Wirtszellmembran und die Parasitenmembran scheinen sich an einer Kontaktzone rund um den Parasiten zu vereinigen („moving junction“), die vom apikalen zum posterioren Ende des eindringenden Parasiten wandert (Pfefferkorn, 1990).

Ist *T.gondii* vollständig in die Zelle eingedrungen, schließt sich die Wirtszellmembran wieder und der Parasit ist in der so genannten parasitophoren Vakuole eingeschlossen. Die Membran der parasitophoren Vakuole besteht zu 85% aus der eingestülpten Membran der Wirtszelle. Aus dieser werden Transmembran- und membranassoziierte Proteine sehr schnell entfernt und unter anderem durch Rhoprienproteine ersetzt (Joiner und Roos, 2002). Es wurden zum Beispiel die Proteine ROP 1 und ROP2 auf der Membran der parasitophoren Vakuole nachgewiesen (Saffer et al., 1992). Generell wird den Rhoprienproteinen eine strukturelle Funktion beim Aufbau der parasitophoren Vakuole zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass ROP2 die Assoziation von Mitochondrien der Wirtszelle mit der vakuolären Membran über einen neuartigen Mechanismus vermittelt (Sinai et al., 1997). Eine weitere Eigenschaft der parasitophoren Vakuole, neben dem Fehlen von Wirtszellproteinen, ist die Unfähigkeit mit Vesikeln der Wirtszelle zu fusionieren. Dadurch findet keine Ansäuerung der Vakuole statt und daher keine Fusionierung mit den Lysosomen der Zelle, die zur Verdauung des Parasiten führen würde (Sibley et al., 1985).

Innerhalb von zehn Minuten nach der Invasion des Parasiten in die Wirtszelle fusionieren die „dense granules“ und sezernieren ihren Inhalt in die parasitophore Vakuole. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess, ebenso wie die Sekretion von Mikronemen und Rhoprien, abhängig vom Calcium ist (Black und Boothroyd, 2000). Die sezernierten Proteine, so genannte GRA-Proteine, sind an der Ausbildung eines intravakuolären Netzwerkes tubulärer Membranen und an der Modifizierung der Vakuolenmembran beteiligt. Es wird angenommen, dass diese Proteine in der Vakuolenmembran maßgeblich am Stoffaustausch (Aminosäuren, Zucker, ATP) zwischen Wirtszelle und Parasit beteiligt sind.

2.3.5 Asexuelle Vermehrung und Austritt aus der parasitophoren Vakuole

In der parasitophoren Vakuole findet die asexuelle Vermehrung der Parasiten statt, die Endodyogenie. Hierbei entstehen zwei Tochterzellen aus einer Mutterzelle, die dabei zerstört wird (Abb. 2-8). Bei der Teilung bleibt die Kernhülle zunächst intakt, während der Apicoplast und die Mitochondrien zwischen den beiden Tochterzellen aufgeteilt werden. Anschließend erfolgt die Kernteilung.

Die von der Mutterzelle stammende Plasmamembran bildet die Plasmamembran der beiden Tochterzellen. Vom anterioren Ende her bildet sich eine Teilungsfurche bis hin zum posterioren Ende der beiden Tochterzellen, wo die Parasiten jedoch nicht völlig getrennt werden, sondern über einen schmalen Bereich der ursprünglichen Mutterzelle, den so genannten residual body (Black und Boothroyd, 2000), verbunden bleiben. Die Verbindung führt bei weiteren Replikationen zur Bildung von Parasiten-Rosetten innerhalb der Vakuole, wobei die freien anterioren Enden der Parasiten vom Zentrum wegzeigen. Die Generationszeit der Tachyzoiten *in-vitro* beträgt 6 bis 8 Stunden. Haben sich in der parasitophoren Vakuole etwa 256 Parasiten gebildet, verlassen sie die Wirtszelle durch Lyse und bewirken damit die Zerstörung der Wirtszelle. Der für den Austritt verantwortliche Stimulus ist nicht bekannt, beschrieben ist lediglich, dass eine Erhöhung des Calcium-Gehalts vor dem Austritt erfolgt (Endo et al., 1982).

2.3.6 Immunabwehr gegen *Toxoplasma gondii*

Durch Einsetzen der Immunantwort nach einer Primärinfektion mit *T.gondii* wird die Vermehrung der Tachyzoiten limitiert und der Erreger durch das Immunsystem in den meisten Organen erfolgreich eliminiert. Jedoch können sich die Toxoplasmen durch rasch einsetzende Zystenbildung der Immunabwehr entziehen (Immunevasion).

Parasitäre Infektionen stimulieren die humorale, so wie die zelluläre Immunantwort.

Die humorale Immunantwort erfolgt durch B-Lymphozyten, aus denen spezifische Antikörper gegen *T. gondii* gebildet werden. Obwohl ein breites Spektrum von anti-*T. gondii* Antikörpern gebildet wird, spielt die humorale Immunantwort eine untergeordnete Rolle. In der Mukosa des Darms können Antikörper-vermittelte Abwehrmechanismen die Verbreitung des Parasiten verlangsamen (Chardes und Bout, 1993).

2 Theoretischer Hintergrund

Bei der spezifischen zellulären Immunantwort erfolgt die Kontrolle des Erregers durch T-Lymphozyten. Hierbei sind vor allem CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten von Bedeutung, da sie unter anderem das Zytokin Interferon- γ produzieren, das eine protektive Immunantwort gegen den Erreger während der akuten und der chronischen Phase der Infektion vermittelt. Ebenso wird das Zytokin Interleukin -12 (IL-12) produziert, das auf verschiedene Arten von Leukozyten wirkt, die auf diesen Stimulus hin Interferon- γ exprimieren.

