

4 Methoden

4.1 Herstellungsverfahren

4.1.1 Herstellung der Kern-Schale-Nanopartikel

4.1.1.1 Herstellung der Polystyren-Kerne

Nach dem Lösen des Natriumdodecylsulfates, des Borax und des Rhodamin B in Wasser, erfolgt die Zugabe von Ethanol und Styren. Unter Stickstoff-Atmosphäre wird bei einer Geschwindigkeit von 360 U/min 20 Minuten lang gerührt. Anschließend wird der Reaktor auf die Reaktionstemperatur von 80°C aufgeheizt. Nach 30 Minuten bei Reaktionstemperatur wird das Kaliumperoxodisulfat hinzugegeben und somit die Polymerisation gestartet. Die Polymerisationszeit beträgt 6 Stunden bei einer Rührgeschwindigkeit von 360 U/min.

Nach Zugabe des Initiators trübt sich die anfangs fast wasserklare, rötliche Emulsion innerhalb von wenigen Minuten deutlich ein.

Nach dem Abkühlen der Latexdispersion erfolgt die Reinigung durch Dialyse gegen entionisiertes Wasser (Müller et al., 1997). Die Zusammensetzungen der Rezepturen waren so gewählt, dass ca. 200 nm bzw. 130 nm große Kerne erhalten wurden.

Rezeptur für MC80-Kerne:

Reinstwasser (Millipore)	169 ml	
Ethanol	7 ml	
KPS (Kaliumperoxidisulfat)	0,067 g	in 20 ml Reinstwasser
Rhodamin B	0,012 g	
Styren	10,8 g	
SDS	0,1 g	
Borax (Na-tetraborat-decahydrat)	0,027 g	

Bei der Herstellung der kleineren MC81-Kerne werden die Rezepturmengen bei zwei Substanzen verändert:

Styren	12,0 g
SDS	0,3 g

4 Methoden

4.1.1.2 Umhüllung der Kerne mit Polybutylcyanoacrylat

Die Menge an gereinigter Kerndispersion, die einem Gramm Polymer entspricht, wird mit Reinstwasser auf 200 ml aufgefüllt und mit Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Anschließend werden 2 g Poloxamer in der Kerndispersion gelöst und die Dispersion im Kühlschrank kaltgestellt. Die gekühlte Kerndispersion wird in den Reaktor überführt und 5 mg Arzneistoff/g Polymer hinzugegeben. 2 g Butylcyanoacrylat-Monomer werden in ein vorgekühltes Becherglas abgewogen und über einen gekühlten Trichter in den Reaktor gegeben.

Die Polymerisationszeit beträgt vier Stunden bei Raumtemperatur und einer Rührgeschwindigkeit von 400 U/min. Nach der Neutralisation mit Natronlauge erfolgt die Reinigung der Partikeldispersion mittels Dialyse (Scherer, 1992).

Kerne	1 g	Feststoff
Poloxamer	2 g	
Arzneistoff	5 mg	
Butylcyanoacrylat	2 g	
Wasser (pH 2)	ad 200 ml	

Die hergestellten Kern-Schale-Nanopartikel werden in der vorliegenden Arbeit mit MC80-PBCA bzw. MC81-PBCA bezeichnet, wobei die MC80-PBCA-Nanopartikel die größeren darstellen.

4.1.2 Herstellung der Referenz-Kern-Schale-Nanopartikel

4.1.2.1 Polystyren-Kerne mit einer Polymethylmethacrylat-Schale

Die Herstellung der Polystyren-Kerne erfolgt, wie unter 4.1.1.1 beschrieben.

Für die Umhüllung wird eine Menge an Polystyren-Kern-Dispersion verwendet, die 8 g Feststoff entspricht. Zu dieser Dispersion werden SDS, Borax, Arzneistoff und ein Teil des Methylmethacrylat-Monomers zugegeben und drei Stunden bei 45°C und 360 U/min verrührt. Anschließend wird auf 50°C aufgeheizt und die Polymerisation durch Zugabe des KPS gestartet. Nach einer Polymerisationszeit von 4 Stunden wird die Dispersion auf 40°C abgekühlt und die restliche Menge des Methylmethacrylats per Spritzenpumpe zudosiert (0,15 ml/min). Eine Stunde wird die Dispersion bei 40°C weitergerührt und anschließend bei 50°C über

4 Methoden

Nacht auspolymerisiert. Die Reinigung des Latex erfolgt mittels Dialyse über eine Woche (Hergeth et al., 1985).

Kerne	8 g	Feststoff
KPS (Kaliumperoxidisulfat)	0,067 g	in 20 ml Reinstwasser
Methylmethacrylat	2,5 g	
SDS	0,3 g	bzw. 0,2g*
Borax (Na-tetraborat-decahydrat)	0,027 g	
Arzneistoff	8 mg	
Reinstwasser (Millipore)	ad 190 ml	

* 0,3 g bei der Umhüllung von MC81- Kernen und 0,2 g bei MC80-Kernen

In der Spritze: 1,5 g MMA + 8,5 ml Reinstwasser + 10 ml Ethanol

Die hergestellten Kern-Schale-Nanopartikel werden in der vorliegenden Arbeit mit MC80-PMMA bzw. MC81-PMMA bezeichnet, wobei die MC80-PMMA-Nanopartikel die größeren darstellen.

4.1.2.2. Polystyren-Kerne mit einer Polystyren-Schale

Die Herstellung der Polystyren-Kerne erfolgt, wie unter 4.1.1.1 beschrieben.

Für die Umhüllung wurde eine Kern-Dispersionsmenge verwendet, die einer Feststoffmenge von 8 g entspricht. Borax, SDS und Styren-Monomer werden drei Stunden bei 40°C und 360 U/ min im Reaktor verrührt. Anschließend wird auf die Reaktionstemperatur von 50°C aufgeheizt und durch Zugabe von KPS die Polymerisation gestartet. Nach einer Polymerisationszeit von 6 Stunden, wird der Thermostat abgestellt und die Dispersion kühlt über Nacht bei niedriger Rührgeschwindigkeit aus. Die Reinigung des Latex erfolgt mittels Dialyse gegen entionisiertes Wasser.

