

# 5. Ergebnisse und Diskussion

## 5.1 Kern-Schale-Nanopartikel

Ein Ziel dieser Arbeit war, ein geeignetes Trägersystem herzustellen, um einen Arzneistoff direkt in infizierte Makrophagen transportieren zu können. Da Nanopartikel schon in vielen Versuchen erfolgreich zu diesem Zwecke eingesetzt werden konnten, wurden sie auch in dieser Arbeit verwendet. Während in den meisten zurückliegenden Studien mit homogenen Nanosphären gearbeitet wurde, kamen hier Kern-Schale-Systeme mit arzneistofffreien Kernen mit einer arzneistoffhaltigen Schale zum Einsatz.

Vorversuche mit reinen Polystyren-Nanopartikeln, die in der Literatur schon oft als Modellpartikel eingesetzt wurden, ergaben, dass sie auch für die anstehenden Versuche geeignet waren. Überlegungen zur Inkorporation eines Arzneistoffes in das Trägersystem führten zum Konzept einer Umhüllung der stabilen, nicht-abbaubaren Modellpartikel mit einer arzneistoffhaltigen, degradablen Schale.

Neben Kern-Schale Partikeln, die aus einem Polystyren-Kern und einer Polybutylcyanoacrylat-Schale bestanden, wurden in späteren Versuchen auch Kern-Schale-Partikel aus einem Polystyren-Kern und einer Polymethylmethacrylat- bzw. Polystyren-Schale untersucht. Sie wurden als so genannte Referenzpartikel hergestellt, um die Wirkungen der „Standard-Partikel“ aus Polystyren-Kern und PBCA-Schale besser beurteilen zu können.

### 5.1.1 Herstellung und Partikelgröße

#### 5.1.1.1 Polystyren-Kerne

Die Herstellung der Polystyren-Kerne erfolgte mittels radikalischer Polymerisation. Durch das Einsetzen unterschiedlicher Monomer- und Tensidmengen konnten zwei verschieden große Polymerkerne gewonnen werden. Die Messung der Partikelgröße und des Polydispersitätsindex erfolgte mittels der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS):

MC80c: 203,0 nm    PI: 0,042

MC81c: 133,1 nm    PI: 0,065

c = core

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Die relativ niedrige kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) des bei der Polymerisation eingesetzten Tensides Sodiumdodecylsulfat (SDS) von etwa 0.9g/l in Reinstwasser bei 25°C bedeutet eine hohe Grenzflächenaktivität und einen starken Einfluss auf die Endteilchengröße eines Latex. Der CMC-Wert eines Tensides beschreibt die Tensidkonzentration oberhalb der die Oberflächenspannung von Wasser nicht weiter abnimmt. Auf der hydrophoben Teilchenoberfläche adsorbiertes SDS bewirkt eine elektrostatische Stabilisierung der Nanopartikel.

Ein grundlegender Zusammenhang zur Beschreibung einer klassischen Emulsionspolymerisation lautet:

$$[E] \sim [N] \quad (1)$$

E = Emulgatorkonzentration

N = Partikelkonzentration

Für die Partikelkonzentration gilt:

$$N = \frac{V_p}{v} \quad (2)$$

$V_p$  = gesamtes Polymervolumen

$v$  = Volumen eines Partikels ( $v = \pi / 6 * D^3$ )

Durch Einsetzen der Formel des Volumens eines einzelnen Partikels in die Formel für die Teilchenkonzentration ergibt sich für N folgender Zusammenhang:

$$N = \frac{6 * V_p}{\pi * D^3} \quad (3)$$

Es lässt sich daraus ableiten, dass die Emulgatormenge [E] umgekehrt proportional zum Partikeldurchmesser ist. Für die Herstellung der kleineren Nanopartikel wurde daher eine größere Tensidmenge eingesetzt als zur Herstellung der größeren Polymerkerne.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

### 5.1.1.2 Umhüllung der Kerne

Die Umhüllung der Polystyren-Kerne mit Polybutylcyanoacrylat (PBCA) erfolgte mittels Saftpolymerisation. Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus war eine anionische Polymerisation, gestartet durch Hydroxidionen. Die Arzneistoffe wurden dabei der Saadispersi- on zugesetzt, so dass sie während der anionischen Polymerisation in die wachsende Schale mit eingebaut wurden. Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte wieder mit Hilfe der dy- namischen Lichtstreuung, und die Resultate wurden in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

**Tab. 5-1** PCS-Daten der mit PBCA umhüllten Polystyren-Kerne (c = core, cs = core- shell, oA = ohne Arzneistoff). Zum Vergleich werden auch die Größen der Kerne erneut aufgeführt.

	MC80c	MC80cs PBCA			MC81c	MC81cs PBCA		
		oA	Pentamidin	Spiramycin		oA	Pentamidin	Spiramycin
<b>Größe (nm)</b>	203,6	280,8	288,2	303,9	133,1	213,4	222,1	198,1
<b>PI</b>	0,042	0,049	0,082	0,036	0,065	0,046	0,071	0,04

Bei den größeren MC80c-Nanopartikeln erfolgte durch die Umhüllung der Kerne ein Größen- zuwachs von 37 bis 49%. Der Größenzuwachs der kleineren MC81c-Partikel lag zwischen 48 und 67%. Eine gleiche Hüllmasse führt auf den größeren Kugeln schon aus geometrischen Gründen zwangsläufig zu einem geringeren Durchmesserzuwachs.

Die Umhüllung der Polystyren-Kerne mit einer Polystyren (PS)- bzw. Polymethylmethacrylat (PMMA)-Schale erfolgte ebenfalls mittels der Saftpolymerisation. Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus war hierbei aber eine radikalische Polymerisation. Da bei den ersten Umhüllungsversuchen mit PS und PMMA nur unzureichende Schalendicken erreicht werden konnten bzw. Partikelneubildung festgestellt wurde, mussten Modifikationen bei den Ver- suchsbedingungen durchgeführt werden.

Die Kerndispersionen wurden, wie bei der Umhüllung mit PBCA, vorgelegt, dann jedoch drei Stunden im Reaktor bei 40°C mit dem jeweiligen Monomer gequollen.

Durch diese Quellung konnten die während der Herstellung bei 80°C entstandenen, ausgehär- teten Kerne in ihrer inneren Struktur offenbar wieder etwas aufgelockert und damit für eine Monomeraufnahme zugänglich gemacht werden. Während wachsende Polymerketten bei der Aufpolymerisation der Schale auf die Kerne nicht an weitgehend glasartige Oberflächen ad- sorbieren konnten, gelang dies hingegen bei Kernen mit einer eher amorphen Oberfläche.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Eine weitere Änderung der Versuchsbedingungen bestand darin, dass die Polystyren-Kerne nach der Polymerisation, während des Abkühlens mit verringerter Geschwindigkeit weiter gerührt wurden. Dadurch härteten die Kerne nicht so stark aus und blieben folglich noch etwas weicher, wodurch später die Umhüllung erleichtert wurde. Zusätzlich wurde die Zeit in der Dialyse von einer Woche auf zwei Tage reduziert, um nicht sämtliches Tensid abzuwaschen.

**Tab. 5-2/3** PCS-Daten der mit PMMA bzw. PS umhüllten Polystyren-Kerne (cs = core-shell, oA = ohne Arzneistoff). Zum Vergleich werden auch die Größen der Kerne erneut aufgeführt.

	MC80c	MC80-PMMA			MC80-PS		
		oA	Pentamidin	Spiramycin	oA	Pentamidin	Spiramycin
<b>Größe (nm)</b>	218,65	242,20	239,10	232,81	244,60	236,20	240,61
<b>PI</b>	0,056	0,027	0,045	0,046	0,047	0,050	0,072

	MC81c	MC81-PMMA			MC81-PS		
		oA	Pentamidin	Spiramycin	oA	Pentamidin	Spiramycin
<b>Größe (nm)</b>	136,93	143,20	144,60	142,80	143,20	150,10	149,70
<b>PI</b>	0,036	0,015	0,045	0,030	0,024	0,032	0,036

Durch die Umhüllung der MC80c-Kerne mit Polymethylmethacrylat vergrößerte sich der Partikeldurchmesser um 6,5 bis 11%, während die Größenzunahme bei Polystyren-umhüllten Kernen 8 bis 12% betrug. Bei der Aufpolymerisation der Schale auf die kleineren MC81c-Kerne vergrößerte sich der Durchmesser der Partikel mit der Polymethylmethacrylat-Schale um 4 bis 6% und bei der Polystyren-Schale um 5 bis 10%.

Bei den großen sowie bei den kleinen Partikeln war die Durchmesserzunahme durch die Polystyren-Schale etwas stärker ausgeprägt als bei Partikeln mit einer Polymethylmethacrylat-Schale. Dies ließ sich damit erklären, dass sämtliches, zudosiertes Styren, mit seiner geringen Wasserlöslichkeit, von den Polystyren-Kernen in der Saat aufgenommen wurde und diese dabei anquoll. Bei Methylnmethacrylat konnte das nicht in gleicher Weise erfolgen, da dieses Monomer eine höhere Wasserlöslichkeit aufwies und daher die Gefahr der Bildung neuer, kleiner Partikel, neben den vorliegenden, bestand. Daher wurde bei der Umhüllung mit PMMA zu Beginn nicht sofort die gesamte Menge an Methylnmethacrylat zur Saatpolymerisa-

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

tion gegeben, sondern erst einmal eine Teilmenge. Damit konnte sichergestellt werden, dass sich zunächst eine dünne PMMA-Schale auf den Kernen bildete und nicht PMMA-Partikel, neben den Polystyren-Kernen. Während der Polymerisationszeit von vier Stunden hatte die neu entstandene PMMA-Schale Zeit zu quellen, so dass sie die nach erneuter Methylmethacrylat-Zugabe entstehenden PMMA-Moleküle aufnehmen konnte und die Schalendicke somit zunahm.

Die Umhüllung mit PS erwies sich so als die effektivere Methode für eine Größensteigerung, da die Polystyren-Kerne leichter PS aufnehmen konnten als PMMA, bei denen erst einmal eine nur dünne PMMA-Schale geschaffen werden musste, bevor die aufquellende Schale neues Polymer aufnehmen konnte.

### 5.1.1.3 Reine PBCA-Nanopartikel

Neben Kern-Schale-Teilchen wurden auch homogene Nanopartikel hergestellt, die nur aus Polybutylcyanoacrylat bestanden. Dies waren so genannte Nanosphärchen. Ihre Herstellung erfolgte mittels der anionischen Polymerisation. Nach Scherer erwies sich die Mischung von Dextran 70000 und Poloxamer 188 im Verhältnis 10 : 1 am geeignetsten, um Partikel in einer Größe von 230 bis 240 nm herzustellen. Dieser Größenbereich wurde für die reinen PBCA-Partikel gewählt, da er zwischen den beiden Größen der Standardpartikel MC80-PBCA und MC81-PBCA lag.

Die hergestellten reinen Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel besaßen eine Größe von 239,0 nm mit einem Polydispersitätsindex von 0,098.

### **Fazit**

Für den Kern der Kern-Schale-Nanopartikel wurde das nichtabbaubare Polymer Polystyren gewählt, während die Schale aus dem bioabbaubaren Polymer Polybutylcyanoacrylat (PBCA) bestand. Für einen Therapieeinsatz wären die verwendeten Partikel durch ihren nicht-abbaubaren Kern ungeeignet, da sie zu einer Akkumulation im Körper führen würden. In der vorliegenden Arbeit sollte jedoch ein *in-vitro* Modell entwickelt werden, das es ermöglicht die Partikel in der Zellkultur über drei Tage zu beobachten. Im Hinblick darauf waren die nicht abbaubaren fluoreszierenden Partikelkerne besser geeignet. Des Weiteren konnte durch die abbaubare Partikelschale gewährleistet werden, dass die inkorporierten Arzneistoffe in den Zellen freigesetzt werden und ihre Wirkung entfalten konnten.

Neben der Umhüllung mit dem abbaubaren PBCA wurden die Polystyren-Kerne auch mit einer nur langsam abbaubaren Polymethylmethacrylat- bzw. einer nicht abbaubaren Polysty-

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

ren-Schale ummantelt. Damit sollte es möglich sein, den Effekt der Nanopartikel allein von dem der Arzneimittel zu unterscheiden bzw. zu trennen.

Während die Kern-Schale-Nanopartikel, die komplett aus Polystyren bestehen nur als Modellpartikel für *in-vitro* Versuche geeignet wären, könnten die Partikel mit einer langsam abbaubaren Polymethylmethacrylat-Schale als Depot-Formulierungen zum Einsatz kommen.

Es wurde mit zwei verschiedenen großen Nanopartikeln gearbeitet, um den Einfluß der Partikelgröße auf die Aufnahme in die Zellen bewerten zu können. Gängige Lehrmeinung ist, „je größer die Partikel, desto stärker und schneller die Aufnahme in die Zellen“ (Müller, 1991).

Deshalb müssten bei den Zellkulturversuchen die größeren MC80cs-Partikel stärker phagozytiert werden als die kleineren MC81cs-Partikel.

### 5.1.2 Partikelladung

#### 5.1.2.1 Einzelmessungen

Begründet durch den Mechanismus der radikalischen Polymerisation, initiiert mit wasserlöslichen, salzartigen Startern, wie Kaliumperoxodisulfat (KPS), wiesen die entstandenen Polystyrenpartikel negative Ladungen auf. Dies ließ sich damit erklären, dass das KPS bei der Polymerisationstemperatur thermisch in negativ geladene, hydrophile Sulfat-Anionradikale zerfiel, die letztlich als Endgruppen der Polymerketten fest gebunden an den Partikeln verblieben und sich zur Wasserphase, d.h. zur Grenzschicht hin, orientierten. Sie bestimmten wesentlich die Oberflächenladungsdichte der üblichen Polystyrenlatices, d.h. sie können auch durch die verschiedenen Reinigungstechniken nicht entfernt werden.

Die Bestimmung der Partikelladung erfolgte über die Messung des Zetapotentials (ZP).

Das Zetapotential der MC80c-Dispersion in Reinstwasser betrug -99,36 mV, das der MC81c-Dispersion -93,20 mV.

Zetapotentialwerte größer /-41 mV/ weisen auf physikalisch stabile Formulierungen hin (Müller und Schuhmann, 1996).

Durch die Umhüllung der Polystyren-Kerne mit PBCA trat eine Änderung des Zetapotentials ein. Einen Überblick über die resultierenden Zetapotentiale gibt Tabelle 5-4.

**Tab. 5.4** ZP-Daten und zugehörige pH-Werte der mit PBCA umhüllten Polystyren-Kerne in Reinstwasser (c = core, cs = core-shell, oA = ohne Arzneistoff, Penta = Pentamidin, Spira = Spiramycin). Zum Vergleich werden auch die ZP der Kerne erneut aufgeführt.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

	MC80c	MC80cs PBCA			MC81c	MC81cs PBCA		
		oA	Penta	Spira		oA	Penta	Spira
ZP(mV)	-99,36	-92,14	-79,9	-88,6	-93,2	-84,79	-79,7	-81,2
pH	5,5	5,49	5,54	5,52	5,52	5,50	5,55	5,53

Die Umhüllungen der deutlich negativ geladenen Polystyren-Kerne mit PBCA ergaben ein erniedrigtes Zetapotential. Zurückzuführen war dies darauf, dass reines PBCA nur wenige negative Ladungen trägt. Im Gegensatz zur radikalischen Polymerisation, bei der durch den Initiator negativ geladene Sulfatgruppen in das wachsende Polymer eingebaut wurden, erfolgte bei der anionischen Polymerisation des PBCAs kein solcher Einbau. Die startenden Hydroxidionen übertrugen ihre Ladung auf die wachsende Kette. Durch den Abbruchschritt wurde diese Ladung dann kompensiert. Die ungeladenen PBCA-Schalen verdeckten die negativen Oberflächenladungen der Polystyren-Kerne, so dass die Kern-Schale-Partikel nach außen hin weniger negative Zetapotentiale besaßen als die Kerne. Die kleineren MC81cs-Partikel besaßen die schwächer negativen Zetapotentiale, was auf ihren prozentual größeren Schalenzuwachs zurückzuführen war. Durch die dickere Schale der MC81cs-Partikel werden die negativen Ladungen der Kerne noch besser abgeschirmt als durch die dünnere Schale der größeren MC80cs-Nanopartikel.

Bei den Kern-Schale-Partikeln hatten die nicht mit Arzneistoff beladenen die stärkste negative Oberflächenladung. Das ließ sich daraus ableiten, dass die basischen Arzneistoffe nicht vollständig in der Polymermatrix inkorporiert, sondern auch zum Teil auf der Partikeloberfläche adsorbiert waren und somit zu einem veränderten Zetapotential gegenüber den Partikeln ohne Arzneistoff führten. Da die Partikelsuspensionen leicht saure pH-Werte von 5,5 aufwiesen, lagen die basischen funktionellen Gruppen der Arzneistoffe zum Teil protoniert vor. So wurde die negative Ladung der Kerne nicht nur durch die un- bzw. nur schwach geladenen PBCA-Schale abgeschwächt, sondern die positiven Ladungen der protonierten Arzneistoffgruppen konnten die „durchscheinende“ negative Ladung der Kerne zusätzlich kompensieren. Die stark basischen Amidin-Gruppen des Pentamidins wurden stärker protoniert als das schwächer basische tertiäre Amin des Spiramycins. Daraus resultierte, dass die Zetapotentiale der Pentamidin-Kern-Schale-Partikel weniger negativ waren als die der Spiramycin-Kern-Schale-Partikel.