Neben T-Lymphozyten sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die zur unspezifischen zellulären Immunabwehr gezählt werden, für die initiale Interferon- γ -Produktion während der akuten Infektion zuständig. Die Produktion von Interferon- γ , vor allem durch die T-Lymphozyten, ist die wichtigste immunologische Abwehr gegen *T.gondii*, die zur Aktivierung von Makrophagen führt (Nathan et al, 1979). Die Rolle von IFN- γ für die Resistenz von Mäusen gegen *T. gondii* ist sehr komplex, da dieses Zytokin viele immunregulatorische Funktionen ausübt. Seine wichtigste Funktion ist es allerdings, antiparasitäre Effektormechanismen zu aktivieren. Zu diesen Mechanismen gehören die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), sowie die von reaktiven Sauerstoffmetaboliten. Durch die Produktion von NO wird die Proliferation der *T.gondii* gehemmt (Adams et al., 1990) und durch die Bildung der Sauerstoffspezies, wie H₂O₂, O₂⁻, OH⁻ und ¹O₂ werden Erreger abgetötet (Murray und Cohn, 1979). Ein weiterer Effektormechanismus, der in humanen Zellen durch IFN- γ stimuliert wird, ist die Expression der Indolamin 2,3- dioxygenase (IDO). IDO entzieht in infizierten Zellen den Toxoplasmen die für sie lebenswichtige Aminosäure Tryptophan. Aufgrund dieses IDO-vermittelten Tryptophanentzugs können sich Toxoplasmen intrazellulär nicht mehr vermehren (Däubener et al., 2001). Der vierte IFN- γ -stimulierte Effekt ist die Reduktion der intrazellulären Eisenkonzentration, die ebenfalls zur Toxoplasmastase führt. IFN- γ bewirkt aber nicht nur eine Kontrolle und Elimination der Toxoplasmen aus infizierten Zellen, sondern es induziert im Gehirn auch die Umwandlung von schnell replikativen Tachyzoiten in sich langsam vermehrende Bradyzoiten, die dann in Form von Zysten in Neuronen und Astrozyten dauerhaft persistieren können.

2.3.6.1 Wie Toxoplasmen in Wirtszellen überleben

Der aktive Invasionsprozess der *T.gondii* läuft so schnell und unauffällig ab, dass die Wirtszelle nicht über die Infektion alarmiert wird. Wurde hingegen die Wirtszelle durch das Immunsystem „vorgewarnt“, so gelingt dieser „heimliche“ Eintritt den Toxoplasmen nicht. Bei entsprechender Vorwarnung, d. h. Aktivierung, können professionelle Phagozyten („Fresszellen“) die Toxoplasmen aktiv aufnehmen und intrazellulär abtöten.

2 Theoretischer Hintergrund

Innerhalb der Wirtszelle verbleiben die Toxoplasmen in der parasitophoren Vakuole (PV), die komplett aus Molekülen des Parasiten besteht. Diese parasitären Moleküle haben keine Bindungsstellen für wirtseigene Moleküle, so dass der intrazelluläre Parasit dauerhaft unerkant bleibt und nicht abgetötet wird.

Nicht erkannt zu werden, ist ein notwendiger Schritt beim intrazellulären Überleben der Toxoplasmen. Dazu greifen sie aktiv in Kommunikationssysteme der Wirtszelle, so genannte Signaltransduktionsprozesse, ein, um einerseits die Aktivierung antiparasitärer Moleküle und andererseits den Tod der Wirtszelle durch den Stress der Infektion zu verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass Tachyzoiten aktiv die Apoptose der Wirtszellen unterbinden und die Wirtszellen resistent gegen Apoptose-auslösende Reize sind (Schlüter, 2004).

2.3.7 Green Fluorescence Protein (GFP)

Das Green Fluorescence Protein wurde erstmals 1962 beschrieben und stammt aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria*. Die Klonierung des Gens für das Green Fluorescence Protein ermöglicht die rekombinante Expression von GFP in eukaryontischen sowie in prokaryontischen Zellen. GFP wird in diesen Zellen in Abwesenheit von exogenen Substraten synthetisiert und kann deshalb als Reporterprotein in vielen verschiedenen Organismen verwendet werden.

Die Fluoreszenz des GFP ist beständig gegenüber Hitze (bis 65 °C), gegenüber Fixierung mit Formaldehyd sowie vielen Proteasen, und es zeigt (im Fluoreszenzmikroskop) praktisch keinen Photobleicheffekt. GFP absorbiert UV- und blaues Licht ($\lambda_{\max} = 395$ und 470 nm) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\max} = 509$ nm), das mit Fluoreszenzmikroskopie und dem FACS nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

Anwendung findet das Green Fluorescence Protein als Marker der Genexpression in Säuger- und Pflanzenzellen, der Proteinlokalisierung und zur Verfolgung des Proteintransportes in der Zelle (Striepen et al., 1998). Der in dieser Arbeit verwendete *T.gondii*- Stamm exprimiert das GFP im Zytoplasma (Striepen et al., 1998).

2.3.8 Infektionsquellen für den Menschen

Menschen können sich auf verschiedenen Wegen mit Toxoplasmose infizieren:

1. orale Aufnahme von Zysten aus rohem oder halbrohem Fleisch
2. Kontakt mit Oozysten aus der Umgebung
3. direkte Übertragung von der Mutter aufs Kind (diaplazentar)
4. Organtransplantationen oder Bluttransfusionen

1. orale Aufnahme von Zysten aus rohem oder halbrohem Fleisch

In Deutschland und anderen Industrienationen ist dieser Infektionsweg bei Menschen am häufigsten (Seitz, 1995). Als Hauptinfektionsquelle zählen dabei Fleisch von Schwein, Schaf oder Ziege und weniger das Fleisch von Rind und Geflügel (Janitschke, 1991, Aspöck, 1995 Jacquier et al., 1995). Neben den Menschen können sich aber auch Warmblüter auf diesem Wege mit Toxoplasmose infizieren, z.B. durch Fressen von infizierten Tieren (Janitschke, 1991).

Bei wechselwarmen Tieren wie Schlangen, Fröschen und Reptilien erfolgt keine Vermehrung von *Toxoplasma gondii*. Hier wurden zwar weitere verwandte Arten nachgewiesen, diese haben jedoch keine humanmedizinische Bedeutung. Somit scheiden diese Tiere als Infektionsquelle aus (Aspöck, 1995).

Die Transmission der Zysten kann verhindert werden, indem Lebensmittel auf eine Kerntemperatur von mindestens 70°C erhitzt oder tiefgekühlt (unter -18°C) werden.

Ebenso ist eine mögliche Toxoplasmose beim Verzehr von langgereifter, gepökelter oder getrockneter roher Fleischware ausgeschlossen (wie z.B. Salami) (Jacquier et al., 1995).