4 Methoden

Kerne	8 g	Feststoff
KPS (Kaliumperoxidisulfat)	0,067 g	in 20 ml Reinstwasser
Styren	4 g	
SDS	0,3 g bzw. 0,2g*	
Borax (Na-tetraborat-decahydrat)	0,027 g	
Arzneistoff	8 mg	
Reinstwasser (Millipore)	ad 200 ml	

* 0,3 g bei der Umhüllung von MC81- Kernen und 0,2 g bei MC80-Kernen

Die hergestellten Kern-Schale-Nanopartikel werden in der vorliegenden Arbeit mit MC80-PMMA bzw. MC81-PMMA bezeichnet, wobei die MC80-PS-Nanopartikel die größeren darstellen.

4.1.3 Herstellung reiner PBCA-Partikel

Nach dem Lösen der Stabilisatoren in 200 ml Polymerisationsmedium (mit HCl auf pH 2 eingestellt) erfolgt die Zugabe des Butylcyanoacrylat-Monomers. Die Polymerisationszeit beträgt 4 Stunden bei einer Rührgeschwindigkeit von 400 U/min. Es bildet sich langsam eine weiße Dispersion. Nach der Polymerisation wird die Dispersion mit Natronlauge neutralisiert. Anschließend folgt die Reinigung mittels Dialyse (Scherer, 1992).

Butylcyanoacrylat	2 g
Poloxamer 188	0,2 g
Dextran 70.000	2 g
Wasser (Reinstwasser + HCl, pH 2)	ad 200 ml

4.2 Charakterisierung der Nanopartikel

4.2.1 Partikelgrößenmessung mittels dynamischer Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung oder Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist ein oft beschriebenes Standardmessverfahren zur Charakterisierung kolloidaler Systeme (Douglas et al., 1984, Müller, 1991, Müller und Schuhmann 1996). Das Messprinzip beruht darauf, dass das Licht eines Lasers an den Partikeln gestreut und aus den zeitlichen Intensitätsschwankungen die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel ermittelt wird. Die Bewegung der Partikel im Dispersionsmedium erfolgt ungerichtet, wobei kleine Partikel durch die Brownsche Molekularbewegung des Wassers zur schnelleren Bewegung angeregt werden als große Partikel. Mit der PCS können Partikel in einem Größenbereich von ca. 5 nm bis 5 μm erfasst werden. Das Streulicht wird in der Regel in einem Winkel von 90° gemessen (Müller und Schuhmann, 1996). Unter bestimmten Bedingungen, wie dem Vorliegen einer bimodalen Dispersion, sollte eine Mehrwinkelanalyse durchgeführt werden. Das Messergebnis einer PCS ist der mittlere Teilchendurchmesser (*Z-average*) und der so genannte Polydispersitätsindex (PI). Der PI ist ein Maß für die Breite der Verteilung und eine dimensionslose Größe. Er liegt zwischen 0 und 1. In der Praxis wird eine Dispersion mit einem PI bis 0,06 als monodispers bezeichnet. Bei Werten von 0,10 und 0,20 spricht man von einer engen Verteilung, und eine breite Verteilung liegt vor bei Werten zwischen 0,25 und 0,5. Dispersionen mit einem PI über 0,5 gelten als polydispers, und es kann keine Aussage über den Teilchendurchmesser gemacht werden (Müller und Schuhmann, 1996).

Sind die Partikel der Dispersion zu groß oder haben sie nur einen zu großen Dichteunterschied zum Dispersionsmedium, so sedimentieren bzw. rahmen sie auf und sind somit nicht mehr erfassbar. Um eine Mehrfachstreuung zu umgehen, müssen die Proben bis zur schwachen Opaleszenz verdünnt werden.

Die Intensitätsschwankungen des von den Partikeln gestreuten Laserlichtes werden von einem Photomultiplier erfasst und mit Hilfe eines Korrelators ausgewertet. Der Korrelator berechnet eine Autokorrelationsfunktion, die an die theoretische Korrelationsfunktion $g(\tau)$ angepasst wird. Die mathematisch betrachtete Abweichung dieser beiden Funktionen ist der schon erwähnte PI. Bei einer monodispersen Verteilung, die theoretisch einen PI von Null haben müsste, wären beide Funktionen deckungsgleich. Je mehr die Autokorrelationsfunktion von der theoretischen Korrelationsfunktion abweicht, desto größer ist der PI.

4 Methoden

Aus der theoretischen Korrelationsfunktion kann unter der Annahme von kugelförmigen Partikeln der Diffusionskoeffizient berechnet werden. Wird dieser in die Stokes-Einstein-Gleichung eingesetzt, so wird der mittlere Radius (r) bzw. Durchmesser erhalten:

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

r: mittlerer Teilchendurchmesser

k: Boltzmannkonstante

T: absolute Temperatur

η : dynamische Viskosität

D: Diffusionskonstante

Die Messungen wurden an einem Zetamaster S (Malvern Instruments) durchgeführt und bestanden aus jeweils zehn Einzelmessungen. Die Messzeit wurde automatisch an die Probe angepasst.

4.2.2 Partikelladungsbestimmung mittels Zetapotential-Messung

Das Zetapotential ist ein wichtiger Parameter für die physikalische Stabilität von Dispersionen (Müller, 1996a). Es bestimmt das Abstoßungsverhalten von gleichgeladenen Partikeln in der Dispersion. Wird ein bestimmtes Zetapotential unterschritten, so kann dies bei Emulsionen zur Koaleszenz und bei Suspensionen zur Agglomeration oder zur Aggregation führen. Meist besitzen Partikel in Dispersionen eine negative Oberflächenladung (Nernst-Potential). Bei der Ausbildung der elektrolytischen Doppelschicht lagern sich selbst an diese negativen Oberflächen bevorzugt negativ geladene Ionen aus dem Medium an. Dies geschieht, da negative Ionen eine weniger stark ausgeprägte Hydrathülle besitzen als positiv geladenen Ionen. Somit sind negative Ionen weniger stark abgeschirmt, und von der Waals-Wechselwirkungen können sich besser zwischen ihnen und der Partikeloberfläche ausbilden. Durch diesen Adsorptionsvorgang verlieren die negativen Ionen ihre Hydrathülle und bilden als fest fixierte, dehydratisierte Monoschicht die so genannte innere Helmholtzschicht. Die auf die innere Helmholtzschicht folgende Monoschicht besteht aus fixierten, hydratisierten positiven Ionen. Sie wird äußere Helmholtzschicht genannt. An der äußeren Begrenzung der beiden Helm-