Neben einer PBCA-Schale wurden die Polystyren-Kerne auch mit einer Polymethylmethacrylat(PMMA)- und einer Polystyren(PS)-Schale umhüllt. Die Ergebnisse der Zetapotentialmessungen sind in den Tabellen 5-5/6 zusammengefasst.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-5/6** ZP-Daten und zugehörige pH-Werte der mit PMMA bzw. PS umhüllten Polystyren-Kerne in Reinstwasser (c = core, oA = ohne Arzneistoff, Penta = Pentamidin, Spira = Spiramycin). Zum Vergleich werden auch die ZP der Kerne erneut aufgeführt.

	MC80c	MC80-PMMA			MC80-PS		
		oA	Penta	Spira	oA	Penta	Spira
<b>ZP (mV)</b>	-91,10	-89,18	-78,80	-85,10	-96,10	-90,50	-94,00
<b>pH</b>	5,54	5,56	5,52	5,54	5,51	5,55	5,53

	MC81c	MC81-PMMA			MC81-PS		
		oA	Penta	Spira	oA	Penta	Spira
<b>ZP (mV)</b>	-93,62	-92,50	-87,00	-91,90	-96,20	-88,20	-95,70
<b>pH</b>	5,4	5,51	5,55	5,53	5,52	5,56	5,53

Obwohl die Partikel nach dem gleichen Polymerisationsmechanismus hergestellt wurden und daher bei beiden Partikelsorten negativ geladenen Gruppen des Initiators eingebaut wurden, wiesen die Partikel mit einer Polystyren-Schale stärker negative Zetapotentiale auf als die Partikel mit einer Polymethylmethacrylat-Schale. Dies dürfte zum einen mit der Größe der Partikel im Zusammenhang stehen, da die negativeren Polystyrenpartikel auch die etwas größeren waren und somit mehr geladenen Gruppen auf der Oberfläche vorhanden waren. Außerdem ist auf der hydrophoberen Oberfläche die zusätzliche Adsorption von Anionen erleichtert.

Wie auch bei den Kern-Schale-Partikeln mit einer PBCA-Schale wiesen auch bei denen mit einer PMMA- und PS-Schale die Partikel ohne Arzneistoff (oA) die negativsten Zetapotentiale auf. Partikel mit Spiramycin besaßen weniger negative Zetapotentiale und Partikel mit Pentamidin waren am wenigsten negativ geladen. Auch hier ließen sich diese Ergebnisse auf die funktionellen Gruppen der auf der Partikeloberfläche adsorbierten Arzneistoffe zurückführen.

Zur detaillierten Charakterisierung der Nanopartikel wurden die Zetapotentialmessungen nicht nur mit Reinstwasser als Dispersionsmedium durchgeführt, sondern auch in Elektrolytlösungen. Dazu wurden 0,001 molare sowie 0,01 molare Natriumchloridlösungen verwendet. Das Zetapotential in elektrolytarmen Dispersionsmedien, wie Reinstwasser, wird stark vom Restelektrolytgehalt beeinflusst. Zu diesen schwer kalkulierbaren Einflüssen tragen auch die Latexteilchen bei, da sie selbst Ladungsträger darstellen. Um unterschiedliche Ladungsmengen im Medium auszugleichen und die Messungen einheitlich zu gestalten, wurde mit verschiedenen konzentrierten Salzhintergründen gearbeitet. So wurden auch Unterschiede in der



## 5. Ergebnisse und Diskussion

Probenkonzentration bei der Messung nivelliert. Die Ergebnisse werden Tabelle 5-7 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Zetapotentiale der Polystyren-Kern-Chargen etwas variierten, was auf eine nicht exakt standardisierbare Herstellung zurückzuführen war.

**Tab. 5-7** Zetapotentiale der Polystyren-Kerne sowie der mit PBCA, PS und PMMA umhüllten Kern-Schale-Nanopartikel in verschiedenen konzentrierten Salzlösungen (0,001 molar und 0,01 molar) (c = core, cs = core-shell, oA = ohne Arzneistoff, Penta = Pentamidin, Spira = Spiramycin)

ZP (mV)		PBCA		PMMA		PS	
		10 <sup>-3</sup> n NaCl	10 <sup>-2</sup> n NaCl	10 <sup>-3</sup> n NaCl	10 <sup>-2</sup> n NaCl	10 <sup>-3</sup> n NaCl	10 <sup>-2</sup> n NaCl
MC80c	(ohne Schale)	-86,2	-76,6	-80,6	-75,4	-80,6	-75,4
MC80cs	oA	-72,1	-36,4	-73,2	-55,2	-81,1	-79,6
MC80cs	Penta	-55,0	-30,3	-69,0	-58,4	-80,3	-74,2
MC80cs	Spira	-69,8	-34,4	-76,2	-69,0	-78,3	-74,3
MC81c	(ohne Schale)	-70,3	-50,9	-66,2	-60,6	-66,2	-60,6
MC81cs	oA	-63,4	-30,6	-62,2	-54,8	-73,1	-71,8
MC81cs	Penta	-61,7	-29,0	-58,8	-45,1	-77,1	-63,1
MC81cs	Spira	-57,3	-30,1	-73,8	-69,7	-64,2	-44,0

Die Erhöhung der Elektrolytkonzentration führte zu einer Abnahme der Zetapotentiale. Mit einer Natriumchloridlösung als Dispersionsmittel bei der Zetapotentialmessung, ergab sich eine Anreicherung von positiven Natrium-Ionen in der Nähe der negativ geladenen Partikeloberfläche. Dadurch wurde die partikelumgebende, diffuse Schicht dünner und ein steilerer Potentialabfall fand statt, woraus sich ein steigendes, also weniger negatives Zetapotential ableitete. Die sich mit ansteigender Elektrolytkonzentration verringernde Schichtdicke wird als „Kompression der diffusen Schicht“ bezeichnet (Müller und Schuhmann, 1996).

Die Zetapotentialmessung der **reinen Polybutylcyanoacrylat-Partikel** in Reinstwasser ergaben ein Potential von -35,9 mV bei einem pH von 5,56. PBCA-Nanopartikel gehören zu den nicht oder nur schwach geladenen Partikeln, was auf ihre Grenzschichtstruktur, zurückgehend auf den Polymerisationsmechanismus, zurückzuführen ist, bei dem kaum geladene Gruppen in das wachsende Polymer eingebaut werden. Das doch deutlich negative Zetapotential der PBCA-Partikel beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Hydrolyse des Polymers. Sie konnte durch die Versuchsbedingungen bei der Partikelsynthese begründet sein oder auch in Form von langsamem Abbau bei der Lagerung erfolgen. Bei der Hydrolyse wird Butanol vom

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Polymer abgespalten, was zur Bildung von Polycyanocarbonsäuren führt. Sie sind negativ geladen und ergaben damit ein etwas stärker negatives Zetapotential.

Eine Erhöhung der Elektrolytkonzentration des Dispersionsmediums führte zur Erniedrigung des Zetapotentials. Bei der niedrigeren Elektrolytkonzentration von 0,001 m NaCl wurde ein Zetapotential von -28,10 mV gemessen, welches sich bei der Messung in höher konzentrierter 0,01 m NaCl-Lösung auf -20,70 mV erniedrigte. Zurückzuführen war dies wieder auf die Kompression der diffusen Schicht.

### **Fazit**

Die Bestimmung der Partikelladung ist nicht nur wichtig, um die physikalische Stabilität der Nanopartikel-Dispersion vorhersagen zu können (Müller und Schuhmann, 1996), sondern auch, um die Aufnahme der Partikel in die Makrophagen beurteilen zu können. So konnte gezeigt werden, dass die Partikelaufnahme mit ansteigendem Zetapotential (d.h. negativer werdend) zunimmt (Müller, 1991). Die gemessenen stark negativen Zetapotentiale ließen in Hinblick auf diesen Parameter eine ausgeprägte Partikelphagozytose erwarten.

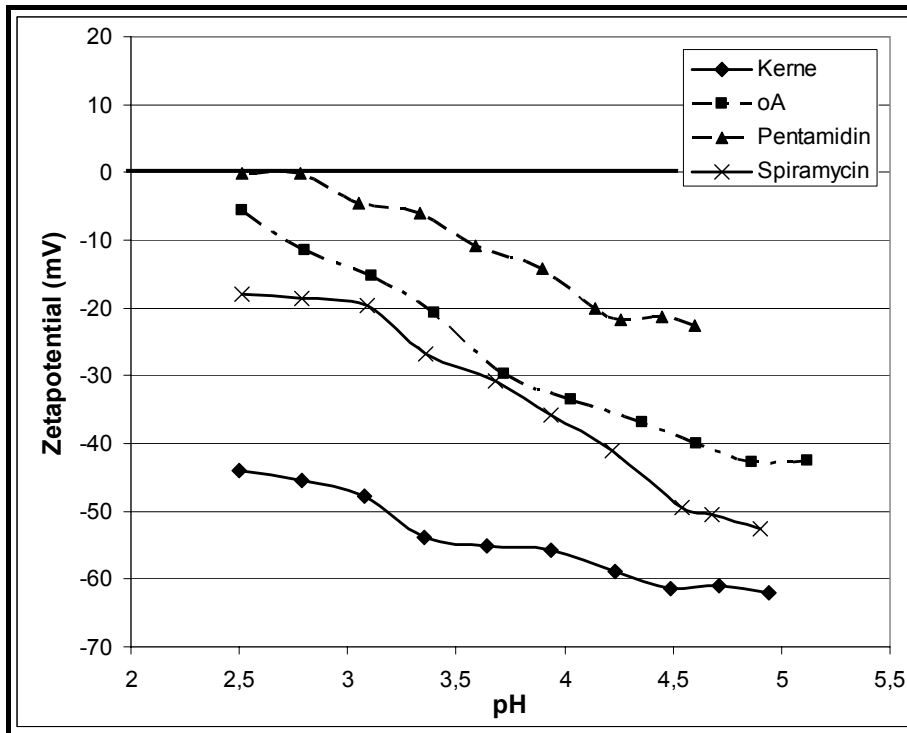
### **5.1.2.2 Titrationsen**

#### **5.1.2.2.1 pH-Titrationsen**

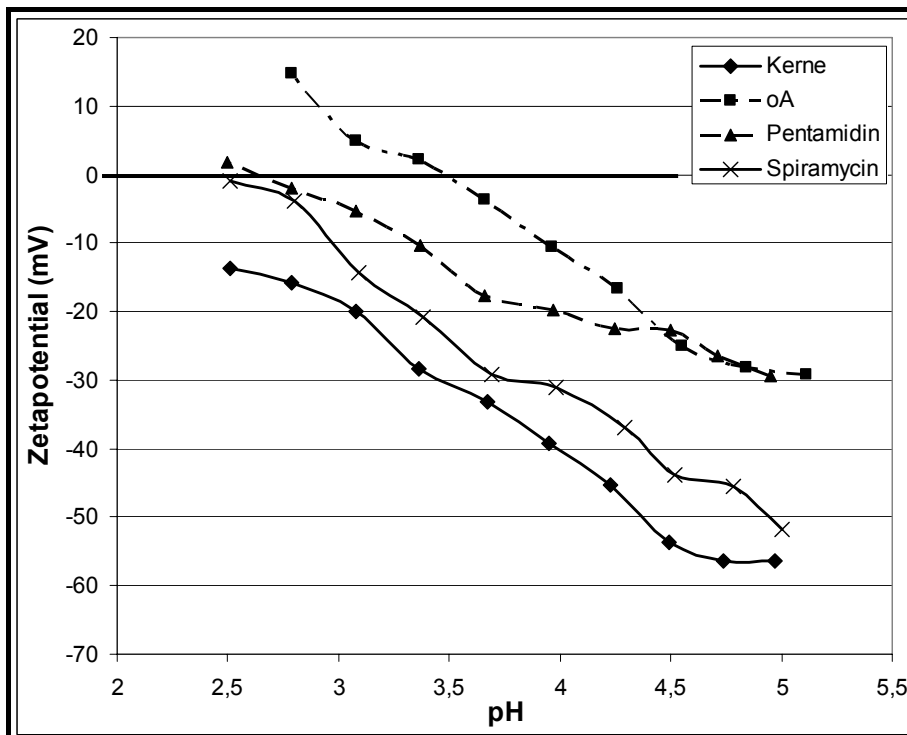
Es wurden Titrationsen mit schrittweise verändertem pH-Wert durchgeführt, um die Nanopartikel, zusätzlich zur Zetapotential-Einzelmessung, umfassender zu charakterisieren. Mit der Erstellung eines Zetapotential-pH-Profiles ließ sich die pH-Sensitivität der Nanopartikel-Oberfläche ermitteln. Der Dissoziationsgrad einer ganzen Reihe von funktionellen Gruppen wird vom pH-Wert beeinflusst (Müller und Schuhmann, 1996). Mit dieser Methode konnten somit alle pH-sensitiven, funktionellen Gruppen erfasst, und es konnte eine Aussage über gegebenenfalls auf der Oberfläche adsorbierte Arzneistoffe gemacht werden. Des Weiteren ließ sich abschätzen, in welchen pH-Bereichen eine ausreichende, elektrostatische Abstoßung der Partikel und damit Stabilität der Dispersion vorlag.

Die pH-Wert-Einstellungen erfolgten ausgehend von pH 5 mit 0,1 n HCl bis pH 2,5.

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-1** Zetapotential-pH-Profile von MC80c- und MC80cs-Nanopartikeln in 0,001 m NaCl-Lösung (oA = ohne Arzneistoff)



**Abb. 5-2** Zetapotential-pH-Profile von MC81c- und MC81cs-Nanopartikeln in 0,001 m NaCl-Lösung

Bei der pH-Titration der MC80c und MC80cs-Nanopartikel wurde im Fall der mit Pentamidin beladenen Partikel der Ladungsnulppunkt („point of zero charge“) erreicht. Dies bedeutete,

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

dass bei einem pH von 2,5 die negative und die positive Ladung gleich sind, so dass die Partikel nach außen ungeladen erscheinen. Hingegen wurde der „point of zero charge“ bei der Titration der mit Spiramycin beladenen Partikeln nicht erreicht. Hier wurden demnach nicht genügend Amin-Gruppen des Spiramycins protoniert, um die negative Ladung, die vom negativen Kern durch die Hülle scheint, zu kompensieren. Das ZP/pH-Profil der MC80-PBCA-(Pentamidin) verlief bei weniger negativen Zetapotentialen als das Profil der MC80-PBCA-(Spiramycin). Es ließ sich daraus ableiten, dass mehr Amidin-Gruppen des Pentamidins auf der Partikeloberfläche vorhanden waren als Amin-Gruppen auf MC80-PBCA-(Spiramycin)-Partikeln.

Bei ZP/pH-Profilen der kleineren MC81-Nanopartikel wurde im Falle von Pentamidin beladenen Partikeln und bei nicht mit Arzneistoff beladenen Nanopartikeln eine Ladungsumkehr beobachtet. Die Ladungsnullpunkte lagen dabei bei einem pH von 3,5 im Falle der Partikel ohne Arzneistoff und bei einem pH von 2,6 bei MC81-PBCA-(Pentamidin).

Auch bei den kleineren Partikeln verlief das ZP/pH-Profil der mit Pentamidin beladenen Nanopartikeln bei niedrigeren Zetapotentialen als das der mit Spiramycin beladenen Partikeln. Es waren demnach auch bei den kleinen Partikeln nicht so viele protonierbare Amin-Gruppen auf der Partikeloberfläche vorhanden wie Amidin-Gruppen auf der Oberfläche der MC81-PBCA-(Pentamidin)-Partikel.

Das unterschiedliche Verhalten der kleinen und größeren Nanopartikel ließ sich damit erklären, dass die Polymerisationsbedingungen für die beiden Partikelgrößen nicht ganz die gleichen waren, wie z.B. die verschiedenen Mengen an eingesetzten Emulgatormengen belegen. Aus diesem Grund ergaben sich Unterschiede in der Ladung pro  $\text{\AA}^2$  Oberfläche des Partikels (Müller und Schuhmann, 1996).

Da sich die ZP/pH-Profile der mit Arzneistoff beladenen von den unbeladenen Partikeln unterschieden, war zu erkennen, dass die Arzneistoffe nicht nur in den Schalen inkorporiert, sondern zum Teil auch auf der Partikeloberfläche adsorbiert waren. Nicht nur die Nanopartikel mit, sondern auch die ohne Arzneistoff zeigten einen Zetapotentialanstieg mit abnehmenden pH-Werten.