2. Kontakt mit Oozysten aus der Umgebung

Eine weitere wichtige Ursache für die Oozysten-Übertragung auf den Menschen ist die perorale Schmutz- und Schmierinfektion im Bereich der Katzenhaltung (Aspöck, 1995). Der Mensch kann sich beim Umgang mit der Katzentoilette und anderen Katzenutensilien infizieren. Dagegen stellt eine tägliche Reinigung der Katzentoilette keine Infektionsgefahr dar, da

2 Theoretischer Hintergrund

Oozysten erst nach der Sporulation, also ein paar Tagen nach der Ausscheidung, infektiös werden.

Eine weitere bedeutende Ursache für eine perorale Schmier- und Schmutzinfektion ist der Umgang mit Erde, die mit Katzenkot verunreinigt ist. Eine Infektion ist hierbei z.B. bei der Gartenarbeit möglich. Ein Problem ist auch Katzenkot in Sandkästen. Kinder, die gern alles in den Mund stecken, sind dadurch einer Infektionsgefahr ausgesetzt (Janitschke, 1991, Jacquier et al., 1995). Weiterhin kann eine Infektion durch Verzehr von nicht ausreichend gewaschenen, mit Katzenkot kontaminierten Nahrungspflanzen (z.B. Obst, Salat, Gemüse) geschehen (Ockert, 1995). In seltenen Fällen wurde auch mit Oozysten kontaminiertes Wasser als Infektionsquelle beschrieben.

3. Direkte Mutter- Kind-Übertragung (diaplazentar)

Infiziert sich eine Frau während der Schwangerschaft erstmals mit Toxoplasmen, so gelangt der Erreger über die Plazenta in den Kreislauf des Fötus. Trotz der diaplazentaren Übertragung der Toxoplasmen muss es nicht zwangsläufig zu einer Infektion des Kindes kommen. Es konnte gezeigt werden, dass bei primär infizierten Schwangeren der Fötus nur in 50% der Fälle infiziert wurde (Enders, 1991). Durch eine rechtzeitig eingesetzte Therapie der Mutter kann die Infektion des Kindes in 60% der Fälle verhindert oder zumindest die Symptome der konnatalen Toxoplasmose abgeschwächt werden (Montoya und Liesenfeld, 2004). Das Übertragungsrisiko von einer primär infizierten Mutter auf das Ungeborene steigt jedoch im Laufe der Schwangerschaft an. So liegt dieser Anteil im ersten Trimenon bei 25%, im zweiten bei 54% und im dritten bei 65%. Daraus ergibt sich im Durchschnitt eine konnatale Infektionshäufigkeit von eins bis zehn Fällen pro 10000 Lebendgeburten. Je später eine solche Primärinfektion im Verlaufe der Schwangerschaft auftritt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer fetalen Erkrankung. Infiziert sich eine Frau vor der Schwangerschaft, so liegt kein oder nur ein sehr geringes Risiko einer konnatalen Infektion vor (Montoya und Liesenfeld, 2004). Erfolgt die Primärinfektion aber bis zu drei Monaten vor der Schwangerschaft, so besteht ein gewisses Risiko für das Kind.

Obwohl es einige beschriebene Fälle von konnatalen Toxoplasmeninfektionen bei Kindern von chronisch infizierten Müttern gibt, kann man grundsätzlich davon ausgehen, dass bei einer chronisch infizierten immunkompetenten Schwangeren für den Feten keine Infektionsgefahr besteht. Die große Mehrheit von Autoren ist der Überzeugung, dass die fetale Infektion ausschließlich im Falle einer mütterlichen Primärinfektion während der

2 Theoretischer Hintergrund

Schwangerschaft auftritt (z.B.: Burkhardt 1992, Gross 1995).

4. Übertragung durch Organtransplantationen oder Bluttransfusionen

Die Transplantation von zystenhaltigen Organen in einen seronegativen Empfänger spielt eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Toxoplasmose. Beschrieben wurde diese Übertragung bei Transplantationen von Herz, Lunge, Niere und Leber.

Selten, aber dennoch möglich, ist die Toxoplasmenübertragung durch Bluttransfusionen. Toxoplasmen ließen sich hierbei insbesondere in kernhaltigen Hämatozyten nachweisen (Ockert 1995).

2.3.9 Das Krankheitsbild Toxoplasmose

Das Krankheitsbild der Toxoplasmose gehört zu den häufigsten parasitischen Zoonosen und ist weltweit verbreitet, wobei es allerdings starke regionale Unterschiede gibt (Tenter et al., 2000). Gewöhnlich liegen die Infektionshäufigkeiten in Regionen kühleren Klimas unter denen von warmen Zonen. Die Durchseuchung steigt in der Regel mit jedem Lebensjahrzehnt um etwa 10% an und erreicht bei 60-65jährigen bis zu 70% (Janitschke, 1991).

2.3.9.1 Postnatale Toxoplasmose

Eine Infektion immunkompetenter Wirte verläuft in der Regel symptomlos. Bei 1-5% der Infizierten treten nach einer Inkubationszeit von 1-3 Wochen Symptome eines leichten grip-palen Infektes auf, wie schmerzlose Lymphadenopathie, Müdigkeit, Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen, Fieber, Diarrhoe oder auch ein makulopapulöses Exanthem (Toxoplasmosis exanthematica). Diese Krankheitszeichen können mehrere Wochen andauern, wobei aber eine medikamentöse Behandlung nicht erforderlich ist (Thalhammer, 1957, Janitschke, 1991).

Die akute Phase der Toxoplasmose wird mit der Bildung der Parasitenzysten im Gewebe (Muskulatur und Gehirn) beendet und die Infektion geht in die chronische Phase, die klinisch stumm verläuft, über.

Nur bei 5-10% der Infizierten kommt es zur klinisch manifesten Toxoplasmose. Die häufigste Manifestationsform ist die so genannte Toxoplasmosis lymphonodosa (Lymphadenitis), die mit Fieber sowie Kopf- und Muskelschmerzen einhergeht. In Einzelfällen können auch organ-spezifische Symptome im Vordergrund stehen, wie z.B. Pneumonie, Hepatitis, Perikarditis oder Meningoenzephalitis.

2 Theoretischer Hintergrund

Eine Primärinfektion bei immunsupprimierten Personen verläuft dagegen selten symptomlos. Das Krankheitsbild entspricht einer hochfieberhaften Allgemeininfektion mit stärker ausgeprägten Destruktionen befallener Organe wie Lunge, Gehirn, Leber, Herz und Augen. Folgen können dann eine Toxoplasmose cerebrospinalis (Enzephalomyelitis), Meningoenzephalitis, Toxoplasmose ophthalmica (Retinochorioiditis des granulomatösen Typs), Myokarditis oder eine nekrotisierende interstitielle Pneumonie sein (Pohle, 1995).