4 Methoden

holtzschichten besteht das so genannte Stern-Potenzial. Es beruht also auf zwei fest fixierten Schichten, die nicht abgeschert werden können. Zur Kompensation der negativen Ladungen auf der Partikeloberfläche und des negativen Ladungsüberschusses der inneren Helmholtzschicht umgeben bewegliche Gegen-Ionen in einer diffusen Schicht das Teilchen. Sie besteht aus positiven Gegen-Ionen, deren Konzentration nahe an der Partikeloberfläche sehr hoch ist und mit zunehmendem Abstand abnimmt, während gleichzeitig die Konzentration an negativen Ionen zunimmt. Die Konzentration an negativen Ionen steigt solange an, bis ein Ladungsausgleich erfolgt ist.

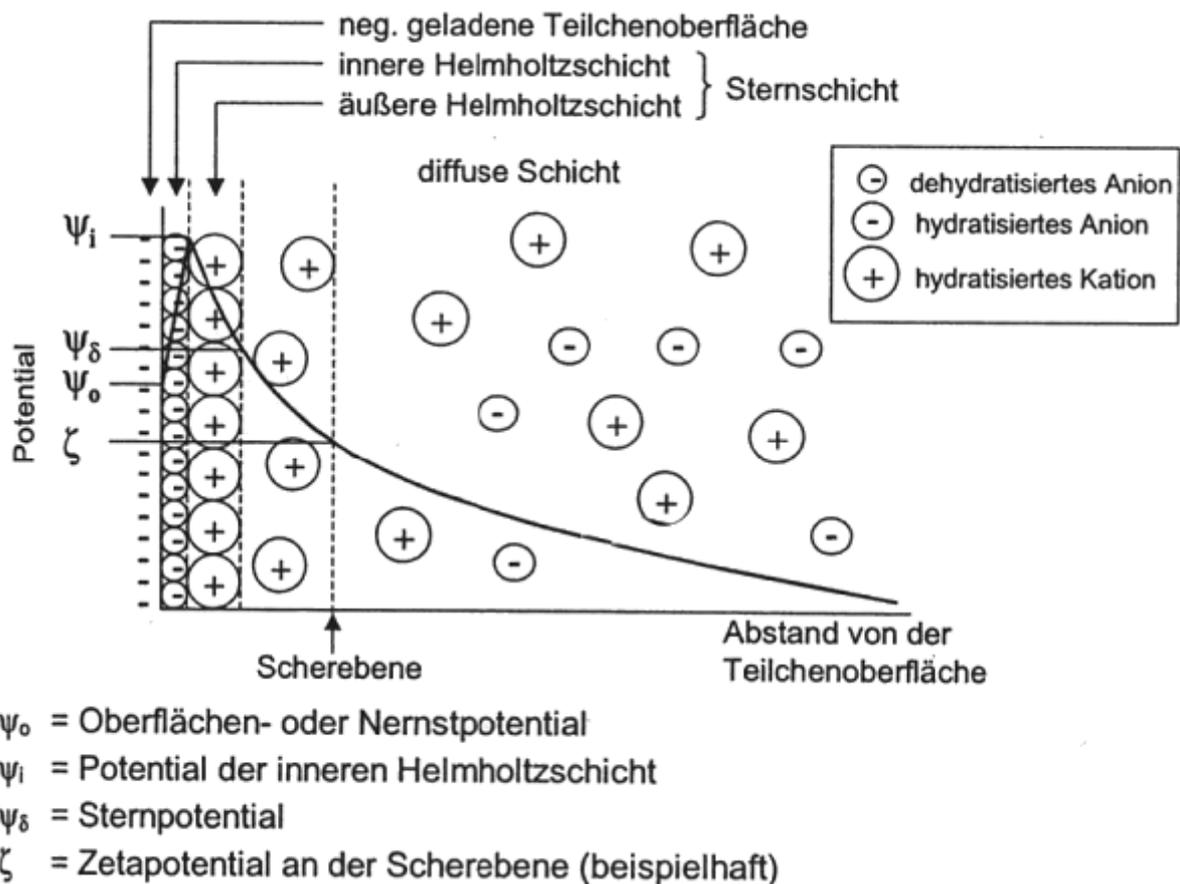


Abb. 4-1 Schematische Darstellung eines dispergierten Teilchens mit negativer Oberfläche in Elektrolytlösung und der daraus resultierende Potentialverlauf nach dem Sternmodell (Müller, 1996a)

Wird an die Dispersion ein elektrisches Feld gelegt, so bewegen sich die Teilchen mit zunehmender Geschwindigkeit zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Die eigentlich neutralen Teilchen bewegen sich zur Elektrode, wenn aufgrund der Feldeinwirkung eine Ladungverschiebung und damit ein Dipol erzeugt wird oder wenn ein Teil der diffusen Schicht durch die

4 Methoden

Diffusionsbewegung abgestreift wird. Ist das angelegte elektrische Feld stark genug, so kann nahezu die gesamte diffuse Schicht abgestreift werden, jedoch nicht die fest fixierte Stern-Schicht. Das Potential, das nach Abstreifen der diffusen Schicht an der Scherebene vorliegt, ist das Zetapotential (ZP). Je größer das Zetapotential eines Partikels ist, desto größer sind die elektrostatischen Abstoßungen zwischen den Teilchen und umso stabiler (kolloidal) ist die Dispersion. Nach Riddick findet ab -31 mV keine Agglomeration der Suspension mehr statt und ab -41 mV spricht man von einer guten Stabilität (Riddick, 1968). Die Messung des Zetapotentials erfolgt über die Laser-Doppler-Anemometrie (LDA). Die LDA ist ein Verfahren zur Bestimmung der Partikelgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld, dem die Streuung von Laserlicht zu Grunde liegt. Passieren Partikel einen Laserstrahl, so streuen sie Licht. Aufgrund des Dopplereffekts kommt es zu einer Frequenzverschiebung des gestreuten Lichtes, die von der Partikelgeschwindigkeit und somit auch von der Ladung der Partikel abhängig ist. Aus der gemessenen Frequenzverschiebung kann die Partikelgeschwindigkeit errechnet werden, aus der wiederum die elektrophoretische Mobilität (Beweglichkeit) errechnet werden kann. Das Vorzeichen der Frequenzverschiebung (gegenüber der eingestrahlenen Lichtfrequenz) bezeichnet die Bewegungsrichtung der kolloidalen Partikel.