Das ansteigende ZP/pH-Profil ließ sich bei Partikeln ohne Arzneistoff nicht auf protonierbare basische Gruppen zurückführen, sondern auf einen anderen Effekt:

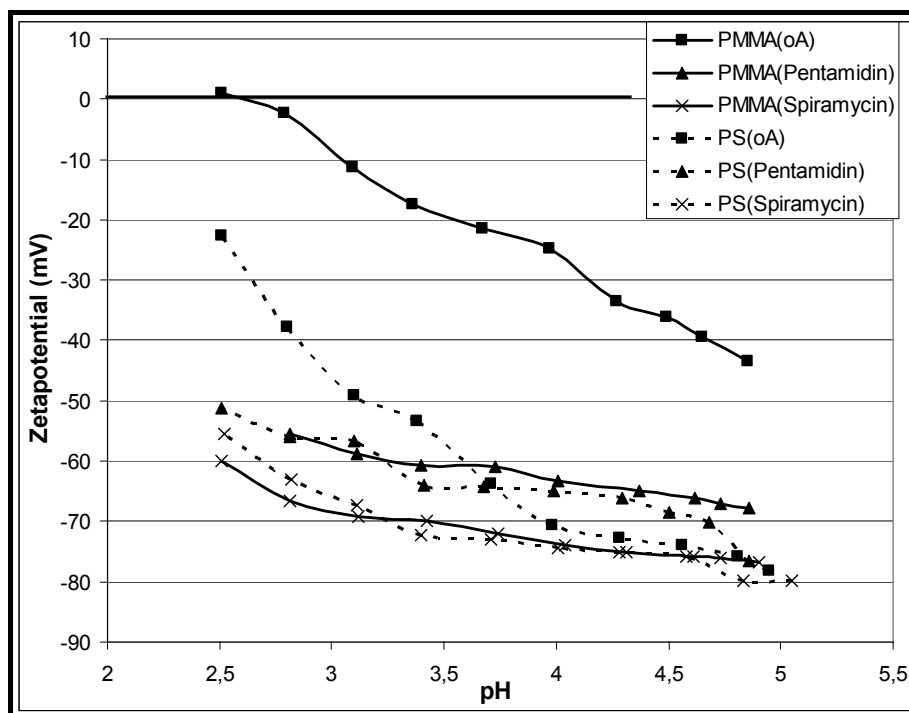
Bei der Titration mit HCl lagerten sich freie  $\text{Cl}^-$ -Ionen, die eine hohe Adsorptionsaffinität besitzen, an die hydrophoben Partikeloberflächen an. Somit kam es beim Start der pH-Titration von Partikeln, die keine protonierbaren Gruppen enthielten (Kerne, Partikel ohne Arzneistoff) nicht zu einem sofortigen Anstieg des Zetapotentials. Ebenfalls bei der pH-Titration freier-

## 5. Ergebnisse und Diskussion

dende Hydronium-Ionen lagerten sich dagegen nicht bereits zu Beginn an die Partikeloberfläche, da sie nur eine geringe Adsorptionsaffinität aufwiesen. Mit zunehmender HCl-Zugabe stieg die Hydronium-Ionen-Konzentration im Dispersionsmedium stark an, so dass die positiven Ionen trotz geringerer Affinität doch an der Partikeloberfläche adsorbierten. Dies führte zu einem steigenden Zetapotential, das bei sehr sauren pH-Werten eine Ladungsumkehr der Partikel erreichen konnte.

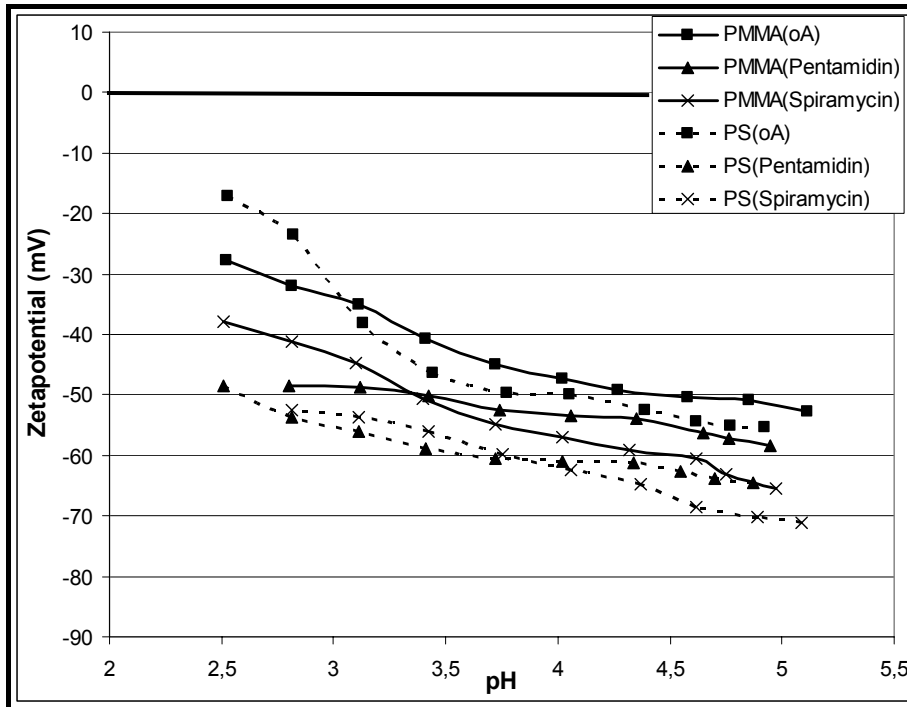
Waren jedoch protonierbare Gruppen auf der Partikeloberfläche vorhanden, so überwog der Effekt der Protonierungsreaktion dem der Adsorption von  $\text{Cl}^-$ - bzw. Hydronium-Ionen (Müller und Schuhmann, 1996).

Neben den Kern-Schale-Partikeln aus Polystyren und Polybutylcyanoacrylat wurden auch die Kern-Schale-Kolloide aus einem Polystyren-Kern und einer Polymethylmethacrylat- bzw. Polystyren-Schale mittels pH-Titration charakterisiert.



**Abb. 5-3** Zetapotential-pH-Profile von MC80cs-Nanopartikeln in 0,001 m NaCl-Lösung (PMMA = Polymethylmethacrylat, PS = Polystyren)

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-4** Zetapotential-pH-Profile von MC81cs-Nanopartikeln in 0,001 m NaCl-Lösung (PMMA = Polymethylmethacrylat, PS = Polystyren)

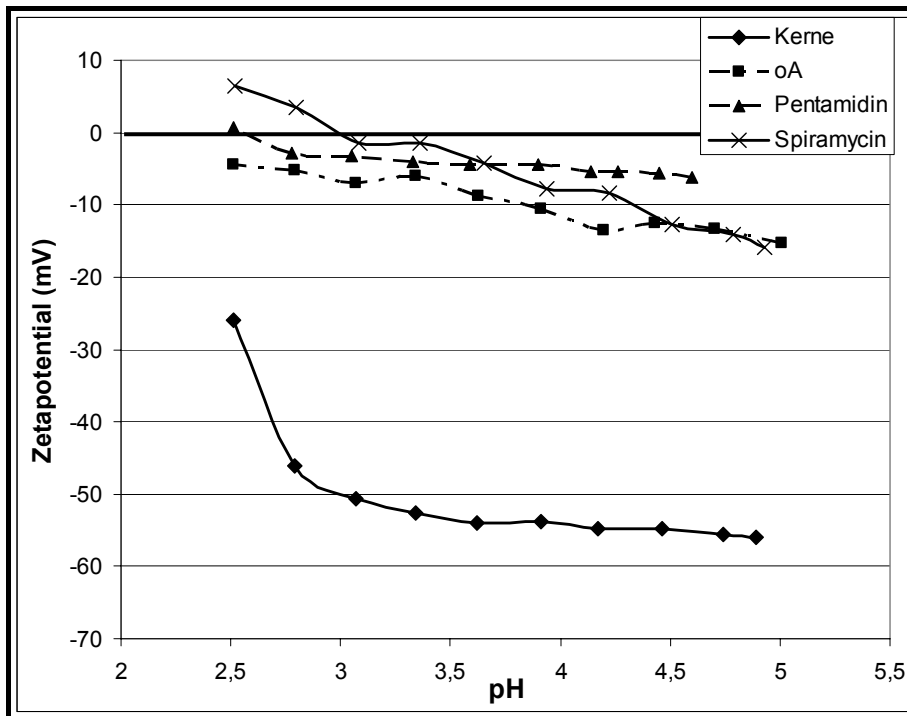
Obwohl die PMMA- und die PS-Schalen nach dem gleichen Mechanismus hergestellt wurden und daher ihre Oberflächen sehr ähnlich geladen sein müssten, unterschieden sich ihre ZP/pH-Profile. Die Kern-Schale-Partikel, die eine Polystyren-Schale besaßen, verliefen immer bei etwas niedrigeren Zetapotentialen als die Partikel mit einer Polymethylmethacrylat-Schale. Dies ließ sich darauf zurückführen, dass Polystyren eine stärkere Adsorptionsneigung als Polymethylmethacrylat besaß und daher mehr Chlorid-Ionen an einer PS- als an einer PMMA-Schale adsorbieren konnten.

Wie auch bei den Partikeln mit einer PBCA-Schale besaßen die Partikel, die mit Spiramycin beladen waren, die am stärksten negativen Zetapotentialen, gefolgt von den mit Pentamidin beladenen Partikeln. Das ZP/pH-Profil der Partikel ohne Arzneistoff verlief auch wie bei den Kern-Schale-Partikel mit einer PBCA-Schale bei den am wenigsten niedrigen Zetapotentialen. Die Ursachen für dieses Verhalten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Da bei den mit PMMA umhüllten Kernen der größte Abstand zwischen dem Zetapotential ohne und mit Arzneistoff besteht - nach PS-Umhüllung ist dieser Abstand fast vernachlässigbar - wird vermutet, dass bei der Umhüllung im direkten Umfeld der basischen Arzneistoffe auf der Partikeloberfläche eine Spaltung der Methacrylsäure-Estergruppen angeregt wird. Das führt zu zusätzlichen, freien Carboxylgruppen und somit negativen Ladungen. Eine Arznei-

## 5. Ergebnisse und Diskussion

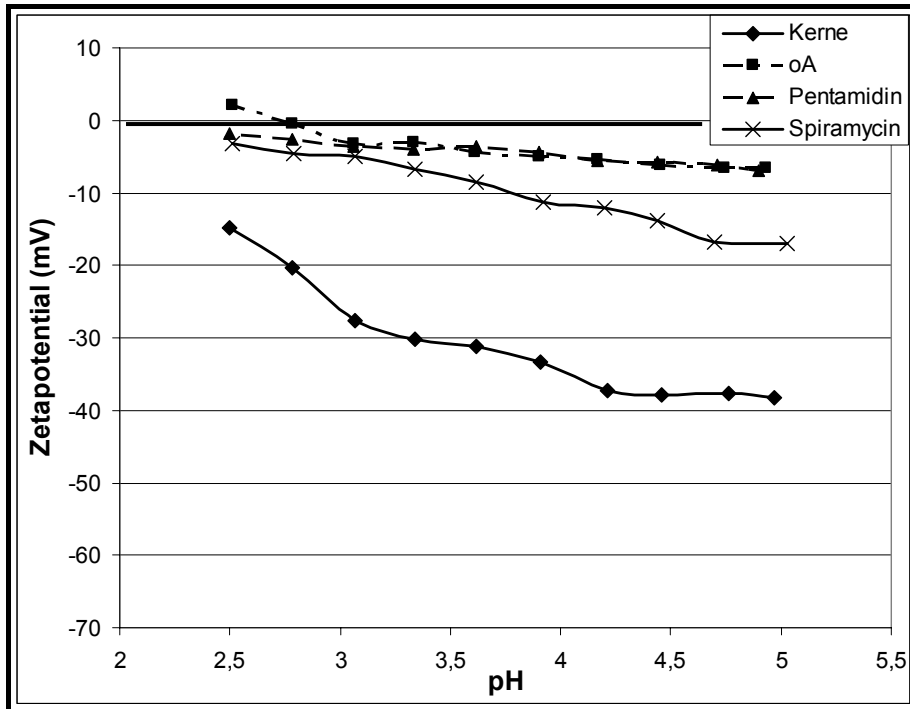
stoff-bedingte pH-Verschiebung über die gesamte Wasserphase scheidet aus, da die Polymerisationsansätze pH-gepuffert ablaufen.

Neben den pH-Titrationen in 0,001 m NaCl-Lösung wurden die Titrations auch in der höher konzentrierten 0,01 m NaCl-Lösung durchgeführt. Die ZP/pH-Profile wurden in den folgenden Abbildungen aufgezeigt.



**Abb. 5-5** Zetapotential-pH-Profile von MC80c- und MC80cs-Nanopartikeln in 0,01 m NaCl-Lösung

## 5. Ergebnisse und Diskussion



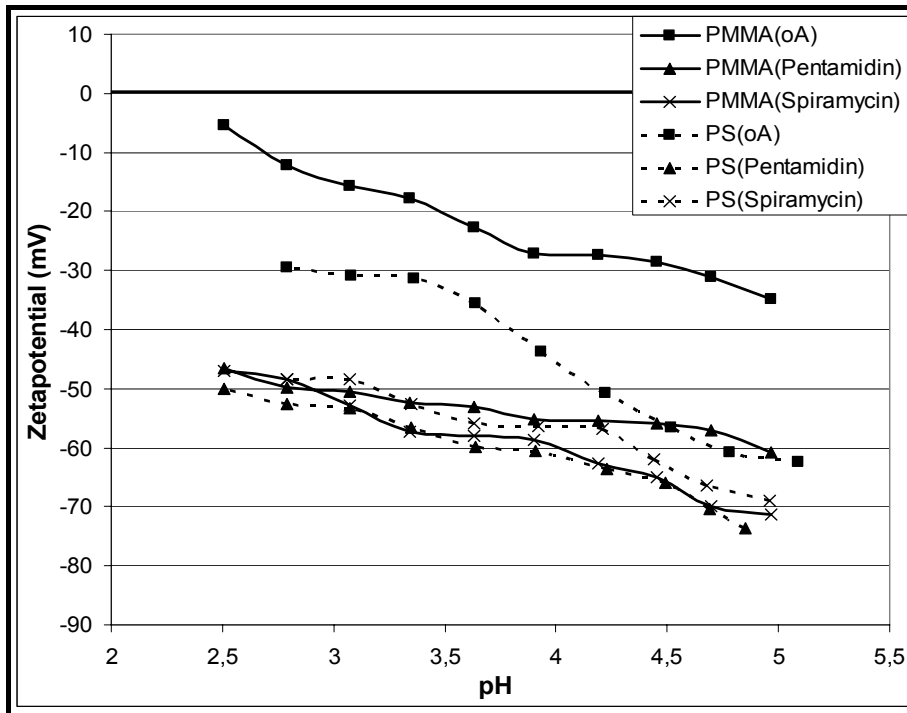
**Abb. 5-6** Zetapotential-pH-Profile von MC81c- und MC81cs-Nanopartikeln in 0,01 m NaCl-Lösung

Bei den Titrationen in 0,01 m Natriumchloridlösung kam es durch die erhöhte Elektrolytkonzentration des Dispersionsmediums zum so genannten „Elektrolyteffekt“ (siehe Salztitration). D.h. die erhöhte Elektrolytkonzentration führte zu einer Kompression der diffusen Schicht und damit zu einer Erniedrigung der Zetapotentiale. Der Elektrolyteffekt überlagerte das gesamte Profil so sehr, dass es schwierig wurde, Unterschiede zwischen den Partikeln sensitiv zu detektieren. Somit waren sich die ZP/pH-Profile der verschiedenen Partikel bei einer hohen Elektrolytkonzentration des Dispersionsmediums sehr ähnlich und auch die Zetapotentialbereiche der einzelnen Partikel, über die sich das ZP/pH-Profil erstreckte, waren nicht mehr so ausgeprägt wie im Dispersionsmedium mit niedrigerer Elektrolytkonzentration.

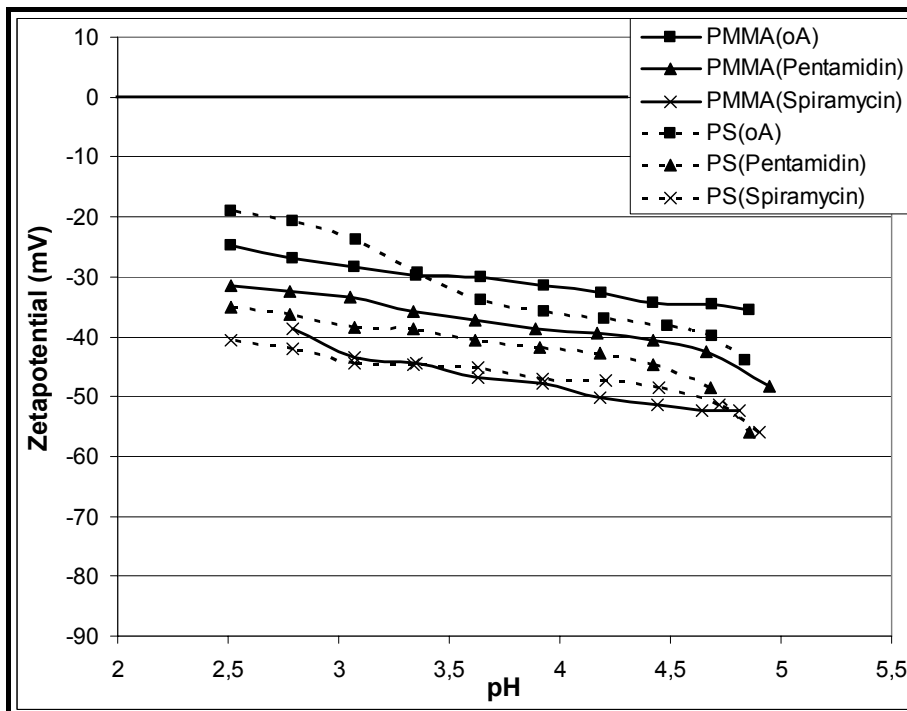


## 5. Ergebnisse und Diskussion

Wie bei den Standardpartikeln wurden auch bei den Referenzpartikeln pH-Titrations in höher konzentrierten NaCl-Lösungen durchgeführt.