Unbehandelt führt die Primär-Toxoplasmose bei immunsupprimierten Personen häufig zum Tod. Gelingt es dem Körper nicht, eine ausreichende Immunabwehr aufzubauen (AIDS-Patienten, Organ-Empfänger oder andere immunsupprimierten Personen), kann es durch Reaktivierung der chronischen zu einer akuten Infektion kommen. Hierbei werden Bradyzoiten aus Zysten freigesetzt, die zu Tachyzoiten differenzieren und sich bei fehlender Immunantwort ungehindert replizieren können. Da die Zysten bevorzugt im Gehirn persistieren, ist in dem Fall der reaktiven Toxoplasmose, die Toxoplasma-Enzephalitis die häufigste Verlaufsform, die ohne Behandlung meist letal verläuft. Eine weitere häufig auftretende Form der reaktiven Toxoplasmose, ist die ebenfalls unbehandelt zum Tod führende Toxoplasmen-Pneumonie (Wong und Remington, 1993).

2.3.9.2 Pränatale Toxoplasmose

Bei der Primärinfektion einer Schwangeren besteht ein etwa 50%iges Risiko, dass der Erreger diaplazentar übertragen wird und dieses zu einer konnatalen Toxoplasmose führt. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion kann es zum Abort, zur Totgeburt oder schweren ZNS- und Augenmißbildungen des Fötus kommen.

Beispiele hierfür sind Entwicklung eines Wasserkopfs (Hydrozephalus), intrazerebralen Verkalkungen (Entwicklung eines Krampfleidens) und Erblindung als Zeichen einer abgelaufenen Hirnentzündung (Mutschler, 2001). Infektionen am Beginn einer Schwangerschaft führen zu schweren Schäden; finden die Infektionen später statt, so ist das klinische Bild weniger schwer.

Wird ein pränatal infiziertes Kind zunächst klinisch gesund geboren und wird nicht medikamentös behandelt, so können nach Monaten oder Jahren Spätschäden wie Entwicklungsstörungen, geistige Verlangsamung, Augenveränderungen bis hin zur Erblindung auftreten (Ruf, 1995, Montoya und Liesenfeld, 2004).

2 Theoretischer Hintergrund

Ein Toxoplasmosescreening gehört zu den Regeluntersuchungen bei einer vorhandenen Schwangerschaft. Darüber hinaus besteht in Deutschland eine Meldepflicht für konnatale Toxoplasmosen!

2.3.10 Therapie der Toxoplasmosen

Eine vorliegende Toxoplasmosen bei immunkompetenten Erwachsenen wird in der Regel nicht behandelt. Ebenso verhält es sich bei einer Lymphadenitis bei immunkompetenten Personen, da sie zumeist spontan ausheilt.

Indikationen für eine therapeutische und prophylaktische Behandlung der Toxoplasmosen sind folgende (Ruf, 1995, Montoya und Liesenfeld 2004):

- akut erworbene Toxoplasmosen in der Schwangerschaft (auch bei Verdacht auf eine Infektion)
- konnatale Infektion des Neugeborenen (auch bei Verdacht auf eine Infektion)
- dokumentierte fetale Infektion
- Retinochorioiditis (meist als Folge einer konnatalen Infektion in der zweiten und dritten Lebensdekade auftretend)
- akut erworbene Toxoplasmosen mit Organkomplikationen (z.B. Myokarditis) bei Immunkompetenten
- Laborinfektion
- durch Bluttransfusion erworbene Toxoplasmosen
- seronegative Organempfänger nach Organerhalt von seropositiven Spendern
- Toxoplasmosen bei AIDS und Immundefizienz anderer Ursache (vor allem bei Hirn-Toxoplasmosen und auch bei neu erworbener Infektion ohne Krankheitszeichen, sowie bei latenter Infektion)

Das Hauptziel einer Toxoplasmosen-Therapie besteht darin, dass die Vermehrung der Parasiten in der akuten Infektionsphase gestoppt wird. Da die Therapie nur auf proliferierende Toxoplasmen wirkt und nicht auf ruhende Zysten im Gewebe, kann auch nur eine akute und nicht eine latente Toxoplasmosen behandelt werden. Es gibt bisher auf dem Markt noch keine Medikamente, die eine gesicherte Wirksamkeit gegenüber Toxoplasma-Gewebezysten aufweist.

2 Theoretischer Hintergrund

Die Standardtherapie bei der Behandlung der Toxoplasmose stellt die Kombination aus Pyrimethamin, Sulfadiazin und Folinsäure dar. Ebenfalls finden Spiramycin und Clindamycin weitere Anwendung. Es gibt aber auch neuere Ansätze, die auch eine gewisse Wirksamkeit gegen Toxoplasma-Gewebezysten aufweisen aber noch nicht ausreichend getestet worden sind. Diese neuen Substanzen werden allein oder in Kombination eingesetzt. Dazu gehören: Atovaquon, Trimetrexat, Azithromycin, 5-Fluoro-Uracil und Dapson (Ruf, 1995), wobei gerade mit Atovaquon im Maus-Modell schon sehr gute Ergebnisse bei der Behandlung der Reaktivierungstoxoplasmose erzielt werden konnten (Schöler et al., 2001).

2.3.10.1 Substanzen der Toxoplasmose-Therapie

2.3.10.1.1 Standard-Therapie bei Toxoplasmose

Trotz des hohen Nebenwirkungspotentials stellt die Kombination aus Pyrimethamin, Sulfadiazin und Folinsäure die wirkungsvollste Behandlung der Toxoplasmose dar.

Die beiden Folsäureantagonisten Pyrimethamin und Sulfadiazin wirken synergistisch auf die Hemmung des Folsäurestoffwechsels mit Blockierung der Folsäurebildung und deren Umwandlung in Folinsäure.

Pyrimethamin hemmt die Dehydrofolatreduktase während Sulfadiazin eine Hemmung der Dihydropterinsynthetase bewirkt. Einem daraus folgenden Folinsäuremangel wird mit der präventiven Gabe von Folinsäure entgegengewirkt. Die direkte Folsäuresubstitution ist therapeutisch nicht sinnvoll, da Pyrimethamin gleichzeitig die Umwandlung in Folinsäure verhindert.