$$EM = \frac{v [\mu m / s]}{E [V / cm]}$$

EM = Elektrophoretische Mobilität

v = Teilchengeschwindigkeit

E = elektrische Feldstärke

Die elektrophoretische Mobilität kann mit der Gleichung von Helmholtz-Smoluchowski ins Zetapotential konvertiert werden. Dies war möglich, da in dieser Arbeit mit glatten Kugeln gearbeitet wurde. Je nachdem wie die Partikel geschaffen sind, muss aber das richtige Umrechnungsmodell gewählt werden. Wären die untersuchten Partikel haarige Kugeln gewesen, wäre die elektrophoretische Mobilität mit dem Hairy-Layer-Modell in das Zetapotential umgerechnet worden. Bei Partikeln mit einer geligen Außenschicht würde man mit dem Soft-Particle-Modell arbeiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem Zetamaster S (Malvern Instruments, UK-Malvern) gearbeitet. Die zu untersuchenden Proben wurden verdünnt mit Reinstwasser (Millipore), sowie mit 0,01M und 0,001M NaCl-Lösung.

4 Methoden

Zur Standard-Charakterisierung der Nanopartikel wurden neben den Einzelmessungen auch Zetapotentialmessungen bei abnehmendem pH-Wert (Titrationsen in den sauren pH-Bereich) sowie bei zunehmender Salzkonzentration (Salztitrationsen) durchgeführt (Paulke et al., 1995). Die Titrationsen erfolgten mit einem gekoppelten System aus Zetamaster S und Autotitrator Mettler DL21.

Die pH-Titration begann mit der Einstellung der verdünnten Partikeldispersion auf pH 5. Anschließend wurde mittels 0,1 N Salzsäure in 10 Titrationschritten auf einen pH-Wert von 2,5 titriert.

Bei der Salztitration wurde mit 0,5 N Natriumchloridlösung titriert. Es wurden 15 Titrationschritte ausgeführt, wobei das Anfangsinkrement auf 0,25 ml festgelegt wurde. Der Variationsfaktor der Volumeninkremente betrug 1,2, wodurch sichergestellt wurde, dass das Titrationsvolumen von Schritt zu Schritt entsprechend zunahm.

4.2.3 Oberflächenhydrophobie von Nanopartikeln

Die Hydrophobie der Nanopartikel wurde durch die Adsorption des hydrophoben Tetraiodfluorescein-Farbstoffes Bengal Rosa an die Oberfläche bestimmt.

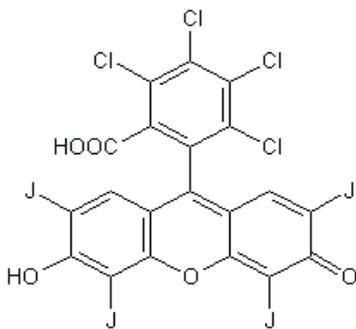


Abb. 4-2 Bengal Rosa (4,5,6,7-Tetrachlor-2',4',5',7'-Tetraiodfluorescein)

Eine Partikelsuspension wird als ein Zweiphasen-System betrachtet, wobei dieses aus der Oberfläche der Partikel und dem umgebenden Dispersionsmedium besteht. Die Verteilung des Farbstoffes zwischen diesen zwei Phasen erfolgt in Abhängigkeit von der Hydrophobie der Partikeloberfläche (Müller, 1991, 1997a).

Es wird von einer konstanten Bengal Rosa-Konzentration (20 mg/ml) und einer ansteigenden Partikelkonzentration ausgegangen. Bei Raumtemperatur werden die Partikel drei Stunden

4 Methoden

lang unter Schütteln mit dem Farbstoff inkubiert und anschließend bei 14.000 U/min abzentrifugiert. Die nicht gebundene Farbstoffmenge wird spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 542,7 nm bestimmt. Die auf der Partikeloberfläche adsorbierte Menge an Bengal Rosa ergibt sich aus der Differenz der Konzentration der ursprünglich eingesetzten Bengal Rosa-Lösung und der Konzentration im Dispersionsmedium. Die Verteilung zwischen dem Dispersionsmedium und der Partikeloberfläche gibt der so genannte Verteilungskoeffizient (Q) an.

$$Q = \frac{\text{Bengal- Rosa - Konzentration auf der Partikeloberfläche}}{\text{Benal- Rosa - Konzentration im Dispersionsmedium}}$$

Der Verteilungskoeffizient wird als Funktion der mit Farbstoff besetzten Partikeloberfläche zur jeweiligen Partikelkonzentration aufgetragen. Die Steigung der sich ergebenden Geraden ist das Maß für die mittlere Oberflächenhydrophobie. Je stärker die Steigung ist, desto höher ist die Oberflächenhydrophobie der Nanopartikel.

4.2.4 Bestimmung der Oberflächenladungsdichte

Die Bestimmung der Oberflächenladungsdichte erfolgte mittels eines Partikelladungsdetektors (PCD). Dieses Gerät (PCD-03pH, MUETEK, Germany) besteht aus einer zylindrischen Messzelle aus Teflon, in der sich zwei Goldelektroden befinden. In der Messzelle bewegt sich ein Kolben, der ebenfalls aus Teflon besteht. Um zu verhindern, dass bereits in der Messzelle adsorbierte Ionen das Messsignal verfälschen, muss diese vor und nach jeder Messung gründlich gereinigt werden. In die Meßzelle werden mit Reinstwasser verdünnte Dispersionsproben abgestufter Partikelkonzentration mit einem Feststoffgehalt unter 1% gegeben. Dabei müssen beide Goldelektroden mit der Flüssigkeit bedeckt sein (mind. 10 ml). Der Kolben wird in die Messzelle eingebracht und mittels eines mechanischen Antriebs definiert mit einer festen Frequenz geschert. Der sich bewegende Kolben bewirkt eine oszillierende Flüssigkeitsströmung innerhalb der Probe. Dabei wird die diffus um die Partikel liegende Ionenschicht definiert abgeschert, und es kommt zu einer Verschiebung der Ionenwolke um die geladenen Partikel. Das hierbei entstehende Potential wird an den Goldelektroden als Strömungspotential erfasst. Durch das Vorzeichen ist erkennbar, ob die dispergierten Teilchen negativ oder positiv geladen sind. Zur Bestimmung der Oberflächenladungsdichte wird ein entgegengesetzt geladener Polyelektrolyt-Standard mittels Autotitrator (Titrino 716, Metrohm, Schweiz) hinzutitriert,

4 Methoden

der die Ladungen der Partikel kompensieren kann. Die Titration zur Ladungsneutralisation erfolgte mit 0,1 mmol Poly(diallyldimethylammonium)chlorid (Poly-DADMAC).