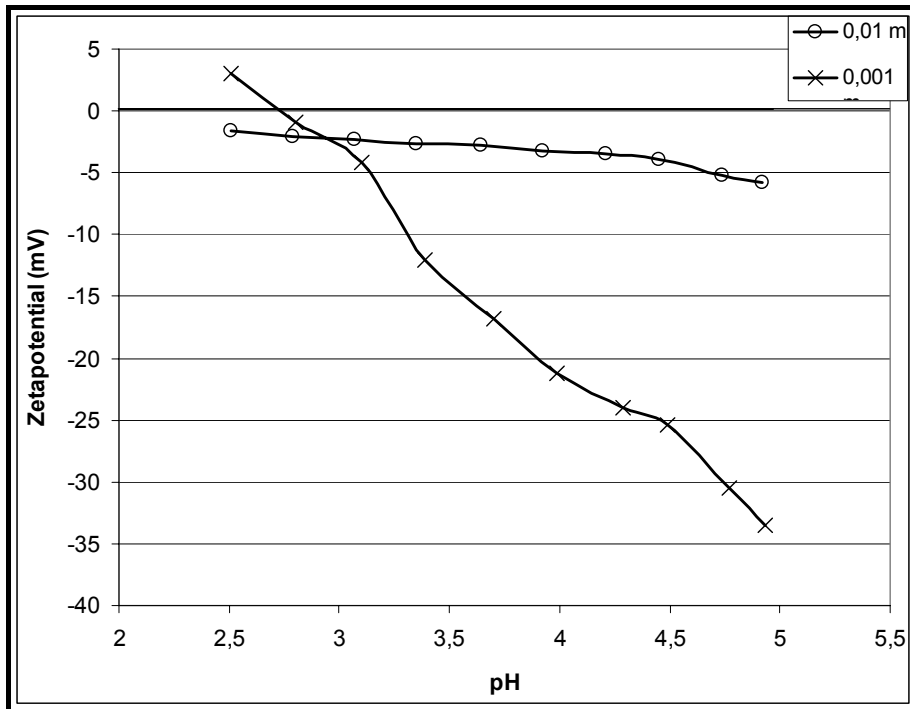


**Abb. 5-7** Zetapential-pH-Profile von MC80-PMMA und PS-Nanopartikeln in 0,01 m NaCl-Lösung



**Abb. 5-8** Zetapential-pH-Profile von MC81-PMMA-und PS-Nanopartikeln in 0,01 m NaCl-Lösung

## 5. Ergebnisse und Diskussion



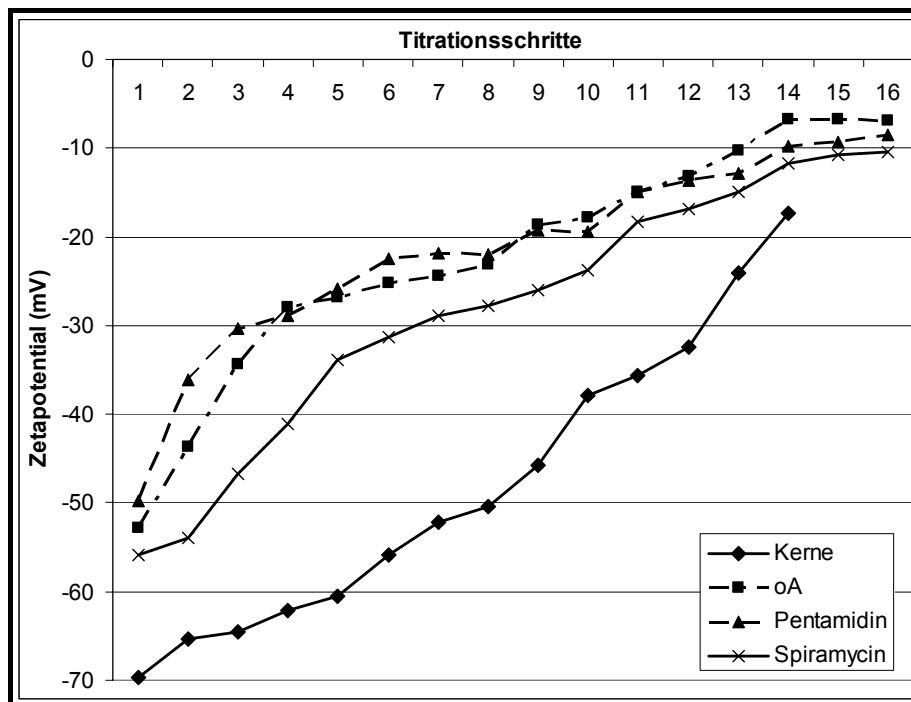
**Abb. 5-9** Zetapotential-pH-Profile von reinen PBCA-Nanopartikeln in 0,01m und 0,001 m NaCl-Lösung

Wie bei den Kern-Schale-Nanopartikeln mit einer PBCA-Schale erfolgte auch bei den Partikeln mit einer PMMA- bzw. einer PS-Schale sowie bei den reinen PBCA-Partikeln durch die erhöhte Elektrolytkonzentration eine Kompression der diffusen Schicht. Dadurch verliefen die Zetapotential-pH-Profile nicht mehr über so weite Zetapotentialbereiche wie im Dispersionsmedium mit niedrigerer Elektrolytkonzentration. Daher waren pH-abhängige Zetapotentialänderungen schwerer zu erkennen. Dies war auch ganz deutlich bei der Gegenüberstellung der reinen PBCA-Partikel (Abb. 5-9) im höher und niedriger konzentrierten Dispersionsmedium zu erkennen. Während z.B. in 0,001 molarer Natriumchlorid-Lösung über die deutliche pH-Sensitivität des Zetapotentials auf die Anwesenheit von dissoziierten Carboxylgruppen auf der Teilchenoberfläche geschlossen werden kann, ist in 0,01 m NaCl die Doppelschicht offenbar schon so komprimiert, das - ohne chemische Veränderungen der Partikel - kein Hinweis in dieser Richtung mehr erfolgt.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

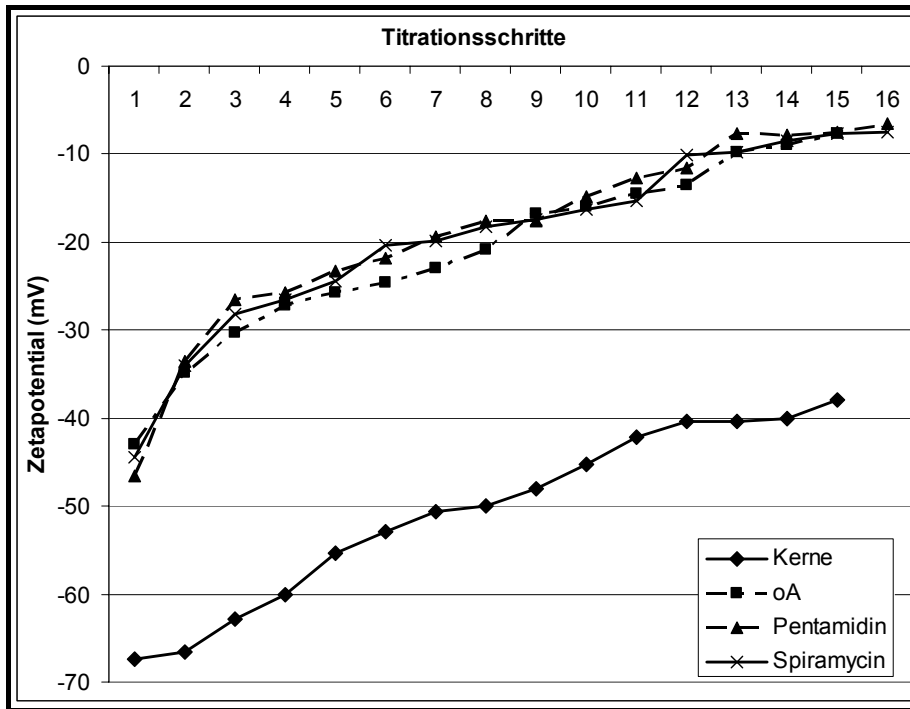
### 5.1.2.2.2 Salztitrationen

Zur weiteren, intensiven Charakterisierung der Nanopartikel wurden auch so genannte Salztitrationen durchgeführt. Um standardisierte Ausgangsbedingungen zu erhalten, wurden als Dispersionsmedien wieder 0,01 m und 0,001 m NaCl-Lösung verwendet. Die Titration erfolgte mit 0,5 m NaCl in 15 Schritten. Es wurde mit einem Anfangsinkrement von 0,25 ml gestartet und die weiteren Titrationsschritte erfolgten mit einem Variationsfaktor von 1,2.

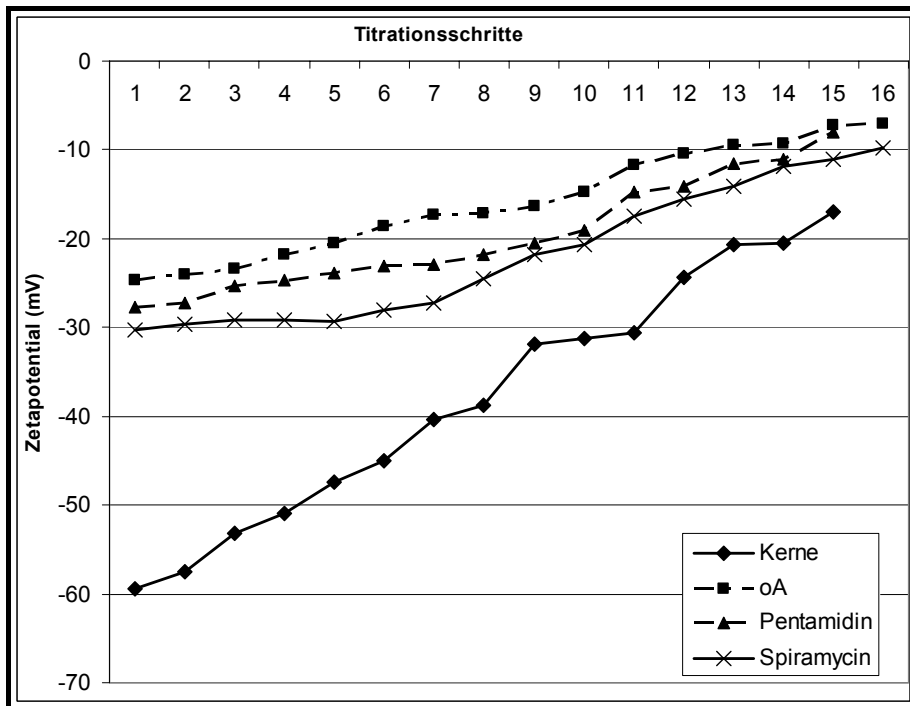


**Abb. 5-10** Zetapotential-Elektrolyt-Profile von MC80c- und MC80cs-Nanopartikeln in 0,001 m NaCl-Lösung

## 5. Ergebnisse und Diskussion

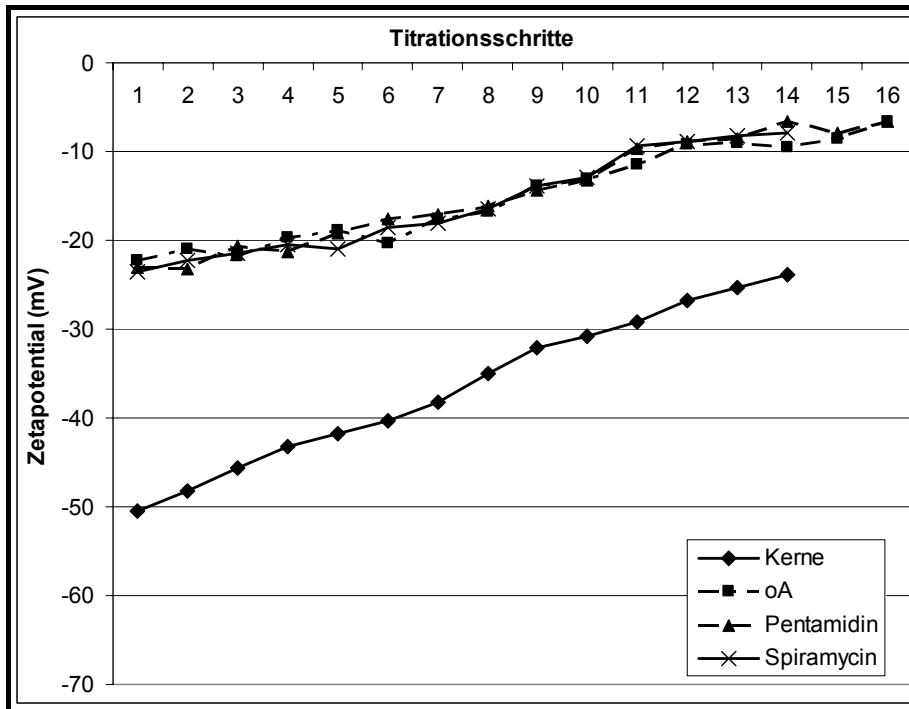


**Abb. 5-11** Zetapotentiale-Elektrolyt-Profile von MC81c- und MC81cs-Nanopartikeln in 0,001 m NaCl-Lösung



**Abb. 5-12** Zetapotentiale-Elektrolyt-Profile von MC80c- und MC80cs-Nanopartikeln in 0,01 m NaCl-Lösung

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-13** Zetapotential-Elektrolyt-Profile von MC81c- und MC81cs-Nanopartikeln in 0,01 m NaCl-Lösung

Mit zunehmender Elektrolytkonzentration nahmen die gemessenen Zetapotentiale ab. Die ZP/Elektrolyt-Profile der Kern-Schale-Nanopartikel unterschieden sich innerhalb einer Partikelgröße und innerhalb eines Dispersionsmediums nur wenig. Die Profile waren vor allem bei den kleineren MC81-Partikeln sehr ähnlich und ließen keine Aussagen über unterschiedliches Verhalten bei zunehmender Elektrolytkonzentration zu. Bei den Profilen der großen MC80-Kern-Schale-Partikel traten etwas größere Unterschiede im Verlauf der Titration auf. Jedoch waren diese auch hier nicht so stark ausgeprägt, um von unterschiedlichem Verhalten mit zunehmender Elektrolytkonzentration sprechen zu können.

Mit ansteigender Elektrolytkonzentration nahm die Schichtdicke der diffusen Schicht ab. In der Literatur wird dieses Verhalten als „Kompression der diffusen Schicht“ bezeichnet (Müller, 1991, Müller und Schuhmann, 1996).

In stark verdünnten Elektrolytlösungen ist die Konzentration an Gegenionen, die die Partikel umgeben, sehr gering und der Abfall des Potentials erfolgt daher über eine große Distanz. Die Dicke der diffusen Schicht ist in so einem Fall groß.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Nach der Doppelschichttheorie entspricht diese Schichtdicke dem reziproken Wert des Debye-Hückel Parameters ( $\kappa$ )

$$\text{Schichtdicke} = 1 / \kappa$$

wobei der Debye-Hückel Parameter abhängt von der Ionenkonzentration sowie der Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmediums und der Ladungszahl dieser Ionen.