2.3.10.1.1.1 Pyrimethamin

(Handelsname: Daraprim[®])

Pyrimethamin ist einer der wirksamsten Hemmer des Folsäurestoffwechsels und stellt die wichtigste Komponente der Toxoplasmose-Therapie dar.

Pyrimethamin ist ein Diamino-benzylpyrimidin und inhibiert die Dihydrofolatreduktase, die im Folsäurestoffwechsel die Umwandlung von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat steuert. Damit ist die Überführung der Folsäure in seine aktive Form (Tetrahydrofolsäure und seine Derivate, wie z.B. Folinsäure) verhindert, dessen Aufgabe die Übertragung von Einkohlenstofffragmenten ist. Dadurch ist die Thymin- und Purinsynthese, die zur Zellteilung nötig ist, nicht mehr möglich (Mutschler, 2001).

2 Theoretischer Hintergrund

Das Antibiotikum hat eine im Vergleich zur Dihydrofolatreduktase des Menschen eine mehr als tausendfach so hohe Affinität zum parasitären Enzym und es ist somit für den Menschen nur wenig toxisch. Es wirkt auf die proliferativen Toxoplasmen (Tachyzoiten), nicht aber auf die Zysten (Bradyzoiten) im Gewebe (Ruf, 1995).

Pyrimethamin ist plazentagängig und kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Die Dosierung des Pyrimethamins bei der Standardtherapie der Toxoplasmose ist personenbezogen und wird immer mit einer hohen Initialdosis am ersten und zweiten Tag begonnen und dann mit einer geringeren Dosierung fortgesetzt.

Eine wesentliche Nebenwirkung des Pyrimethamins, sowie auch des Sulfadiazins, ist die dosisabhängige Myelosuppression. Diese führt zu einer Schädigung des Knochenmarks mit nachfolgender Beeinträchtigung der Blutbildung, so dass nur noch wenige Blutkörperchen heranreifen können. Die Folgen sind Anämie, Neutropenie und Immunsuppression.

Diesen Nebenwirkungen kann aber entgegengewirkt werden, indem direkt zu Therapiebeginn auch Folsäure gegeben wird. Weitere Nebenwirkungen sind Übelkeit, Kopfschmerzen, vereinzelt Exantheme und Geschmacksmißempfindungen (Ruf, 1995, Mutschler, 2001).

2.3.10.1.1.2 Sulfadiazin

(Sulfadiazin-Heyl®)

Sulfadiazin ist der Kombinationspartner von Pyrimethamin in der Standardkombination der Toxoplasmose-Therapie. Es hat sich im Vergleich zu anderen Langzeitsulfonamiden als besonders effektiv erwiesen.

Wie alle Sulfonamide handelt es sich auch bei Sulfadiazin um ein chemisch synthetisiertes Analogon zu Paraaminobenzoesäure. Es blockiert das Enzym, welches unter Verwendung von Paraaminobenzoesäure die Bildung von Folsäure bewirkt. Dabei wirkt es als Antimetabolit, in dem es kompetitiv die p-Aminobenzoesäure verdrängt. Aufgrund eines meist vorhandenen Vorrates an Folsäure tritt die Wirkung stets verzögert ein.

Beim Menschen rufen Sulfonamide keinen Folsäuremangel hervor, da diese die Folsäure nicht selbst synthetisieren können, sondern über die Nahrung aufnehmen müssen. Sie wirken auch nicht parasitenabtötend, sondern hemmen nur die Replikation der Parasiten, da Parasiten zwar p-Aminobenzoesäure zur Vermehrung benötigen aber bei einem p-Aminobenzoesäure-Mangel nicht abgetötet werden (Mutschler, 2001).

Durch seine Plazentagängigkeit sowie den Übertritt in den Zerebrospinalraum und in das Augenkammerwasser erreicht das Sulfadiazin direkt an den Orten der Toxoplasmose-manifestation hohe Konzentrationen.

2 Theoretischer Hintergrund

Je nach Form der zu behandelnden Toxoplasmose wird die Therapie mit Sulfadiazin mit einer Initialdosis in den ersten zwei Tagen begonnen und dann mit einer geringeren Dosis weitertherapiert oder es wird von Therapiebeginn an in einer niedrigen Dosis gegeben (Montoya und Liesenfeld, 2004).

Die Nebenwirkungen bestehen ähnlich wie bei Pyrimethamin im Wesentlichen in Blutbildungsstörungen, sowie Nierenschädigungen durch Ausfällen von Kristallen in den Nierentubuli und eine Hyperbilirubinämie mit Kernikterus bei Früh- und Neugeborenen.

Weitere Nebenwirkungen sind gastrointestinale Störungen (Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe), allergisch-toxische Reaktionen mit Hautbeteiligung, Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen und Photosensibilisierungen. In seltenen Fällen kann es zu einem Stevens-Johnson- oder Lyell-Syndrom kommen (Mutschler, 2001).

Ein weiteres Langzeitsulfonamid, das ebenfalls in Kombination mit Pyrimethamin eingesetzt wird, ist Sulfadoxin. Diese Wirkstoffkombination ist mit dem Namen Fansidar[®] auf dem schweizer Markt.

2.3.10.1.1.3 Folinsäure

(Leucovorin[®], Rescuvolin[®])

Folinsäure wird parallel zur Standardkombination aus Pyrimethamin und Sulfadiazin bei der Therapie der Toxoplasmose eingesetzt, um die myelosuppressiven Nebenwirkungen abzuschwächen. Sie sollte immer präventiv eingesetzt werden, da sie bei einer bereits eingetretenen Myelosuppression nur wenig wirksam ist. Dabei beeinträchtigt sie aber nicht die antitoxoplasmotische Wirkung der Standardtherapie, da sie von den Toxoplasmen im Gegensatz zu menschlichen Zellen nicht aufgenommen werden kann (Ruf, 1995).

Je nachdem bei welcher Art der Toxoplasmose die Folinsäure eingesetzt wird, wird sie unterschiedlich dosiert: von 5 mg dreimal pro Woche bis 20 mg am Tag (Montoya und Liesenfeld, 2004).

2.3.10.1.2 Spiramycin

(Rovamycine[®], Selectomycin[®])

Spiramycin ist ein Makrolid-Antibiotikum mit einem 16-gliedrigen Laktoring.