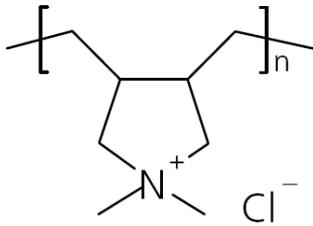


Abb. 4-3 Strukturformel von Poly-DADMAC

Aus dem Verbrauch der Polyelektrolytlösung lässt sich die Oberflächenladungsdichte in $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ berechnen. Man titriert eine Konzentrationsreihe der Partikeldispersionen, um über die Regression Störeffekte, wie die Adsorption des Polyelektrolyten auf der Teflonoberfläche oder die Sättigung des Probenvolumens mit Titrationsmittel, zu eliminieren. Im Idealfall wird so nur noch die Wechselwirkung mit der Probe betrachtet.

4.2.5 Degradation der Nanopartikel

4.2.5.1 Spektralphotometrische Untersuchung des enzymatischen Abbaues

Die UV/Vis - Spektroskopie gehört zu den Elektronenanregungsspektren. Die Strahlungsenergie des sichtbaren (Vis) und ultravioletten (UV) Lichtes reicht aus, um die molekulare (oder atomare) Elektronenhülle anzuregen. Dabei werden vom Molekül Teile der UV/Vis Strahlung absorbiert. Moleküle, die im Vis-Bereich absorbieren, erscheinen farbig. Um Strahlung im UV/Vis Bereich zu absorbieren, benötigt ein Molekül ungesättigte Bindungssysteme (chromophore Gruppen).

Der Bereich der UV-Spektren erstreckt sich von ca. 190 bis 350 nm und der der Vis-Spektren von ca. 400 bis 800 nm. Für die Aufnahme der Spektren wird eine, in einem geeigneten Lösungsmittel, gelöste Substanz in den Strahlengang eines Spektrometers (Cary 1 UV-Visible Spektrophotometer, Varian, Darmstadt) eingebracht. Eine Lichtquelle (Deuterium- für UV, Halogen- für Vis) strahlt polychromatisches Licht aus, woraus durch einen Monochromator Licht der gewünschten Wellenlänge herausgefiltert wird. Dieses durchdringt die Probe, welche einen Teil des Lichtes absorbiert, wodurch eine Intensitätsverringering stattfindet. Die Absorption der eingestrahnten UV/VIS-Strahlung durch den Analyten ergibt sich aus der Rela-

4 Methoden

tion der Strahlungsintensität mit und ohne Probendurchgang. Nach dem Gesetz von Lambert und Beer gilt folgender Zusammenhang zwischen der Konzentration (c) des gelösten Stoffes und der Absorption (A):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A : Absorption, $A = \log(I_0/I)$

ε : molarer Absorptionskoeffizient, eine für die Substanz spezifische Naturkonstante

c : Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in der Probelösung

d : Schichtdicke der Küvette

Das Lambert-Beersche Gesetz beschreibt die Beziehung zwischen Absorption, durchstrahlter Schichtdicke und Konzentration einer Lösung. Es sagt aus, dass die Lichtabsorption proportional der molaren Konzentration c und der Schichtdicke d ist.

Durchführung:

Mit einer 0,005%igen Kochsalz-Lösung wurden die Partikeldispersionen auf 0,05% und die Schweineleberesterase auf 0,2% verdünnt. Für jede Probe wurden 3 ml der verdünnten Latexdispersion mit 0,5 ml Schweineleberesterase bzw. Zellesterase angesetzt. Die Detektion des enzymatischen Abbaus erfolgte spektralphotometrisch, indem die Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm über 960 min bei 37°C gemessen wurde.

4.2.5.2 Alkalische Hydrolyse

Der hydrolytische Abbau der Partikel wurde mit Natronlauge durchgeführt. Dabei wurden unverdünnte Partikeldispersionen in einem Verhältnis von 1 : 1 mit 1 bzw. 2 N NaOH versetzt. Zur Erkennung des Abbaus, also der Erosion der Partikel, wurden die Proben nach einer Lagerzeit von einem, drei und sieben Tagen mittels PCS vermessen. Die Ergebnisse wurden mit den Ausgangsgrößen der Partikel verglichen.

4.2.6 Wirkstoff-Gehaltsbestimmung

4.2.6.1 HPLC-Analytik

Die HPLC-Analytik wurde an einer Kontron-Anlage (Kontron-Instruments, D-Neufahrn) durchgeführt; die Auswertung erfolgte mit der Software „Kroma System 2000“.

Zur Probenaufbereitung wurde eine genau abgemessene Probenmenge zweimal 30 min bei 15.000 U/min zentrifugiert (Biofuge 22R Heraeus, D-Hanau) und die Überstände abgenommen und vermessen.

4.2.6.1.1 Pentamidin

Für die Gehaltsbestimmung des Pentamidins wurde eine „Supersphere 100 RP18“-Säule verwendet. Bei dem verwendeten Fließmittel handelte es sich um eine Mischung aus 0,025 molarem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (pH = 3,2) und Acetonitril (60 : 40). Das Injektionsvolumen betrug 20 µl, und es wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min gearbeitet. Die Retentionszeit für Pentamidin betrug $3,79 \pm 0,3$ min.

4.2.6.1.2 Spiramycin

Die für die Gehaltsbestimmung des Spiramycins eingesetzte HPLC-Säule war eine Nucleosil 100 RP18. Das verwendete Fließmittel bestand aus einem 0,02 molarem Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer (pH 7) und Methanol im Verhältnis 20 zu 80. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl und es wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min bei 35°C gearbeitet. Die Retentionszeit für Spiramycin betrug $8,46 \pm 0,5$ min.