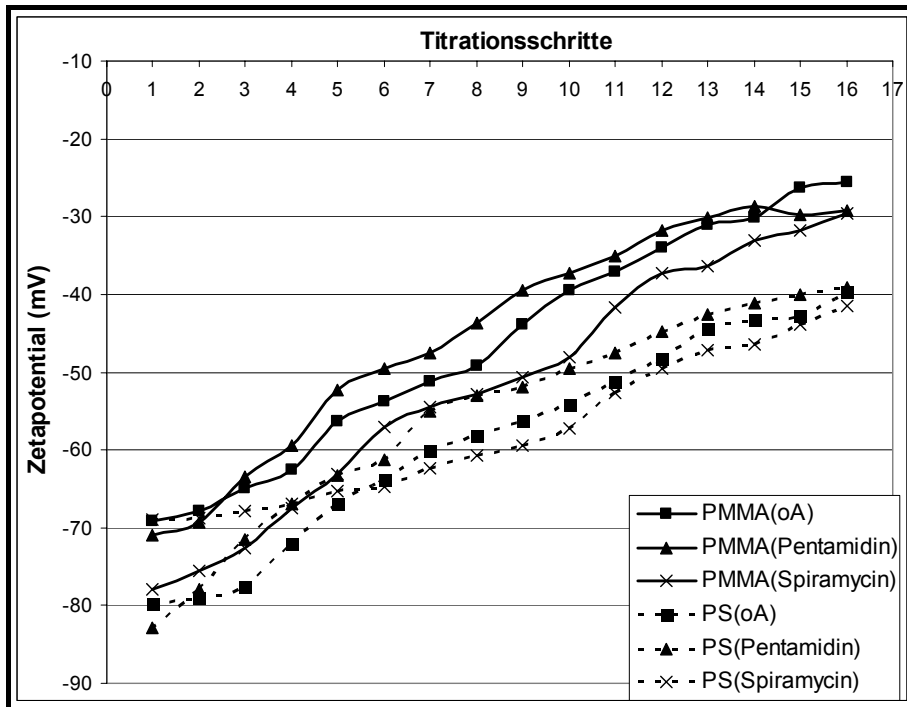
Bei den hier vorgestellten Zetapotentialmessungen führte die Erhöhung der Elektrolytkonzentration im Dispersionsmedium zur Anreicherung der positiven Natrium-Ionen an der Partikeloberfläche. Daraus ergab sich eine dünnere diffuse Schicht und somit ein steilerer Potentialabfall.

Die Anreicherung der positiven Natrium-Ionen an negativ geladenen Partikeloberflächen ergab sich durch die elektrostatische Anziehung der positiven Ionen seitens der negativen Partikeloberfläche. Zum anderen erfolgte sie über die Erhöhung der Elektrolytkonzentration, wobei die erhöhte Anzahl der Ionen im Dispersionsmedium auch einen Anstieg der Ionenanzahl an der Partikeloberfläche hervorrief.

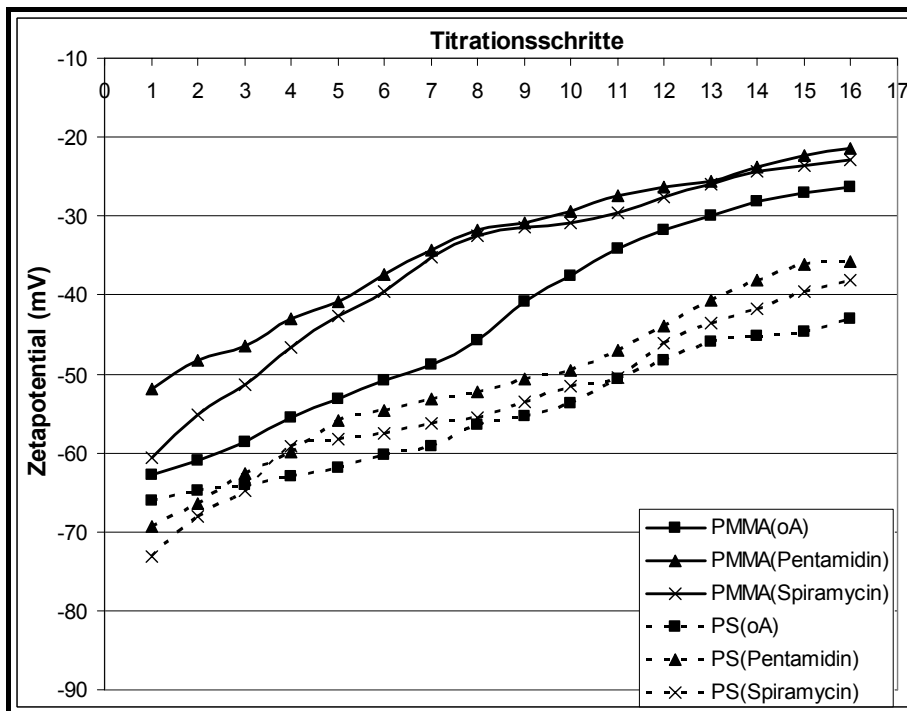
Da das Zetapotential dasjenige Potential ist, das an der Scherebene innerhalb der diffusen Doppelschicht besteht, besaßen Partikel, deren diffuse Schicht durch eine geringe Elektrolytkonzentration des Mediums sehr ausgedehnt war, wodurch nur ein langsamer Potentialabfall stattfand, ein hohes Zetapotential. Dagegen hatten Partikel in einem hochkonzentrierten Dispersionsmedium eine nur dünne, diffuse Schicht mit einem steil abfallenden Potential und daher ein nur geringes Potential an der Scherebene. Somit nahmen die Zetapotentiale während der Salztitration, bei der die Elektrolytkonzentration schrittweise erhöht wurde, immer weiter ab. Aus diesem Grund verliefen auch die ZP/Elektrolyt-Profile der Partikel im höher konzentrierten Dispersionsmedium (0,01 m NaCl) bei niedrigeren Zetapotentialen als in dem niedriger konzentrierten Medium (0,001 m NaCl). Durch eine komprimierte, diffuse Schicht und einen daraus hervorgerufenen, steilen Potentialabfall ließen sich Zetapotentialdifferenzen zwischen verschiedenen Partikeln nicht mehr sensitiv erfassen.

Wie die Standardpartikel wurden auch die Referenzpartikel einer Salztitration unterworfen. Die ZP/Elektrolyt-Profile in 0,001 m und in 0,01 m Natriumchloridlösung sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

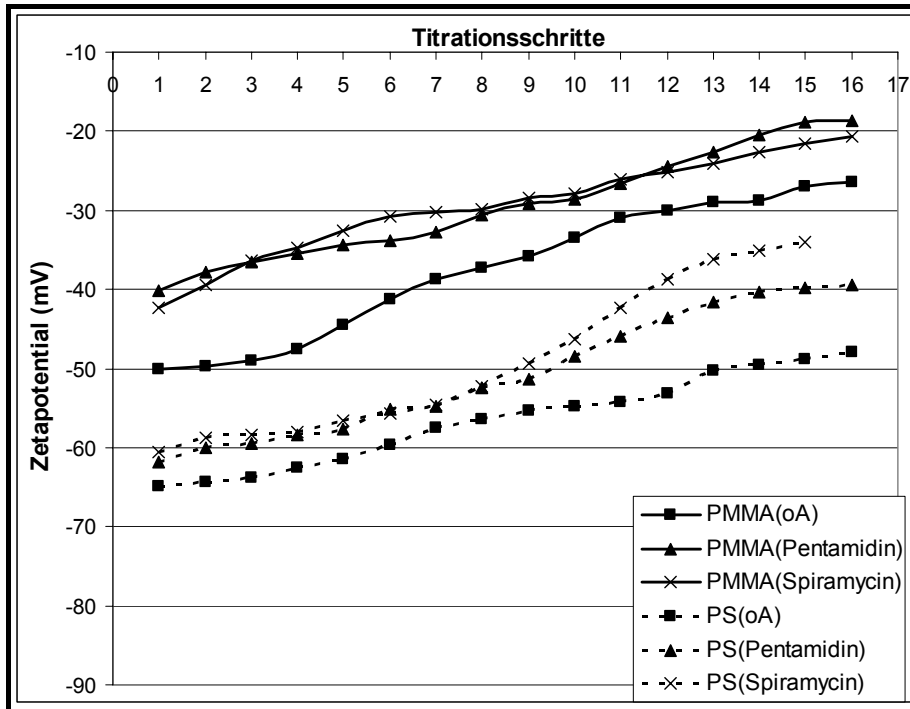


**Abb. 5-14** Zetapotential-Elektrolyt-Profile von MC80- Nanopartikeln in 0,001 m NaCl-Lösung (oA = ohne Arzneistoff)

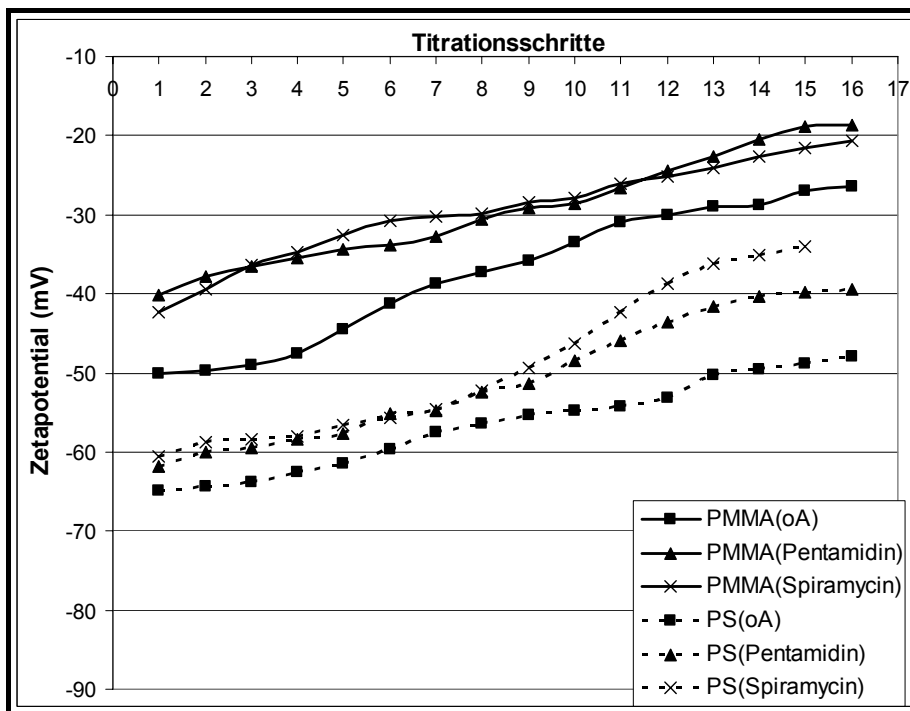


**Abb. 5-15** Zetapotential-Elektrolyt-Profile von MC81- Nanopartikeln in 0,001 m NaCl-Lösung (oA = ohne Arzneistoff)

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-16** Zetapotential-Elektrolyt-Profile von MC80- Nanopartikeln in 0,01 m NaCl-Lösung (oA = ohne Arzneistoff)



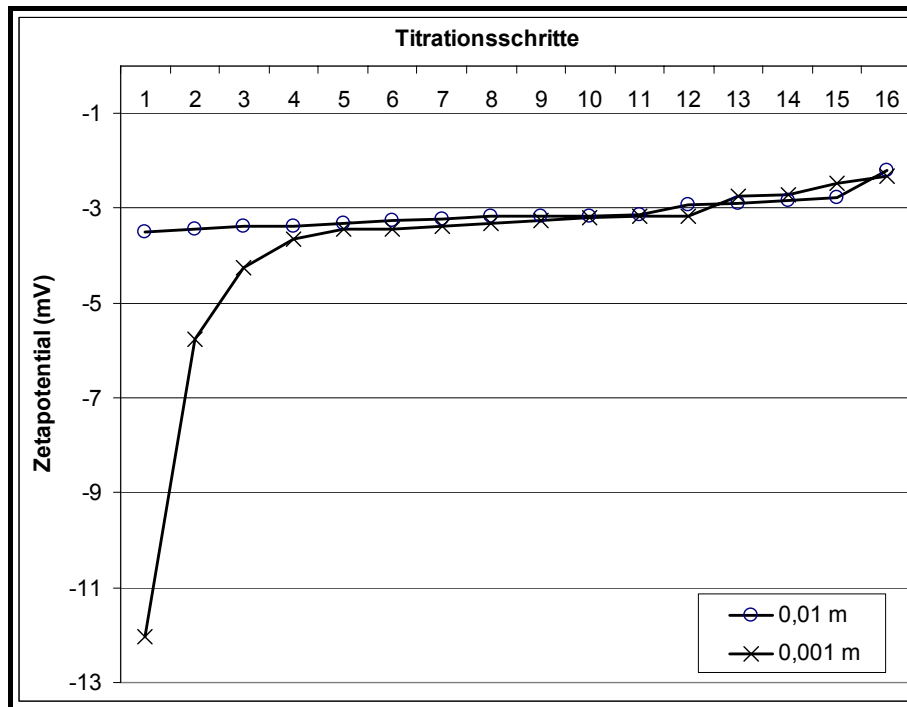
**Abb. 5-17** Zetapotential-Elektrolyt-Profile von MC81- Nanopartikeln in 0,01 m NaCl-Lösung (oA = ohne Arzneistoff)

Auch bei den Kern-Schale-Partikeln mit einer PMMA- und einer PS-Schale führte die Erhöhung der Elektrolytkonzentration im Dispersionsmedium zur Kompression der diffusen



## 5. Ergebnisse und Diskussion

Schicht und damit zu einem Anstieg des Zetapotentials. Auffällig war, dass die ZP/Elektrolyt-Profile der Partikel mit einer PMMA-Schale bei niedrigeren Zetapotentialen verliefen als die Profile der Partikel mit einer PS-Schale. Zurückzuführen war dieses Verhalten wieder auf das unterschiedliche Adsorptionsvermögen der beiden Polymere. Da Polystyren die stärkere Adsorptionsneigung besaß, konnten es mehr Chlorid-Ionen anlagern, woraus negativere Zetapotentiale resultierten.



**Abb. 5-18** Zetapotential-Elektrolyt-Profile von reinen PBCA-Nanopartikeln in 0,01 m und 0,001 m NaCl-Lösung

Die Salztitrationen der reinen Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel zeigten eine überdeutliche Kompression der diffusen Schicht und damit einen Zetapotentialanstieg. An dem starken Anstieg des Graphen der PBCA-Partikel in 0,001 m NaCl-Lösung war zu erkennen, dass die Sensitivität der Partikel mit zunehmender Elektrolytkonzentration abnahm und sich die Zetapotentiale dann kaum noch veränderten.

### 5.1.3 Degradation der Nanopartikel

Bei der Behandlung von Patienten treten häufig dann Therapieprobleme auf, wenn sich die Arzneistoffe nicht hinreichend im Zielgewebe anreichern, dafür aber in anderen Gewebearten und so zu starken Nebenwirkungen führen. Probleme ergeben sich auch, wenn die Wirkstoffe chemisch labil sind und zersetzt werden, bevor sie das Zielgewebe erreichen.

Derzeit gibt es viele Wirkstoffe, die trotz ihres hohen pharmakologischen Potentials aufgrund dieser Bioverfügbarkeits- und Stabilitätsprobleme das Zielgewebe entweder gar nicht oder nur zu einem Bruchteil der verabreichten Menge erreichen und somit als Medikamente nicht zum Einsatz kommen können.

Daher wird versucht, dies mittels Drug-Delivery-Systemen zu überwinden, und so die Wirkstoffe in applizierbare Arzneiformen zu überführen. Damit die in dieser Arbeit verwendeten Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel erfolgreich in den Zellkulturversuchen eingesetzt werden konnten, musste gewährleistet sein, dass die Partikel den inkorporierten Arzneistoff in den Zielgeweben, hier Makrophagen, wieder freisetzen. Aus diesem Grund wurde die Degradation der Partikel durch enzymatischen sowie hydrolytischen Abbau untersucht.

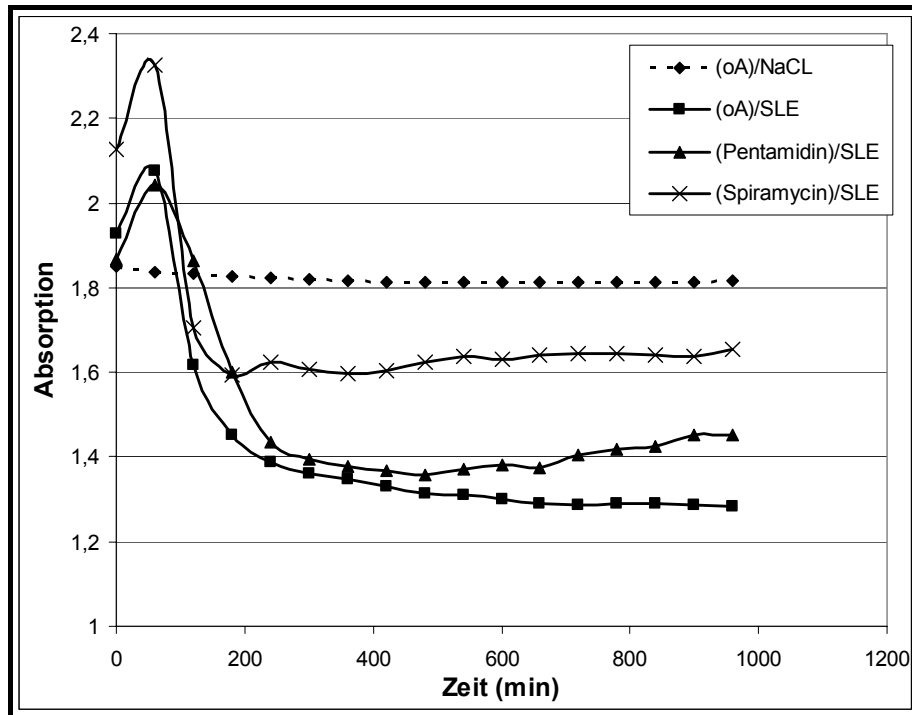
#### 5.1.3.1 Enzymatischer Abbau

Der enzymatische Abbau der Partikeldispersion (0,05%) erfolgte mit einer Schweineleberesterase-Lösung (SLE) und beruhte auf einer Esterspaltung der Polymerseitenkette. Der Abbau wurde über 960 min beobachtet, wobei die Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen wurde. Da die Partikelkerne aus nicht-abbaubarem Polystyren bestanden, konnten nur die Partikelhüllen abgebaut werden. Die Wellenlänge von 412 nm bezog sich auf tabellarisch vorliegende Daten der komplexen Trübungsfunktion zu Polystyren bzw. Polymethylmethacrylat, die den Zusammenhang zwischen Transmission und mittlerem Teilchendurchmesser wiedergeben. Vor diesem Hintergrund wurde ursprünglich die Transmission von Partikeldispersionen bei 412 nm gemessen, um aus den Resultaten die Änderung des Teilchendurchmessers errechnen zu können.