Es hemmt die Proteinsynthese in der Elongationsphase, indem es die Translokation beeinflusst. Dabei bindet es an die 50S-Untereinheit der Ribosomen (Mutschler, 2001).

Spiramycin wirkt damit replikationshemmend, hat aber keinen Einfluß auf Zysten.

2 Theoretischer Hintergrund

Es ist das Mittel der Wahl im ersten Schwangerschaftstrimenon bei hochgradigem Verdacht oder sicherem Hinweis auf eine akute Toxoplasmose (Schoondermark et. al., 1994, Ruf, 1995, Montoya und Liesenfeld, 2004). Aufgrund seiner guten Verträglichkeit kann es auch bei fraglicher Infektion in der Schwangerschaft ganzzeitig angewendet werden. Die Wirksamkeit ist jedoch geringer als die der Standardtherapie. Eine weitere Indikation besteht bei einer Sulfonamidallergie.

Spiramycin verhindert die Transmission des Erregers auf den Fetus und kann daher bei negativem Erregernachweis mittels PCR bis zur Geburt des Kindes als Monotherapie verwendet werden (Schoondermark et. al., 1994). Es langt jedoch bei schon erfolgter fetaler Infektion nicht aus, da es nur in geringem Maße plazentagängig ist. Trotzdem reichert es sich in der Plazenta an und erreicht dort eine etwa zehnmal höhere Konzentrationen als im Serum. Außerdem ist es auch in der Leber, Milz und im Herzmuskel, jedoch nicht im Hirn zu finden (Ruf, 1995). Da es nur in geringem Maße in den Zerebrospinalraum übertritt, beeinflusst es nicht die Entstehung einer Toxoplasma-Enzephalitis.

Im Vergleich zur Konzentration im mütterlichen Gewebe findet sich das Makrolid im fetalen Gewebe nur zu fünf bis zehn Prozent. Deshalb wird bei alleiniger Anwendung nach bereits erfolgter fetaler Infektion kein durchschlagender Therapieerfolg mehr erreicht.

Die Dosierung bei Erwachsenen, ist 2-4 g verteilt auf zwei bis vier Einzeldosen. Neugeborene erhalten täglich 50 bis 100 mg/kg in zwei Einzeldosen.

Nebenwirkungen treten nur gelegentlich auf. Die Nebenwirkungen sind gastrointestinale Probleme, wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall (Mutschler, 2001).

2.3.10.1.3 Clindamycin

(Sobelin[®], Clindahexal[®], Clinda-saar[®], Basocin[®], u.a.)

Clindamycin gehört zu den Lincosamid-Antibiotika. Durch Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen hemmt es die Peptidyl-Transferase in der Elongationsphase und beeinträchtigt dadurch die bakterielle Proteinsynthese (Mutschler, 2001). Es wirkt bakterio-statisch.

Clindamycin ist eine mögliche und gute Alternative für Sulfadiazin in der Standardkombination mit Pyrimethamin.

Ein Vorteil gegenüber der Standardtherapie ist, dass Clindamycin nur eine selten auftretende dosisabhängige Knochenmarkstoxizität aufweist. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass sich Clindamycin in der Retina anreichert, so dass es besonders in der Therapie der Retinoblastitis angewendet wird (Mittelviehhaus, 1992). Bei der Therapie der HIV-assozierten Hirn-Toxoplasmose hat die Kombination aus Clindamycin/Pyrimethamin die gleiche Wirk-

2 Theoretischer Hintergrund

samkeit wie die Standardkombination Sulfadiazin/Pyrimethamin und wird daher bei einer vorliegenden Sulfonamidallergie eingesetzt.

Die Dosierung bei Erwachsenen liegt zwischen 4-mal täglich 600 mg und 4-mal täglich 1200 mg (Montoya und Liesenfeld, 2004). Die Behandlung erfolgt in der Regel über drei bis sechs Wochen.

Während der Therapie mit Clindamycin treten kaum schwerwiegende Nebenwirkungen auf. Die häufigsten Nebenwirkungen sind gastrointestinales Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe. Colitis-Zeichen bis hin zur pseudomembranösen Colitis können in Einzelfällen zu Komplikationen führen (Mittelviehhaus, 1992, Ruf, 1995). Blutbildveränderungen im Sinne einer Myelosuppression sind selten.

2.3.10.1.4 Atovaquon

(Wellvone[®], Bestandteil von Malarone[®])

Bei Atovaquone handelt es sich um ein Hydroxynaphthochinon-Derivat mit Aktivität gegen Pneumocystis, Plasmodien und Toxoplasmen. Als Analogon zu Ubiquinon wirkt es auf die mitochondriale Atmungskette der Parasiten und verhindert durch Blockade der Dehydro-Orotat-Dehydrogenase, eines Schlüsselenzyms der Pyrimidin-Biosynthese, die Bildung von Pyrimidin. Atovaquon ist somit ein Inhibitor der Nucleinsäuresynthese (Mutschler, 2001). Atovaquon zeigte in *in-vitro* und in *in-vivo* Studien Wirkung gegen Tachyzoiten und auch gegen Bradyzoiten und somit auch gegen Zysten (Sordet et al., 1998). Atovaquone erreicht als Monotherapeutikum nicht die antitoxoplasmotische Wirksamkeit der Standardkombination, dafür weist es aber in Kombination mit Pyrimethamin durch synergistische Effekte eine gute Wirksamkeit auf. Diese Kombination wird eingesetzt bei einer Allergie oder Unverträglichkeiten sowohl gegen Sulfonamide als auch gegen Clindamycin.

Gerade für die Therapie bei AIDS-Patienten werden in Atovaquon große Hoffnungen gesetzt. Es zeigt exzellente therapeutische Wirkung im Modell der Reaktivierungstoxoplasmose der Maus, wenn es als Nanosuspension appliziert wird (Schöler et al., 2001, Dunay et al., 2004, siehe auch 2.3.10.1.7).

In klinischen Studien war Atovaquon in 37% der AIDS-Patienten mit Toxoplasma-Enzephalitis, die die Standardtherapie nicht vertrugen, wirksam. Jedoch kam es bei 50% der Patienten nach Absetzen der Therapie zur Reaktivierung.

Es weist eine geringere Nebenwirkungsrate auf als andere Therapeutika und ist auch in hoher Dosierung gut verträglich. Als Nebenwirkungen treten milde allergisch-toxische Hautreaktionen auf (Ruf, 1995).