4.2.7 Absättigung der Nanopartikel mit Proteinen

4.2.7.1 Absättigung mit Antikörpern

Die Absättigung der Nanopartikel mit Antikörpern erfolgte durch eine Inkubation von Partikeln mit Patientenserum, das einen positiven Titer gegen Toxoplasmen hatte. Die Inkubation erfolgte in einem Verhältnis von eins zu eins über 24 Stunden bei 8°C.

4.2.7.2 Absättigung mit Rinderserumalbumin

Für die Absättigung der Nanopartikel mit Rinderserumalbumin (RSA) wurde eine Lösung von 250 mg (RSA; Sigma, D-Taufkirchen) in 10 ml destilliertem Wasser angesetzt. Die Inkubation der Partikel erfolgte im Verhältnis von eins zu eins über 24 Stunden bei 8°C.

4.2.7.3 Absättigungsrate mit Proteinen

Um eine Aussage machen zu können, in welchem Ausmaß die Nanopartikel mit Rinderserumalbumin und Antikörpern beladen wurden, wurde die Beladungsrate bestimmt.

Dazu wurde für Rinderserumalbumin sowie für die Antikörper eine Eichgerade gemessen.

Die über 24 Stunden abgesättigten Partikel wurden eine Stunde bei 14000 U/min zentrifugiert und die Überstände spektralphotometrisch vermessen. Die auf der Partikeloberfläche adsorbierte Menge an Proteinen ergibt sich aus der Differenz der Konzentration der ursprünglich eingesetzten Protein-Lösung und der Konzentration im Dispersionsmedium.

4.2.8 Zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE)

Mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteingemische durch zwei aufeinander folgende, voneinander unabhängige, Schritte aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgt die Trennung nach dem isoelektrischen Punkt (isoelektrische Fokussierung), mit der zweiten Dimension folgt dann eine Separierung nach der molekularen Masse in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE). Nach den Auftrennungen schließen sich eine Silberfärbung und die Auswertung an. Für eine ausführliche Darstellung der Methoden sei auf die Dissertation von Herrn Göppert (2005) verwiesen.

4 Methoden

Die 2D-PAGE hat zwei Vorteile gegenüber anderen Proteinelektrophoretetechniken. Zum einen die hohe Auflösung, die durch zwei unabhängige, hintereinander geschaltete Trennverfahren erreicht wird. Somit ist die Co-Migration, wie sie bei der 1D-Elektrophorese auftreten kann, ausgeschlossen. Zum anderen können einige Hundert bis Tausend (je nach Geldimension) verschiedene Proteine gleichzeitig aufgetrennt werden.

4.2.8.1 Erste Dimension: isoelektrische Fokussierung

Die erste Dimension bei der 2D-PAGE ist eine isoelektrische Fokussierung. In einem pH-Gradienten bewegt sich jedes Proteinmolekül zu der Stelle, die seinem isoelektrischen Punkt (pI) entspricht, d.h. sie fokussieren (konzentrieren sich) an dieser Stelle. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ist jener pH-Wert, an dem seine Nettoladung null ist. Wenn Proteine durch einen pH-Gradienten bewegt werden, dann ändert sich die Ladung je nach pH der Umgebung. Proteine sind bei pH-Werten unter ihrem pI positiv und bei pH-Werten über ihrem pI negativ geladen. Dadurch geraten die Proteine sobald sie sich von ihrem pI entfernen, wieder unter den Einfluss des elektrischen Feldes und bewegen sich zu ihrem Fokussierungspunkt zurück. Für die vorliegende Arbeit wurden immobilisierte pH-Gradienten (Immobiline DryStrips), bei denen die Ladungsträger kovalent an das Polyacrylamidgel gekoppelt werden, mit einem nichtlinearen Gradienten von pH 3-10 verwendet. Der pH-Gradient verläuft im neutralen Bereich flacher, da die meisten physiologischen Proteine in diesem Bereich ihren isoelektrischen Punkt besitzen und so die Auflösung verbessert werden kann.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit einem Multiphore II-Gerät (Amershan Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und einem Gesamtvoltstundenprodukt von 20 kWh. Als Spannungsquelle kam ein Netzgerät der Firma Consort (Turnhout, Belgien) zum Einsatz.

4.2.8.2 Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese

Während der 2. Dimension werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Hierbei handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren. Die Proteine wandern während der Elektrophorese bis zu dem Punkt, an dem sie wegen ihrer Größe an den Poren hängenbleiben. Durch Inkubation der Proteine mit SDS und S-S-reduzierenden Mitteln werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine; die stark negative Ladung von SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, so dass in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind. Das Laufverhalten in der Gelelektrophorese wird jetzt nur noch durch die Molekülgröße bestimmt. Im engen Maschenwerk

4 Methoden

des polymeren Gels bewegen sich bei der Auftrennung kleine Proteine schneller als große Proteine.

4.2.8.3 Auswertung von zweidimensionalen Gelen

Die Auswertung von 2-DE Gelen kann digital mit Hilfe einer Auswertesoftware für 2-DE Gele durchgeführt werden. Dabei werden die Gele nach ihrer Entwicklung mit einem Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotec, Uppsala, Schweden) gescannt und mittels der Software MELANIE III (**M**edical **E**lectrophoresis **A**nalysis **I**nteractive **E**xpert System, BioRad, D-München) ausgewertet.

4.3 Mikrobiologische Methoden

Alle Kulturen wurden bei 37°C in einem Brutschrank in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilwerkbank unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Zellkulturabfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert. Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden mit zehn Prozent fetalem Kälberserum supplementiert, das vor Verwendung für 30 min auf 56°C erhitzt wurde, um Komplementproteine zu inaktivieren.

4.3.1 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie (Flow Cytometry, FACS = Fluorescence Activated Cell Scanner) ist ein optisches Meßsystem zur Analyse der im Flüssigkeitsstrom fokussierten Zellen. Der Name der Durchflußzytometrie ergibt sich daraus, dass die zu untersuchenden Zellen einzeln hintereinander an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet werden. Dies geschieht dadurch, dass dem schnell fließenden Transportstrom, der eine laminare Strömung darstellt, in einer Düse der langsam fließende Probenstrom zugemischt wird. Dieses Prinzip wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet (Abb. 4-4).