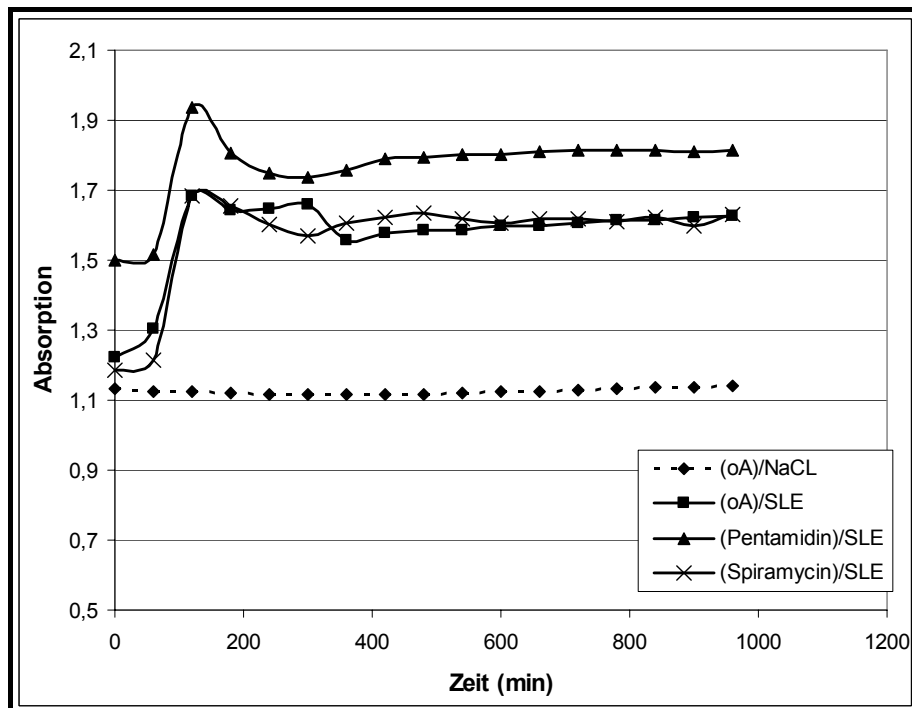
Dann wurden bei Absorptionsmessungen deutlich stärkere Meßwertänderungen registriert. Folglich wurde bei den nachfolgenden Messungen stets die Absorption gemessen. Dies war möglich, da Absorption und Transmission nicht unabhängig voneinander sind, sondern sich gegenläufig verändern. Mit dem Abbau nimmt die Transmission (das Durchlicht in 180°) ab und daher die Absorption zu.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Als Referenz für die Abbaukinetik wurde in den Messserien eine Negativkontrolle mitgeführt. Dabei handelte es sich um Partikel in einer 0,005%igen Kochsalzlösung.



**Abb. 5-19** Enzymatischer Abbau von MC80-PBCA-Nanopartikeln (oA = ohne Arzneistoff, SLE = Schweineleberesterase)



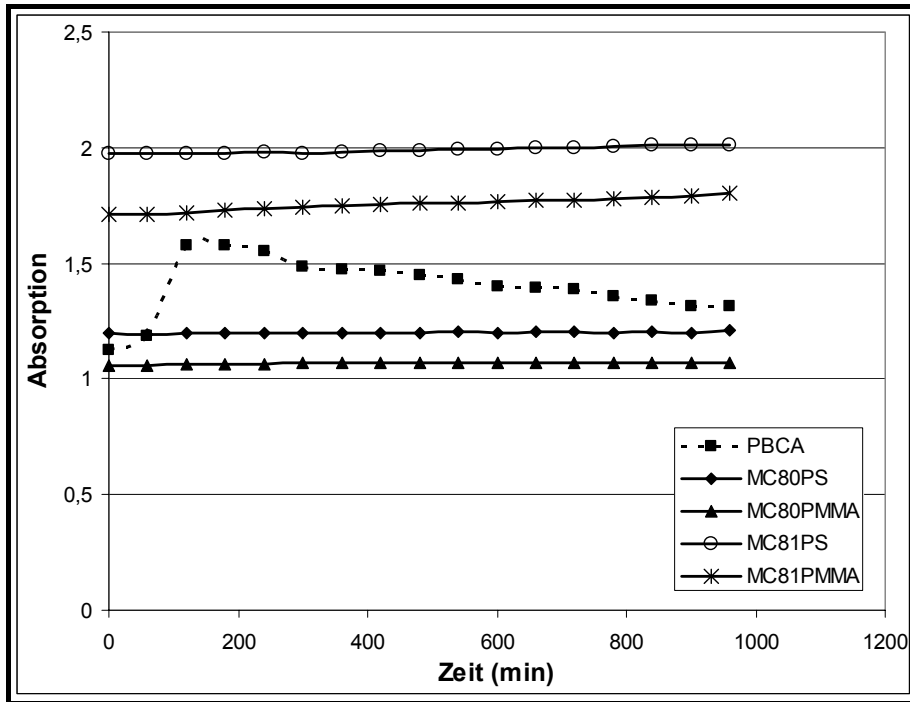
**Abb. 5-20** Enzymatischer Abbau von MC81-PBCA-Nanopartikeln (oA = ohne Arzneistoff, SLE = Schweineleberesterase)

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Der Abbau der Partikel mit einer PBCA-Schale wurde durch die Änderung der Absorption über der Zeit sichtbar (Abb. 5-19 und -20). Aus dem Kurvenverlauf ließ sich ableiten, dass nicht mit einer stetigen, rund um die Partikel gleichmäßigen Erosion von außen nach innen zu rechnen ist. Alternativ zu diesem Ansatz muss man folglich annehmen, dass da, wo die Esterase ansetzt, eine überaus starke, lokale Schädigung der Schale erfolgt (Modell: Schweizer Käse). Die Ursachen für den Absorptionsanstieg konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bis ins Detail verfolgt werden. Vermutet werden sie in durch den Abbau aufquellenden, lokal zerstörten Partikelschalen sowie ins Medium austretenden Polycyanocarbonsäuren. Das freigesetzte Butanol führt zu keiner Absorptionsänderung. Solche Gebilde aus intaktem Kern und zerstörter, zerlöcherter Schale ließen in der Küvette weniger Licht durch als glatte, intakte Kugeln, wodurch die Absorption letztlich anstieg. Im Gegensatz dazu erfolgte bei den Negativkontrollen, wie erwartet, kein Abbau. Die drastischen Absorptionsänderungen, gleich zu Beginn jedes erfolgreichen Abbauexperiments und der insgesamt rasche Verlauf bis zur Konstanz der Absorption (unter Rührbedingungen) ließ den Schluss eines Zusammenhangs mit einem burst release, d.h. einem schnellen Ausstoß des Wirkstoffes, zu (Illum et al. 1986). Die zerstörte PBCA-Schale nach dem enzymatischen Abbau bewirkte eine kolloidale Instabilität der Partikelsuspension. Die Partikel aggregierten, wahrscheinlich verhakten sie mit ihren herausstehenden Ketten. Erkennbar wurde dies durch ein Aufklaren in der Küvette, wenn die Rührung beendet wurde. Die Partikel setzten sich ab, die Absorption nahm sehr deutlich ab. Dieser Effekt war bei den großen MC80-Partikeln stärker ausgeprägt. Denn sie sedimentierten schneller und bei gleichem Feststoffgehalt war ihre Partikelkonzentration gegenüber den kleineren MC81-Teilchen deutlich geringer. Erkennbar war dieses am deutlichen Absinken der gemessenen Absorption unter den Ausgangswert.

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-21** Enzymatischer Abbau arzneistofffreier Nanopartikel (PBCA = reine PBCA-Partikel, PS = PS-Schale, PMMA = PMMA-Schale)

Abbildung 5-21 zeigt die Abbaukinetik reiner Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel, sowie die von Partikeln mit einem Polystyren-Kern und einer Polymethylmethacrylat- bzw. Polystyren-Schale. Während bei den PBCA-Partikeln der erwartete Abbau erfolgte, geschah er bei den Partikeln mit der PMMA- und PS-Schale, wie erwartet, in diesem Zeitrahmen nicht. Zurückzuführen ist dieses Verhalten auf die stark unterschiedliche Biodegradierbarkeit der verschiedenen Polymere. Polymethylmethacrylat ist zwar biodegradierbar, wird aber nur mit einer langsamen Geschwindigkeit abgebaut, während die ebenfalls biodegradierbaren Polyalkylcyanoacrylate schnell abgebaut werden. Um einen Abbau von Polymethylmethacrylat verfolgen zu können, müsste die Versuchsdauer stark erhöht werden. Für den von Kreuter beobachteten, langsamen Abbau von Polymethylmethacrylat wurden daher im Rahmen dieser Untersuchungen keine Hinweise gefunden. Polystyren ist dagegen nicht biodegradierbar und kann daher auch nicht durch Enzyme abgebaut werden.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

### 5.1.3.2 Hydrolytischer Abbau

Zusätzlich zum Partikelabbau durch unspezifische Esterase wurde der Abbau durch alkalische Hydrolyse untersucht. Obwohl die Partikel in Zellkulturen nie so extremen pH-Werten ausgesetzt sein würden, wurden die Partikel mit einer PBCA-Schale, die in dieser Arbeit die Hauptpartikelpopulation darstellten, trotzdem drastischen Hydrolyse-Versuchen unterworfen, um sie vollständig zu charakterisieren.

Wie beim enzymatischen, erfolgte auch beim hydrolytischen Abbau nur eine Degradation der Schale, da der Polystyren-Kern selbst unter aggressiven, alkalischen Bedingungen nicht wirksam angegriffen wurde.

Die Hydrolyse der Partikel wurde bei pH-Werten von 13 und 14 durchgeführt. Versuche bei niedrigeren pH-Werten führten zu keiner Veränderung der Dispersionen. Im Gegensatz zum enzymatischen Abbau wurde der hydrolytische nicht mittels UV/Vis-Messungen bestimmt, sondern es wurde mittels PCS die Partikelgrößenabnahme registriert. Die PCS-Messungen erfolgten nach einem, drei und sieben Tagen.

Die Messungen nach einem Tag zeigten noch keine Abnahme der Partikelgröße. Nach drei Tagen konnte eine Größenabnahme gemessen werden.

**Tab. 5.8** PCS-Werte der Partikel ohne Arzneistoff zu Beginn des Versuches, nach drei und nach sieben Tagen (Tag 0 = Partikelgröße zu vor der Zugabe der Natronlauge)

	Tag 0	pH 13		pH 14	
		Tag 3	Tag 7	Tag 3	Tag 7
<b>MC80cs</b>	280,8 nm	240,2 nm	240,8 nm	240,2 nm	239,9 nm
<b>MC81cs</b>	213,4 nm	175,6 nm	175,1 nm	174,9 nm	175,3 nm

Die Größenabnahme der Partikel von der Ausgangsgröße zur gemessenen Größe am 3. Tag betrug bei den größeren MC80cs-Partikeln 14,5% und bei den kleineren MC81cs-Partikeln 17,6%. Die am dritten Tag gemessenen Partikelgrößen gaben den maximalen Schalenabbau wieder, da sich die Partikelgrößen zum 7. Tag hin nicht mehr veränderten. Ein kompletter Abbau der Schale konnte aber nicht erreicht werden. Die Kerngrößen von 203 nm bzw. 133 nm wurden nicht erreicht.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

### Fazit

Die Untersuchung des Abbaus der Partikelschale zeigte, dass die in dieser Arbeit verwendeten Polymerpartikel den inkorporierten Arzneistoff nicht nur durch Diffusion, sondern auch durch enzymatischen Abbau freisetzen konnten. Damit war sichergestellt, dass der freie Arzneistoff nach Partikelphagozytose und anschließendem Abbau der Schale am gewünschten Wirkort, also die Makrophagen, vorliegen konnte. Da der enzymatische Abbau innerhalb von 200 min erfolgte, war gewährleistet, dass der Arzneistoff während des dreitägigen Zellkulturversuchs freigesetzt wurde und seine Wirkung entfalten konnte.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass es sich nicht um einen vollständigen Abbau handelte, da nur die Esterbindungen gespalten wurden und die Polymerkette erhalten blieb. Die Esterspaltung führte nicht nur zur Freisetzung der Arzneistoffe, sondern auch zu deutlichen Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften der Partikel. Die ursprünglich kompakte Schale wird gelockert („Schweizer Käse“) und wahrscheinlich ragen einzelne Polymerketten wie Tentakel in die Umgebung. Dies würde die verminderte Stabilität der Suspension erklären. Elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten zeigen, ob diese Vorstellungen der Realität entsprechen.

Im Gegensatz zum enzymatischen Abbau, bei dem die Partikelschale lokal durchlöchert wurde, erfolgte bei der alkalischen Hydrolyse folglich offenbar ein eher gleichmäßiger und kontinuierlicher Abbau von der Partikeloberfläche ins Innere. Erkennbar war dies dadurch, dass beim hydrolytischen Abbau die Partikelgröße bei weiterhin niedrigen Polydispersitätsindices ( $< 0.09$ ) abnahm. Zudem blieb die Dispersion über die Versuchstage stabil. Dagegen wurden bei PCS-Messungen der enzymatisch abgebauten Partikeldispersionen Durchmesser von über 1 bis 3  $\mu\text{m}$  erhalten. Der Grund hierfür war, dass die Partikel beim enzymatischen Abbau nicht gleichmäßig von außen nach innen abgebaut wurden, sondern die Esterasen sich in die Schale „hineinbohrten“ und die Schale anschließend wie ein „Schweizer Käse“ mit ausgestülpten Polymerketten vorstellbar war. In diesem Zustand war die Dispersion instabil, d.h. die Partikel aggregierten oder verklebten, was zu diesem enormen Parameter-Anstieg bei der PCS-Messung führte.

### 5.1.4 Bestimmung des Wirkstoffgehalts

Nach der Herstellung der mit Arzneistoff beladenen Kern-Schale-Partikel wurde untersucht, welche Mengen an Pentamidin oder Spiramycin von den Partikeln gebunden worden waren. Zu diesem Zweck wurde eine Probe der frisch hergestellten Partikel-Dispersion abgenommen und ohne vorherige Dialyse mittels HPLC vermessen. Auf diese Weise konnte die Arzneistoffmenge bestimmt werden, die während der Polymerisation nicht gebunden wurde, sondern noch frei im Dispersionsmedium vorlag.

Des Weiteren wurde auch die Arzneistoffmenge bestimmt, die beim Abbau der Partikelschale ins Dispersionsmedium abgegeben wurde. Dazu wurden die Partikeldispersionen nach der Dialyse mit einer Schweineleberesterase-Lösung (SLE) versetzt (siehe 4.2.5.1) und nach 24 Stunden die Überstände der zentrifugierten Latices vermessen.

Da Polymethylmethacrylat und Polystyren zu den nur sehr langsam bzw. nicht biodegradierbaren Polymeren gehören, wurden sie unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen nicht abgebaut und somit wurde kein Arzneistoff freigesetzt. Zur Kontrolle, ob während der Lagerung der Partikeldispersionen im Kühlschrank (4 - 8°C) Arzneistoff freigesetzt wurde, wurden die dialysierten Proben nach einem Jahr erneut vermessen.