2 Theoretischer Hintergrund

2.3.10.1.5 Azithromycin

(Ultrreon[®], Zithromax[®])

Azithromycin gehört wie Spiramycin den Makrolid-Antibiotika an. Bisher liegen nur wenige klinische Erfahrungen in der Therapie der Toxoplasmose vor. *In vitro* und im Tiermodell konnte eine Wirkung auf Toxoplasma-Zysten nachgewiesen werden. Somit ist Azithromycin in der Lage, den Parasiten ganz aus der befallenen Person zu eliminieren (Araujo und Remington, 1991). In einigen wenigen berichteten Fällen führte es als Monotherapeutikum sowie in Kombination mit Clindamycin zur klinischen Heilung der HIV-assozierten Hirn-Toxoplasmose (Godofsky, 1994). Daneben ließ sich durch die Kombination mit Pyrimethamin, Sulfadiazin oder Gamma-Interferon eine Wirkungssteigerung erzielen. Weitere Untersuchungen sind jedoch dringend erforderlich.

2.3.10.1.6 Kortikosteroide

(Prednisolon, Methylprednisolon, Prednison)

Kortikosteroide werden in der Toxoplasmose-Therapie als Adjuvans eingesetzt und zwar bei einer konnatalen Hirn-Toxoplasmose mit deutlichen Entzündungszeichen, bei einer Retinochorioiditis mit entzündlichen Begleiterscheinungen und bei einer Hirn-Toxoplasmose mit relevanter Raumforderung (Mittelviehhaus, 1992, Ruf, 1995). Über den genaueren Einsatzbereich gibt es keine einheitlichen Daten.

Zur Dosierung und Therapiedauer liegen keine gesicherten Daten vor. Im Allgemeinen werden 1,5 mg Prednisolon bzw. Methylprednisolon pro kg KG verabreicht, bis die Entzündung rückgängig ist. Im Zusammenhang mit einer zerebralen Toxoplasmose wird eine Gabe von täglich 4 x 4 mg Dexamethason empfohlen. Nach Rückgang der Veränderungen sollte man die Kortikosteroid-Therapie möglichst sofort langsam ausschleichen lassen (Mittelviehhaus, 1992, Ruf, 1995).

2.3.10.1.7 Entwicklung neuer Therapeutika

Da es bei den herkömmlich eingesetzten Medikamenten vor allem bei immunsupprimierten Patienten, wie z.B. nach einer Transplantation zu häufigen und schweren Nebenwirkungen kommt und eine geringe Wirksamkeit oder schlechte Bioverfügbarkeit der alternativen Therapeutika besteht, existiert ein erheblicher Bedarf für neue, weniger toxische Therapeutika. Generell gibt es für die Entwicklung neuer, verbesserter Medikamente zwei Möglichkeiten:

2 Theoretischer Hintergrund

Entwicklung neuer Wirkstoffe oder Entwicklung neuer galenischer Formulierungen von bereits schon bewährten Wirkstoffen.

Durch Oberflächenmodifikationen ist ein gezieltes Targeting der Arzneistoffe wie z.B. in Zellen des RES oder ins Gehirn möglich. Dank des gezielten Lenkens der Arzneistoffe ist es möglich die Dosis zu reduzieren und dadurch die Nebenwirkungsrate zu senken. Da Toxoplasmen intrazellulär vorliegen, kann die Anreicherung der antiparasitikabeladenen Arzneistoffträger in die Zellen des RES gesteigert werden. Eine Alternative zu den partikulären Arzneistoffträgern stellen Antibiotika/Antiparasitika-Nanosuspensionen dar. Bei diesen Suspensionen ist genau wie bei den partikulären Arzneistoffträgern ein Drug Targeting durch Oberflächenmodifikationen möglich. Des Weiteren können Antiparasitika wie z.B. Atovaquon, die in für die i.v.-Applikation zugelassenen Lösungsmitteln nicht löslich sind, so einer i.v.-Verabreichung zugänglich gemacht werden. Bisher wurde nur von Sordet (Sordet et al., 1998) Antiparasitika in kolloidalen Arzneistoffträgern als neue Formulierung zur Verbesserung der Therapie der Toxoplasma-Enzephalitis eingesetzt. Durch die orale Behandlung von Mäusen mit einer akuten Toxoplasmose mit Atovaquon-beladenen Nanokapseln konnte deren Überlebenszeit im Vergleich zu der oralen Gabe einer Atovaquonsuspension verlängert werden.

2.3.10.2 Derzeitige Behandlungsstrategien

2.3.10.2.1 Therapie bei postnatal erworbener Toxoplasmose

Bei immunkompetente Patienten mit einer erworbenen Toxoplasma-Infektion, bei denen keine Komplikationen auftreten, ist in der Regel keine Therapie nötig, da die Infektion in den meisten Fällen symptomlos verläuft. Bei lang anhaltender oder schwerer Symptomatik bzw. Organbeteiligung wie Perikarditis, Myokarditis oder Enzephalitis sollte jedoch eine therapeutische Behandlung eingeleitet werden. Hierbei empfiehlt sich die Standardtherapie aus Pyrimethamin (25-50 mg täglich) und Sulfadiazin (4-6 g täglich in vier Einzeldosen). Für Pyrimethamin wird initial eine „loading dose“ von 100-200 mg empfohlen, obwohl es keinen Beweis für einen Vorteil gegenüber der Standarddosierung von Beginn an gibt.

Die Behandlungsdauer wird mit vier bis sechs Wochen über die Rückbildung der Krankheitszeichen hinaus empfohlen (Ruf, 1995, Montoya und Liesenfeld, 2004).

2 Theoretischer Hintergrund

2.3.10.2.2 Therapie während der Schwangerschaft

Da bei einer Primärinfektion während der Schwangerschaft ein ca. 50%iges Risiko besteht, dass die Erreger diaplazentar übertragen werden, sollte sofort nach der Diagnose der Toxoplasmen-Infektion sowie auch nur beim Verdacht auf eine Infektion eine Therapie eingeleitet werden.