Die Durchflußzytometrie erlaubt die simultane Bestimmung mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter von lebenden Zellen. Diese physikalischen Eigenschaften sind relative Größe, Granularität (innere Struktur) und Fluoreszenzintensität. Das Prinzip der FACS-Messungen beruht auf der Lichtstreuung und auf der Fluoreszenzemission.

Das optische System besteht bei dem benutzten FACScan aus einem luftgekühlten Argon-Laser mit 15 mW Leistung, der monochromatisches Licht bei 488 nm emittiert.

Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren bestehen, desto größer ist das entstehende Streulicht. Somit erhält man durch Messung dieses Streulichts auf einfache Weise wichtige Informationen über die Zelle. Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen. Je nachdem, in welchem Winkel man das Streulicht misst, erhält man unterschiedliche Informationen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter Channel) hängt vor allem von der Größe einer Zelle ab. Das heißt, kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter Channel, Messung in einem Winkel von 90°) ist sensitiv für den Refraktionsindex und gibt Informationen über die Zelloberfläche oder die Zellgranularität.

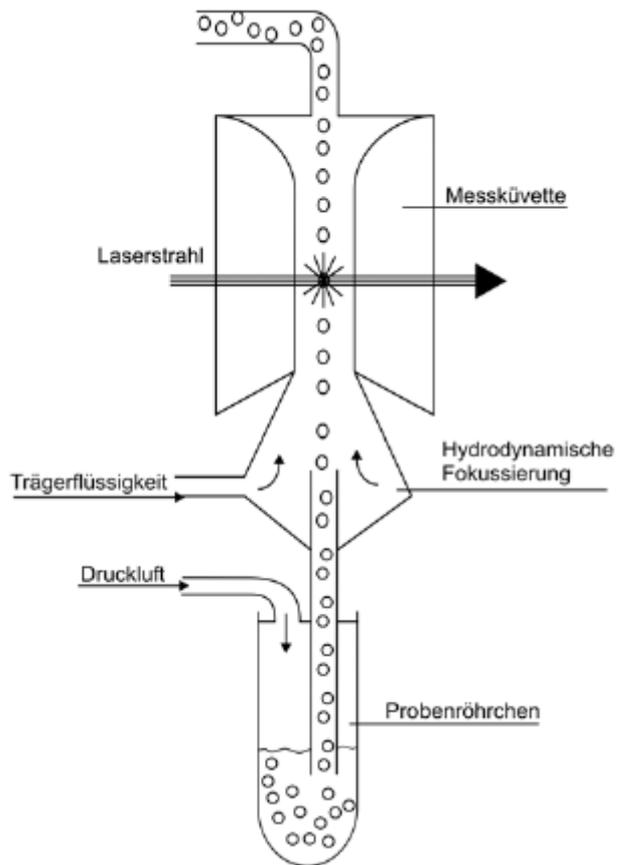


Abb. 4-4 Prinzip der Durchflusszytometrie (Betriebsanleitung des FACScan®) Zu analysierende Zellen werden durch Trägerflüssigkeit stabilisiert und gelangen zum Analysepunkt, wo Licht- und Flüssigkeitsstrahl sich kreuzen (hydrodynamische Fokussierung)

Das Laserlicht, das durch die vorbeifließende Zelle gestreut wird, gelangt dann zu einem Detektorsystem aus Bildverstärker-Bauelementen. Das eingehende Signal wird über einzelne Verstärker geregelt und zu einem Analog-Digital-Wandler geleitet. Dieser konvertiert die in Volt registrierten Signalintensitäten für jeden Meßparameter in eine Klassenzahl (Kanalzahl). Der FACScan arbeitet mit 1024 Kanälen. Die Verstärkung kann linear oder logarithmisch erfolgen. Die digitalisierten Daten werden dann mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogramms im Computer ausgewertet.

Neben dem Streulicht erfasst das Durchflußzytometer auch die Fluoreszenzemission jeder einzelnen Zelle. Trifft der Laserstrahl auf mit Fluorochromen markierte Zellen oder Nanopartikel, kommt es zur Anregung der fluoreszierenden Verbindung und zur Emittierung eines für das Fluorochrom charakteristischen Fluoreszenzlichtes. In dieser Arbeit wurde mit einem

4 Methoden

Argon-Laser-FACS gearbeitet (Emissionswellenlänge 488nm). Daher konnten nur in diesem Bereich absorbierende Fluorochrome registriert werden. Zum Erhalt eines möglichst starken Signals sollte das Absorptionsmaximum bei 488 nm liegen. Um eine Unterscheidung der Fluorochrome durch das Gerät zu ermöglichen, muss neben dem gemeinsamen Anregungsbereich um 488 nm eine deutliche Unterscheidung der Emissionsmaxima gewährleistet sein. Als Fluorochrome wurden in dieser Arbeit sowohl GFP (Emissionsmaximum 530 nm) als auch Rhodamin B (Emissionsmaximum 584 nm) verwendet.

Zur Detektion der unterschiedlichen Fluoreszenzspektren wird das Licht durch unterschiedliche Filter geleitet, in einem Fotoelement verstärkt und in elektronische Signale umgewandelt. Die gemessenen Signale können dabei entweder linear oder logarithmisch verstärkt werden. Wie auch beim Streulicht werden bei der Fluoreszenzmessung zur Datenaufnahme die registrierte Signalintensität für jede gemessene Eigenschaft mittels eines Analog- / Digitalumwandlers einer bestimmten Kanalzahl zugeordnet.

Tab. 4-1 In der Arbeit genutzte Einstellung der Detektoren des Durchflußzytometers (FSC = Vorwärtsstreulicht, SSC = Seitwärtsstreulicht, FL1 = Grünfluoreszenz, FL2 = Orangefluoreszenz)

Detektor	Einstellung	Modus
FSC	E00	Log.
SSC	319 Volt	Log.
FL1	613 Volt	Log.
FL2	628 Volt	Log.