**Tab. 5-9** Menge an freiem Pentamidin im Dispersionsmedium vor der Dialyse, nach Abbau durch SLE, nach Lagerung von einem Jahr (Menge an bei der Polymerisation eingesetztem Pentamidin = 100%)

	freies Pentamidin		
	vor Dialyse	nach Dialyse	
		nach enzymatischen Abbau	nach einem Jahr Lagerung
<b>MC80-PBCA</b>	0,65%	61,64%	1,20%
<b>MC81-PBCA</b>	3,58%	51,54%	2,97%
<b>MC80-PMMA</b>	18,21%	---	12,28%
<b>MC81-PMMA</b>	19,11%	---	11,29%
<b>MC80-PS</b>	23,78%	---	8,70%
<b>MC81-PS</b>	26,24%	---	10,07%



## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-10** Menge an freiem Spiramycin im Dispersionsmedium (Menge an bei der Polymerisation eingesetztem Spiramycin = 100%)

	freies Spiramycin		
	vor Dialyse	nach Dialyse	
		nach enzymatischen Abbau	nach einem Jahr Lagerung
<b>MC80-PBCA</b>	3,30%	58,90%	3,96%
<b>MC81-PBCA</b>	4,90%	61,64%	4,07%
<b>MC80-PMMA</b>	25,60%	---	11,58%
<b>MC81-PMMA</b>	26,78%	---	11,44%
<b>MC80-PS</b>	27,48%	---	8,58%
<b>MC81-PS</b>	34,24%	---	9,26%

Die relative Beladungsrate gibt an, wie viel Prozent des zugesetzten Arzneistoffs während der Beladung an die oder in den Partikeln gebunden wurde. Die Beladungsrate ist umso besser, je geringer der Anteil des Wirkstoffes ist, der dissoziiert vorliegt. Allgemein sind hohe Beladungsraten wichtig, da dadurch die für eine Applikation notwendige Nanopartikeldosis minimiert werden kann.

Dass bei den Partikeln mit einer PBCA-Schale (MC80-PBCA und 81-PBCA) im Gegensatz zu den Partikeln mit einer PMMA oder einer PS-Schale eine sehr hohe relative Beladungsrate erreicht wurde, ließ sich darauf zurückführen, dass PBCA als Reaktivpolymer („Alleskleber“ Sicomet<sup>®</sup>) besser den Arzneistoff in die Kugelschale einbinden konnte. Während die Arzneistoffe bei der PMMA- und der PS-Schale in ein physikalisches Gitter eingeschlossen und zum Teil auch adsorbiert waren, konnten die Arzneistoffe bei der PBCA-Schale zusätzlich durch „Festkleben“ gebunden werden.

Durch den Abbau der PBCA-Schale konnten 50 - 60% der Arzneistoffe wieder gefunden werden. Der übrige Arzneistoff blieb vermutlich an den abgebauten Schalenresten oder an abgelösten Polymerketten haften und konnten daher nicht mittels der HPLC erfasst werden.

Zur Überprüfung, wie viel Arzneistoff während der Lagerung aus den Partikeln freigesetzt wurde, wurden die Partikel nach einem Jahr erneut vermessen. Hierbei zeigte sich, dass bei den Kern-Schale-Partikeln mit einer Polybutylcyanoacrylat-Schale nur 1 bis 4% der ursprünglich eingesetzten Arzneistoffmenge freigesetzt worden war. Bei den Referenzpartikeln mit der Polymethylmethacrylat- oder Polystyren-Schale wurden dagegen zwischen 8 und 12% an Arzneistoff freigesetzt. Da die Partikel nach einem Jahr Lagerung im Kühlschrank nicht an Größe verloren hatte, erfolgte die Arzneistoff-Freisetzung durch Diffusion aus der Schale in

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

das Dispersionsmedium bzw. durch Desorption von der Oberfläche. Durch den Klebstoffcharakter des Polybutylcyanoacrylats war der überwiegende Teil des Arzneistoffes chemisch fest gebunden, so dass die Diffusion bei diesen Partikeln stark vermindert war. In der Folge wiesen diese Partikel auch noch nach einem Jahr eine hohe relative Beladungsrate auf. Die Diffusion der Arzneistoffe während der Lagerung war bei den Partikeln mit einer Polystyren-Schale weniger stark ausgeprägt als bei denen mit einer Polymethylmethacrylat-Schale, was sich auf den hydrophoberen Charakter des Polystyren zurückführen lässt. Hier dürfte eine stärkere Arzneistoffadsorption / -desorption auftreten.

### Fazit

Die Bestimmung des Wirkstoffgehalts zeigte, dass bei den Standard-Partikeln mit einer PBCA-Schale eine höhere Beladungsrate möglich war als bei den Referenz-Partikeln mit einer PMMA- bzw. PS-Schale. Für den Einsatz in der Zellkultur und auch in der Therapie ist eine hohe Beladungsrate wichtig, da so die angewandte Partikeldosis reduziert werden kann. Des Weiteren zeigte sich, dass 50 - 60% der eingesetzten Arzneistoffmenge in den Makrophagen wieder freigesetzt werden würden, wenn der Abbau analog zu den *in vitro* Bedingungen erfolgt. Damit kann intrazellulär mit einer hohen Wirkstoffkonzentration gerechnet werden.

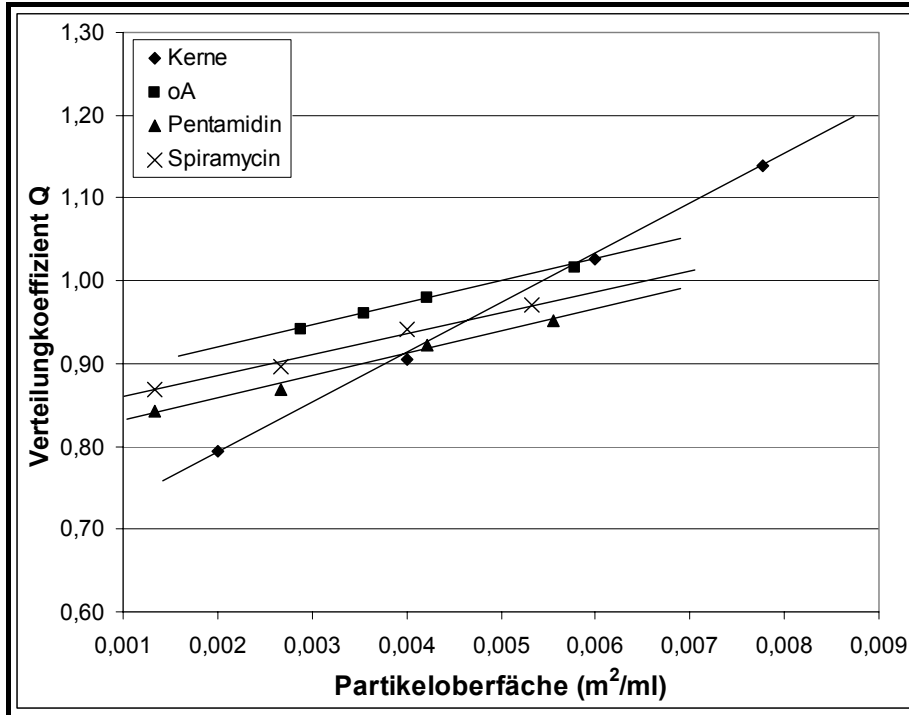
### 5.1.5 Oberflächenhydrophobie

Die Bestimmung der Oberflächenhydrophobie erfolgte über den Bengal Rosa-Verteilungskoeffizienten  $Q$ . Sie ist ein wichtiger Parameter, um Aussagen über die Interaktionen von Bakterien oder von Nanopartikeln mit Zellen des RES (*in-vitro*) sowie über deren Verteilung im Körper (*in-vivo*) treffen zu können (Gessner et al., 2000). Eine zunehmende Oberflächenhydrophobie führt zur erhöhten hydrophoben Interaktion mit den Phagozyten und somit zu einer verstärkten Phagozytose. Dies beruht darauf, dass die Oberflächenhydrophobie die Interaktionen mit Blutbestandteilen, unter anderem Immunglobuline und Apolipoproteine, und somit die Opsonisierung beeinflusst. Daran anschließend erfolgt die Entfernung durch das RES (Carstensen et al., 1992).

## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-11** Oberflächenhydrophobie der MC80-PBCA-Kern-Schale-Nanopartikel. Die Steigung der Gerade gilt als Maß der Hydrophobie (oA = ohne Arzneistoff)

MC80-PBCA				
	Kerne	oA	Pentamidin	Spiramycin
Steigung der Geraden (ml/m <sup>2</sup> )	59,8	25,7	26,6	26,7

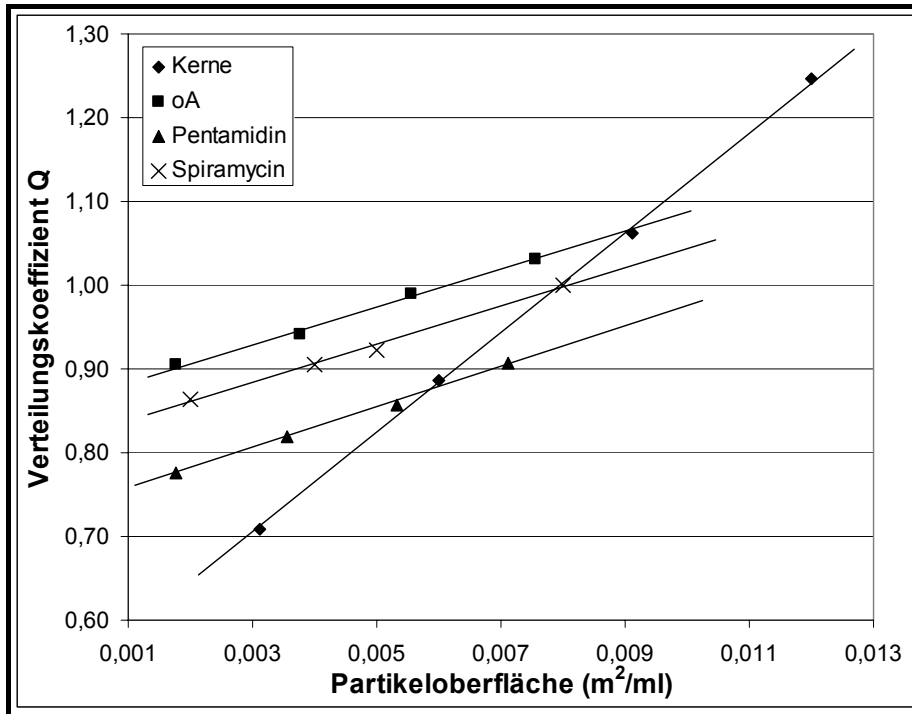


**Abb. 5-22** Bengalrosa-Verteilungskoeffizient (Q) als Funktion der Partikeloberfläche der MC80cs-Nanopartikel

**Tab. 5-12** Oberflächenhydrophobie der MC80cs-Nanopartikel. Die Steigung der Gerade gilt als Maß der Hydrophobie (oA = ohne Arzneistoff)

MC81-PBCA				
	Kerne	oA	Pentamidin	Spiramycin
Steigung der Geraden (ml/m <sup>2</sup> )	60,04	24,5	24,2	25,1

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-23** Bengalrosa-Verteilungskoeffizient (Q) als Funktion der Partikeloberfläche der MC81cs-Nanopartikel

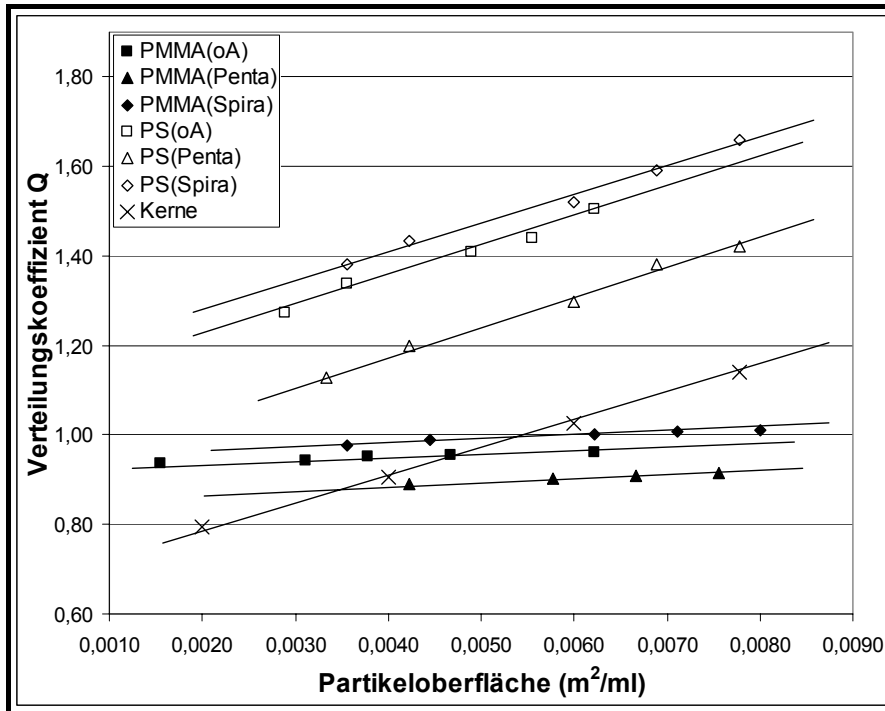
Die Polystyren-Kerne wiesen eine ausgeprägte Oberflächenhydrophobie auf, die durch die Umhüllung mit Polybutylcyanoacrylat abgeschwächt wurde. Da Polybutylcyanoacrylat ein weniger hydrophobes Polymer als Polystyren ist, war diese Abnahme der Oberflächenhydrophobie zu erwarten. Die Beladung mit Arzneistoff hatte dagegen keinen großen Einfluß auf die Hydrophobie, wie die nur geringen Unterschiede in der Steigung der verschiedenen Partikel zeigten.

Neben den Standardpartikeln aus einem Polystyren-Kern und einer PBCA-Schale wurden auch die Referenzpartikel, die aus einem Polystyren-Kern und einer PMMA- und PS-Schale bestanden, sowie reine PBCA-Partikel auf ihre Oberflächenhydrophobie untersucht.

**Tab. 5-13** Oberflächenhydrophobie der MC80 Referenz-Nanopartikel. Die Steigung der Gerade gilt als Maß der Hydrophobie (oA = ohne Arzneistoff, PMMA = Polymethylmethacrylat, PS = Polystyren)

MC80cs						
	PMMA			PS		
	oA	Pentamidin	Spiramycin	oA	Pentamidin	Spiramycin
Steigung der Geraden (ml/m <sup>2</sup> )	6,9	7,2	7,1	64,7	66,4	63,5

## 5. Ergebnisse und Diskussion

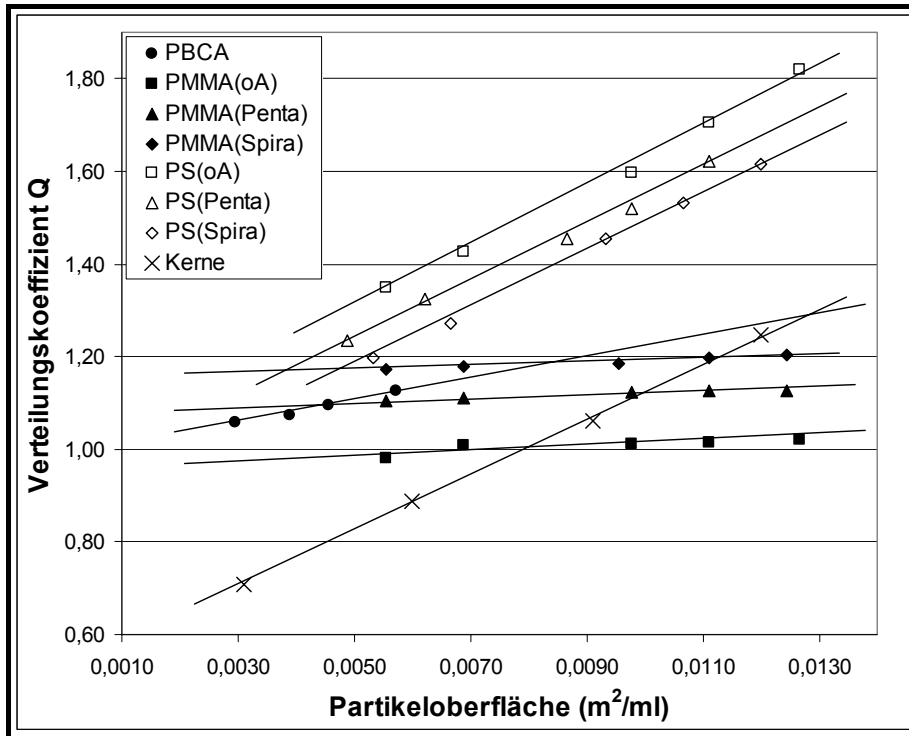


**Abb. 5-24** Bengalrosa-Verteilungskoeffizient ( $Q$ ) als Funktion der Partikeloberfläche der MC80-Referenzpartikel (zum Vergleich sind auch die Kerne mit angeführt)

**Tab. 5-14** Oberflächenhydrophobie der MC81 Referenz-Nanopartikel und der reinen PBCA-Partikel. Die Steigung der Gerade gilt als Maß der Hydrophobie (oA = ohne Arzneistoff, PBCA = Polybutylcyanoacrylat, PMMA = Polymethylmethacrylat, PS = Polystyren)

MC81cs / reine PBCA-NP							
	PMMA			PS			reine PBCA-NP
	oA	Pentamidin	Spiramycin	oA	Pentamidin	Spiramycin	
Steigung der Geraden ( $\text{ml}/\text{m}^2$ )	4,4	3,3	4,2	65,4	60,0	63,2	23,5

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-25** Bengalrosa-Verteilungskoeffizient (Q) als Funktion der Partikeloberfläche der MC81-Referenzpartikel und der reinen PBCA-Partikel (PBCA = Polybutylcyanoacrylat, PMMA = Polymethylmethacrylat, PS = Polystyren)

Die Steigungen der Geraden der Nanopartikel mit einer Polystyren-Schale waren größer als die der Partikel mit einer Polymethylmethacrylat-Schale. Dies bedeutete, dass die Oberflächenhydrophobie der Partikel mit einer Polystyren-Schale stärker ausgeprägt war als bei Partikeln mit einer Polymethylmethacrylat-Schale. Die Geradensteigung der reinen Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel war schwächer ausgeprägt als die der Partikel mit einer Polystyren-Schale aber stärker als die der Partikel mit einer aus Polymethylmethacrylat. Somit lag ihre Oberflächenhydrophobie zwischen denen der beiden anderen Referenzpartikel.