Die Dosierung beträgt 3 g verteilt auf drei Tagesdosen. Die Gabe von Spiramycin sollte während der Schwangerschaft bis zum letzten Tag der 16. Schwangerschaftswoche erfolgen, da zu diesem Zeitpunkt die Organogenese endgültig abgeschlossen ist. Mit dem ersten Tag der 17. Schwangerschaftswoche wird in Deutschland und Österreich zur plazentagängigen Standardtherapie Pyrimethamin (loading dose: 100 mg in zwei Einzeldosen für zwei Tage, anschließend 50 mg pro Tag) /Sulfadiazin (75 mg/kg in zwei Einzeldosen für zwei Tage, anschließend 100 mg/kg KG (max. 4 g) pro Tag in zwei Einzeldosen) und zusätzlicher Folin-säuresubstitution (5-20 mg pro Tag) übergegangen (Montoya und Liesenfeld, 2004). Je nachdem, ob nur eine mütterliche oder auch eine fetale Infektion vorliegt, wird diese Kombination vier Wochen eingesetzt oder bis zur Geburt weitergeführt. In den USA und in Frankreich wird bei einer mütterlichen Infektion die Therapie mit Spiramycin beibehalten. Besteht auch eine fetale Infektion, werden 50 mg Pyrimethamin / 3 g Sulfadiazin pro Tag im täglichen Wechsel mit 3 g pro Tag Spiramycin bis zum Ende der Schwangerschaft verabreicht. Mit der Gabe von Spiramycin soll die Transmission des Erregers verhindert werden und mit der Standardkombination werden die Folgeerkrankungen des Neugeborenen reduziert (Schoondermark et al., 1994, Montoya und Liesenfeld, 2004).

2.3.10.2.3 Therapie der konnatalen Infektion

Bei allen Neugeborenen mit Nachweis oder auch nur mit Verdacht auf eine konnatale Toxoplasmose besteht die Indikation zu einer Therapie. Bei gesunden Neugeborenen von Müttern mit akuter Toxoplasmose während der Schwangerschaft oder mit einem hohen Antikörpertiter wird eine vierwöchige Therapie mit der Standardkombination und Folin-säure oder mit Spiramycin herangezogen. Wird innerhalb dieser vier Wochen eine konnatale Infektion nachgewiesen, wird die Therapie ein Jahr lang weitergeführt. Ruf behandelt konnatal infizierte Neugeborene im ersten halben Jahr mit der Standardtherapie (Pyrimethamin: 1-1,5 mg/kg KG und Sulfadiazin: 100 mg/kg KG) und in der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres mit Pyrimethamin und Sulfadiazin jeweils im vierwöchigen Wechsel mit Spiramycin. Sind zusätzlich

2 Theoretischer Hintergrund

Entzündungszeichen (z.B. Retinochorioiditis) vorhanden, so wird in Ergänzung Kortikosteroide in einer initialen Dosis von 1-2 mg pro kg Körpergewicht gegeben (Ruf, 1995).

Montoya und Liesenfeld empfehlen die Behandlung von Neugeborenen mit konnataler Toxoplasmose mit der Standardkombination aus Pyrimethamin/Sulfadiazin und Folsäure über ein Jahr lang. Dabei wird eine „loading dosis“ von 2 mg/kg Pyrimethamin pro Tag für zwei Tage gegeben und anschließend 1 mg/kg pro Tag für weitere zwei bis sechs Monate. Nach sechs Monaten wird diese Dosierung dreimal wöchentlich weitergeführt. Parallel wird 100 mg/kg Sulfadiazin in zwei Einzeldosen verabreicht. Zur Verhinderung von Knochenmarkschäden erfolgt von Anfang an auch eine Substitution von 10 mg Folsäure dreimal pro Woche. Liegen Entzündungszeichen vor, so empfehlen Montoya und Liesenfeld zusätzlich eine Gabe von 1 mg/kg Prednison verteilt auf zwei Einzeldosen bis die Entzündungszeichen verschwunden sind (Montoya und Liesenfeld, 2004).

2.3.10.2.4 Therapie der HIV-assoziiertes Toxoplasmose

Gerade bei Menschen mit gestörter Immunabwehr treten durch Reaktivierung von Gewebesystemen einer vorausgegangenen latenten Infektion, erneut Krankheitsbilder auf (Reaktivierungstoxoplasmose). Die Toxoplasmose bei HIV-Infizierten äußert sich meist in einer fokalen Enzephalitis und seltener kommt es zu Exazerbationen auch in anderen Organen wie in der Lunge, Herz oder Retina.

Die Behandlung bei AIDS-Patienten besteht in einer Akuttherapie sowie einer lebenslangen Rezidivprophylaxe. Die Dauer der Akuttherapie ist abhängig von der Rückbildungsgeschwindigkeit der zerebralen Läsionen und dauert ca. 4-6 Wochen (Montoya und Liesenfeld, 2004).

Zur Akuttherapie eignet sich laut Montoya und Liesenfeld die Standardtherapie mit Sulfadiazin, Pyrimethamin und Folsäure. Pyrimethamin wird dabei mit einer „loading dose“ von 200 mg und anschließend mit 50-75 mg pro Tag dosiert. Die Tagesdosis von Sulfadiazin liegt zwischen 1 und 1,5 g alle 6 Stunden. Zur Vermeidung von Knochenmarkschäden werden von Therapiebeginn an 10-20 mg Folsäure (bis zu 50 mg) pro Tag substituiert.

AIDS-Patienten entwickeln jedoch häufig Allergien gegen Sulfonamide. Dabei kann es zu hohem Fieber und schweren Hautreaktionen bis hin zum Lyell-Syndrom kommen. In diesen Fällen empfiehlt sich der Austausch von Sulfadiazin mit Clindamycin (600-1200 mg viermal täglich).

Atovaquon in Kombination mit Pyrimethamin oder Sulfadiazin könnte als Alternative zur Standardtherapie bei der akuten Toxoplasmose in Zukunft größere Bedeutung zukommen. Zur

2 Theoretischer Hintergrund

Wirksamkeit bei HIV-assoziiierter Toxoplasmose gibt es allerdings bisher nur wenige Erfahrungen (Kovacs, 1992). Die Wirksamkeit von anderen Arzneistoffen wie Clarithromycin, Azithromycin oder Dapson ist bei immunsupprimierten Personen noch nicht gründlich untersucht.

Anschließend an die Akuttherapie folgt bei AIDS-Patienten eine lebenslange Erhaltungstherapie, da es ansonsten mit größter Wahrscheinlichkeit zu Rezidiven kommt. Die Erhaltungstherapie wird meist wie die Akuttherapie durchgeführt, jedoch nur mit der halben Dosierung (Montoya und Liesenfeld, 2004).