Parameter, die einen hohen Empfindlichkeitsbereich erfordern, sollten im logarithmischen Modus gemessen werden, da Signale mit geringer Intensität hierbei gespreizt und mit höherer Intensität gestaucht werden. Da sowohl Parasiten als auch Nanopartikel kleine Zellen und damit schwache Signale darstellen, wurde für die Einstellung von FSC und SSC der logarithmische Modus gewählt. Die Verstärkung der Fluoreszenzen erfolgte ebenfalls logarithmisch, da sich hier die Populationen um mehrere Größenordnungen voneinander unterscheiden können, und der Meßbereich im logarithmischen Modus größer als im Linearmodus ist.

Im Versuch erfolgte der Einsatz eines FACScan Gerätes der Firma Becton Dickinson (D-Heidelberg). Die Auswertung der Versuche wurde durchgeführt mit Hilfe der CellQuest[®] Software.

4 Methoden

4.3.1.1 Probenvorbereitung und Messung der Zellen im Durchflußzytometer

Die Probenvorbereitung für die FACS-Messungen begann mit einem Mediumswechsel bei den J774-A1 Makrophagen. Anschließend wurde der Zellrasen vorsichtig mit dem Zellschaaber abgelöst und die Zellenzahl pro Milliliter mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde mit frischem Medium auf ca. $1,36 \times 10^5$ Zellen pro Milliliter eingestellt. Von dieser eingestellten Zellsuspension wurden je 1 ml in jedes Well einer 24-Lochplatte gegeben. Die Anzahl der eingesetzten Toxoplasmen wurde ebenfalls mittels der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt und je 1 ml der Toxoplasmen-Suspension zu den Makrophagen in die Wells gegeben. Nach der Infektion erfolgte die Behandlung mit den Nanopartikeln.

Für jede Probe wurden gleiche Ansätze in dreifacher Ausführung für drei nachfolgende Tage vorbereitet. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug drei Tage.

Am jeweils 1., 2. und 3. Tag konnten von jeder Probe ein Milliliter abgenommen werden, und es erfolgte eine Fixation mit Hilfe von 100 µl Paraformaldehyd (2%ig). Mit der Zentrifuge (Megafuge 1.0 Fa. Hereus Sepatech) wurden Zellen und freie Toxoplasmen bei einer Geschwindigkeit von 2.000 U/min über fünf Minuten zentrifugiert. Um die Suspension einzuzengen, wurden je 600 ml des Überstandes verworfen.

In diesem Zustand konnten die Proben entweder sofort mittels des FACS vermessen werden oder zum späteren Messen für einige Tage im Kühlschrank gelagert werden.

Unmittelbar vor der Messung wurden zu jeder Probe 25 µl der „Perfect Counting Beads“ (siehe 4.3.1.1.1) hinzugegeben. Die Einstellungen am FACS wurden so gewählt, dass bei jeder Probe 10000 Ereignisse wie Zellen, Toxoplasmen und Perfect Counting Beads, die durch ihre Größe und Granularität definiert waren, erfasst wurden.

Die Reinigung und Dekontamination des FACS erfolgte durch Spülung mit FACS-Safe Lösung (1% aktives Chlor, Becton Dickinson, D-Heidelberg).

4.3.1.1.1 Perfect Counting Beads

Perfect Counting Beads (PCB) sind standardisierte, fluoreszierende, nicht abbaubare Nanopartikel, die in einem Rinderserumalbumin enthaltendem Medium suspendiert sind. Sie werden von der Firma Caltag Laboratories (USA-Burlingame) vertrieben.

Mit den Perfect Counting Beads ergibt sich die Möglichkeit, die absolute Anzahl von Zellen in einer Probe zu bestimmen. In diesem Experiment wurden die Makrophagen und die freien

4 Methoden

Toxoplasmen, zusammen mit den Perfect Counting Beads bei der Messung erfasst und die absolute Anzahl pro Milliliter konnte errechnet werden

Es wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Absolute Zellzahl} / \mu\text{l} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten PCB}} * \text{Anzahl der eingesetzten PCD} / \mu\text{l}$$

4.3.1.1.2 Lebend-Tod-Farbstoff

Um die Beeinflussung der Partikel auf die Zellen bewerten zu können, wurde mit einem Lebend-Tod-Farbstoff gearbeitet. Dieses erfolgte mit dem LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (L-7012, Molecular Probes), einem Zweifarbstoffgemisch aus Syto[®] 9 (grünfluoreszierend) und Propidiumjodid (rotfluoreszierend). Mit diesen Farbstoffen war es möglich, intakte und membrangeschädigte Makrophagen zu unterscheiden, da sie unterschiedliche Fähigkeiten in der Membrandurchlässigkeit aufwiesen. Syto[®] 9 war in der Lage sowohl intakte, als auch zerstörte Zellmembranen zu durchdringen, während Propidiumjodid nur in membranalterierte Zellen gelangen kann. Die unterschiedlichen Emissionsmaxima der Farbstoffe ermöglichten, die Fluoreszenz in verschiedenen Kanälen (FL1, FL3) des Durchflußzytometers zu messen und so innerhalb einer Zellpopulation gesunde (grünfluoreszierende) und geschädigte (rotfluoreszierende) Zellen zu unterscheiden.

4.3.2 Mikroskopie und Fotografie

Zur Beurteilung der Infektion und des Behandlungserfolges wurde neben den FACS-Messungen auch ein Epifluoreszenzmikroskop (Axioskop) der Firma Zeiss(D-Göttingen) verwendet. Das Mikroskop besitzt als Lichtquelle eine 50 W-Hochdruck-Quecksilber-Lampe. Für die Analyse der Grün- und Rotfluoreszenz wurden die Engband-Filter HG-F41-007 und HQ-F41-001 (AHF Analysentechnik) eingesetzt. Bei Aufnahmen einer 1000fachen Vergrößerung wurde Immersionsöl benutzt, um eine bessere Auflösung zu erzielen. Die Bilder wurden mit der integrierten Zeiss Kamera aufgenommen. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der Axiovision 3.1-Software (Zeiss).

4.3.5 Statistik

Die nach der durchflußzytometrischen Analyse gewonnenen Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je drei Proben dargestellt. Zur Prüfung, ob zwischen den Mittelwerten ein signifikanter Unterschied vorliegt, wurde der t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde für alle Ergebnisse bei $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat (SPSS Inc., Software, Chicago, Il, USA).