Die Beladung der Nanopartikel mit Arzneistoffen führte zu keinen ausgeprägten Veränderungen in der Oberflächenhydrophobie.

### Fazit

Da die Oberflächenhydrophobie ein bedeutender Parameter für das Ausmaß der Partikelaufnahme in die Zellen ist, wurde sie mit mittels des Bengal Rosa-Verteilungskoeffizienten bestimmt. Frühere Studien zeigten, dass die Phagozytose der Nanopartikel mit zunehmender Oberflächenhydrophobie zunimmt (Müller, 1991 und 1997b). Demnach ließ sich vermuten,

## 5. Ergebnisse und Diskussion

dass die stark hydrophoben Referenz-Partikel mit einer Polystyren-Schale im größten Ausmaß von den Makrophagen phagozytiert werden, gefolgt von den weniger hydrophoben Standard-Partikeln mit einer Polybutylcyanoacrylat-Schale. Die Referenz-Partikel mit einer Polymethylmethacrylat-Schale, die von den untersuchten Partikeln am hydrophilsten waren, werden voraussichtlich am wenigsten von den Zellen aufgenommen.

### 5.1.6 Oberflächenladungsdichte

Ein weiterer Parameter zur Charakterisierung der Nanopartikel war die Oberflächenladungsdichte. Ihre Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Partikelladungsdetektors (PCD-03; MÜTEK). Die negativ geladenen Partikeldispersionen wurden mit einem positiv geladenen Polyelektrolyten Poly(DADMAC = Diallyldimethylammoniumchlorid) titriert. Aus dem Verbrauch des kationischen Titrationsreagenzes ließen sich - über die eingebrachten Ladungsmengen - die Oberflächenladungsdichten errechnen.

**Tab. 5-15** Oberflächenladungsdichte der Partikelkerne und der Kern-Schale-Nanopartikel (c = core, cs = core-shell, PBCA = Polybutylcyanoacrylat, PMMA = Polymethylmethacrylat, PS = Polystyren oA = ohne Arzneistoff, Penta = Pentamidin, Spira = Spiramycin)

Oberflächenladungsdichte ( $\mu\text{C}/\text{qcm}$ )		PBCA	PMMA	PS	reine PBCA- Nanopartikel
<b>MC80c</b>		-2,054	----	----	-0,892
<b>MC80cs</b>	<b>oA</b>	-1,474	-2,507	-2,690	
<b>MC80cs</b>	<b>Pentamidin</b>	-0,817	-2,278	-2,504	
<b>MC80cs</b>	<b>Spiramycin</b>	-1,563	-2,149	-2,794	
<b>MC81c</b>		-2,541	----	----	
<b>MC81cs</b>	<b>oA</b>	-0,933	-2,227	-2,562	
<b>MC81cs</b>	<b>Pentamidin</b>	-0,9627	-2,667	-2,728	
<b>MC81cs</b>	<b>Spiramycin</b>	-1,0642	-2,437	-2,436	

Die Oberflächenladungsdichten der Partikel mit einer PBCA-Schale nahmen im Vergleich zu denen der Kerne stark ab. Dieses Verhalten wurde auch erwartet, da Polybutylcyanoacrylat nur schwach geladen ist und daher auch nur eine geringe Ladungsdichte aufweisen kann. Bestätigt wurde dies durch die Oberflächenladungsdichte-Messung der reinen PBCA-Partikel, die ebenfalls nur eine geringe Ladungsdichte aufwiesen.

Die Ladungsdichten der Partikel mit einer Polystyren-Schale, die im Vergleich auch die stärker negativen Zetapotentialen aufwiesen, waren höher als die der entsprechenden Partikel mit

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

einer Polymethylmethacrylat-Schale. Das stärker negative Zetapotential ließ sich auf eine höhere Oberflächenladungsdichte zurückführen. Ein Einfluß der Arzneistoffe auf die Oberflächenladungsdichte ließ sich nicht erkennen.

### **Fazit**

Da ungeladene Nanopartikel weniger von Makrophagen phagozytiert werden, war es für diese Arbeit wichtig, dass mit geladenen Partikeln gearbeitet wurde. Demnach war eine hohe Oberflächenladungsdichte Voraussetzung, um eine ausgeprägte Partikelaufnahme gewährleisten zu können. Da die Oberflächenladungsdichten der Referenz-Partikel mit einer PMMA- bzw. PS-Schale höher waren als die der Standard-Partikel mit einer PBCA-Schale, war im Hinblick auf diesen Parameter eine erhöhte Phagozytose der Referenz-Partikel vermuten.

### **5.1.7 Absättigung der Nanopartikel mit Proteinen**

Für eine Versuchsreihe in der Zellkultur wurden die Nanopartikel vor ihrem Einsatz mit Rinderserumalbumin oder Antikörpern abgesättigt. Bei den Antikörpern handelte es sich um ein Patientenserum mit positivem Toxoplasmose-Titer. Die Inkubation der Partikel mit den Proteinen erfolgte über 24 Stunden.

Die Absättigung der Partikel mit den Proteinen wurde durchgeführt, um standardisierte Partikel zu erhalten. Das Zellkulturmedium, in dem die Makrophagen und auch die Toxoplasmen inkubiert wurden und in dem auch die Zellversuche abliefen, war mit 10% fetales Kälberserum supplementiert. Bei der Zugabe der Nanopartikel in die Zellkultur adsorbierten Serumbestandteile an den geladenen Partikeln. Diese Absättigung der Oberfläche mit Serumproteinen könnte je nach den Eigenschaften der Partikel oder der Zusammensetzung des Serums variieren. Um eine unterschiedliche Oberflächenbeladung mit Serumbestandteilen zu vermeiden und damit ein gleiches Aufnahmeverhalten in die Makrophagen zu bewirken, wurden die Partikel vor den Versuchen mit Proteinen abgesättigt. Dadurch erhielt man definierte, sich in der Zellkultur gleich verhaltende Partikel.



## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1.7.1 Absättigung mit Proteinen

Die Absättigung der Kern-Schale-Partikel (PS/PBCA) mit Proteinen wurde bestimmt, um zu überprüfen, wie viel Protein an den Partikeln adsorbierte. Dazu wurden Partikeldispersionen im Verhältnis 1 : 1 mit den Proteinen 24 Stunden lang inkubiert. Die Nanopartikel wurden abzentrifugiert und die Überstände spektralphotometrisch vermessen. Die auf der Partikeloberfläche adsorbierte Menge an Proteinen ergab sich aus der Differenz der Konzentration der ursprünglich eingesetzten Protein-Lösung und der Konzentration im Dispersionsmedium.

**Tab. 5-16** Anteil der Proteine im humanen Antiserum in % auf der Partikeloberfläche (oA = ohne Arzneistoff) (eingesetzte Antikörpermenge = 100%)

Probe	% auf Partikeloberfläche
MC80-PBCA(oA)	58,10
MC80-PBCA(Pentamidin)	57,72
MC80-PBCA(Spiramycin)	56,65
MC81-PBCA(oA)	71,73
MC81-PBCA(Pentamidin)	68,40
MC81-PBCA(Spiramycin)	66,38

**Tab. 5-17** Anteil des Rinderserumalbumins in % auf der Partikeloberfläche (oA = ohne Arzneistoff) (eingesetzte Rinderserumalbumin = 100%)

Probe	% auf Partikeloberfläche
MC80-PBCA(oA)	77,00
MC80-PBCA(Pentamidin)	76,44
MC80-PBCA(Spiramycin)	77,65
MC81-PBCA(oA)	77,04
MC81-PBCA(Pentamidin)	71,48
MC81-PBCA(Spiramycin)	76,72

Die Absättigung mit Proteinen aus humanen Antiserum lag bei den größeren MC80cs-Partikeln zwischen 56% und 58%, während bei den kleineren MC81cs-Partikeln 66 bis 72% der Antikörper auf den Partikeln adsorbiert wurden. Eine Abhängigkeit der Adsorption von der Beladung mit Arzneistoffen ließ sich nicht ableiten. Die Absättigungen mit Rinderserumalbumin waren dagegen bei den größeren und kleineren Partikeln sehr ähnlich aber deutlich höher. Auch hierbei wurde die Proteinadsorption nicht von den Arzneistoffen beeinflusst.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Die Vermessung der im Überstand befindlichen Proteine bedeutete, dass die Partikel vollständig abgesättigt, aber dennoch ungebundene Proteine vorhanden waren. Man konnte daher von einer vollständig mit Proteinen abgesättigten Partikeloberfläche ausgehen.

### 5.1.7.2 Zetapotential der abgesättigten Nanopartikel

Das Zetapotential der mit Proteinen abgesättigten Standardpartikel mit einer PBCA-Schale wurde gemessen, um die Interaktionen des Rinderserumalbumins und der Serumantikörper mit den Partikeln zu bestimmen und um eine Aussage über die Aufnahme in die Makrophagen treffen zu können. Die Messungen der abgesättigten Partikel wurden in Reinstwasser durchgeführt, um eine Kompression der diffusen Schicht zu verhindern und um die Ladungsunterschiede der Partikel sensitiver zu ermitteln.

Nach der Absättigung der Nanopartikel mit Rinderserumalbumin oder mit Patientenserum (Antikörper) resultierte das gemessene Zetapotential aus der Adsorption von Blutkomponenten. Tabelle 5-22 zeigt die gemessenen Zetapotentiale der Kern-Schale-Partikel ohne Arzneistoff (oA) und mit Arzneistoff im mit Proteinen abgesättigten Zustand. Zum Vergleich wurden auch die Zetapotentiale der nicht abgesättigten Partikel aufgeführt.

**Tab. 5-22** Zetapotentiale der mit Rinderserumalbumin (RSA) und Antikörper (AK) abgesättigten Nanopartikel in Reinstwasser (cs = core-shell)

	nicht abgesättigt	RSA	AK
<b>MC80-PBCA(oA)</b>	-92,1 mV	-47,9 mV	-72,6 mV
<b>MC80-PBCA(Pentamidin)</b>	-79,9 mV	-35,7 mV	-60,1 mV
<b>MC80-PBCA(Spiramycin)</b>	-88,6 mV	-34,9 mV	-62,4 mV
<b>MC81-PBCA(oA)</b>	-84,8 mV	-40,9 mV	-79,1 mV
<b>MC81-PBCA(Pentamidin)</b>	-79,7 mV	-29,6 mV	-57,3 mV
<b>MC81-PBCA(Spiramycin)</b>	-81,2 mV	-33,8 mV	-63,9 mV

Durch die Absättigung der Partikel mit den Proteinen veränderte sich das Zetapotential der MC80cs-Nanopartikel von -80 bis -90 mV auf -35 bis -50 mV, bei den mit Rinderserumalbumin abgesättigten Partikeln und auf -60 bis -70 mV bei den mit Antikörper abgesättigten Partikeln. Die Zetapotentiale der MC81cs-Nanopartikel veränderten sich von -80 mV auf -30 bis -40 mV bei Partikeln, die mit Rinderserumalbumin abgesättigt waren und auf -60 bis -80 mV bei den mit Antikörper abgesättigten Partikeln.

Die hohen Zetapotentialunterschiede zwischen abgesättigten und nicht abgesättigten Partikeln zeigten, dass die Partikeloberfläche stark mit Proteinen besetzt war. Durch die Adsorption des

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Rinderserumalbumins wurde die Beweglichkeit der Nanopartikel im elektrischen Feld deutlich stärker beeinflusst als durch die Beladung mit Proteinen des humanen Antiserums, was sich in den weniger negativen Zetapotentialen widerspiegelte. Bei dieser Aussage muss jedoch beachtet werden, dass die Zetapotentiale mit dem Smoluchowski-Modell berechnet wurde, was genau genommen nur für glatte Kugeln zulässig ist. Gibt es aber Haare, Schlaufen oder Tentakeln auf den Partikeln, die durch die adsorbierten Proteine entstanden sind, so müsste das Zetapotential mittels des „hairy layer“-Modells berechnet werden. In dieser Arbeit wurde sich aber für die Nutzung des Smoluchowski-Modells entschieden, da die Proteine vergleichsweise klein sind, und es sich daher eher um eine Kugel mit glatter Oberfläche handelt.

### **Fazit**

Bei *in-vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, dass partikuläre Arzneistoffträger nach einer i.v. Applikation sofort mit Plasmaproteinen in der Blutbahn interagieren. Dabei ist das Ausmaß dieser Interaktionen von den physikochemischen Eigenschaften der Partikel abhängig. Die Zusammensetzung des Adsorptionsmusters bestimmt die Organverteilung im Körper (Prinzip der „Differenzierenden Adsorption“) (Müller, 1991). So wird z.B. die Phagozytose durch die so genannte Opsonisierung gefördert, d.h. durch Adsorption von Blutbestandteilen, die die Phagozytose durch Zellen des RES verstärken. Zu den Opsoninen gehören z.B. Immunglobulin G und die Komponenten des Komplementsystems, für die spezifische Rezeptoren auf den Zellen des RES vorhanden sind. Demnach konnte angenommen werden, dass die Partikel, die mit Patientenserum abgesättigt waren im Vergleich zu den nicht abgesättigten Partikeln in einem stärkeren Ausmaß von den Makrophagen phagozytiert werden würden. Dagegen gehört Albumin zu den so genannten Dysopsoninen und führt daher zu einem gewissen Schutz vor der Partikelphagozytose (Gessner, 2001). Daraus konnte eine verminderte Phagozytose der mit Rinderserumalbumin abgesättigten Partikel vermutet werden. Es musste jedoch beachtet werden, dass die Nanopartikel bei ihrem Einsatz in der Zellkultur mit dem darin enthaltenen fetalem Kälberserum in Kontakt kommen wird, wodurch auch bei den mit Albumin abgesättigten Arzneistoffträgern eine Opsonisierung stattfinden könnte. Daher ließ sich keine genaue Vorhersage über das Aufnahmeverhalten der abgesättigten im Vergleich zu den nicht abgesättigten Partikeln treffen.

### 5.2 Entwicklung des *in-vitro* Modells

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein *in-vitro* Modell als Ersatz eines Tierversuchs zu entwickeln, mit dem der Einfluß von an Nanopartikeln gebundenen Arzneistoffen auf intrazelluläre Parasiten verfolgt werden konnte. Zu diesem Zweck wurde mit einer Zellkultur von phagozytierenden Zellen gearbeitet. Es sollte ein Modell geschaffen werden, das über mehrere Tage kontinuierlich beobachtet werden konnte und das reproduzierbare Daten hervorbrachte.

Ob ein neuer Wirkstoff oder ein schon bekannter Wirkstoff in einer neuen Formulierung eine signifikante Verbesserung einer Therapie hervorruft, muss experimentell überprüft werden. Dazu stehen Tiermodelle oder *in-vitro* Modelle zu Verfügung. Da in der heutigen Forschung versucht wird, Tiermodelle weitestgehend durch *in-vitro* Modelle zu ersetzen, werden immer komplexere zelluläre Systeme entwickelt. So wurde zu Beginn dieser Arbeit ein stark vereinfachtes *in-vitro* Modell (Zellen + *Toxoplasma gondii* + Nanopartikel) analysiert, das anschließend erweitert wurde (z.B. durch unspezifische Antikörper). Auf diesem Wege wurde das *in-vitro* einem *in-vivo* Modell angenähert. Ein großer Vorteil ist das Erkennen einzelner Auswirkungen nach Erweiterung des Modells.

Die Bewertung der Versuche erfolgte neben der Mikroskopie insbesondere mit der Durchflußzytometrie (FACS- Fluorescence Activated Cell Scanning). Das *in-vitro* Modell bestand aus einer Zellpopulation (Makrophagen), *Toxoplasma gondii* GFP (grün fluoreszierendes Protein) und den zu bewertenden Latexpartikeln mit oder ohne Arzneistoff. Durch Hinzufügen von „Counting Beads“ zu den Proben, war eine Bestimmung der Anzahl der extrazellulären *T. gondii* neben den Makrophagen möglich. *T. gondii* exprimiert ein grün fluoreszierendes Protein und daher korrelierte die gemessene Fluoreszenzintensität mit der Anzahl der intrazellulären *T. gondii*. Da die infizierten Zellen eine stärkere Grünfluoreszenz im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen besaßen und man sie daher unterscheiden konnte, war sowohl die Anzahl der infizierten Zellen, als auch das Ausmaß der Infektion (Parasiten/Zelle) messbar. Bei den im folgenden Text genannten Standardpartikeln handelt es sich um die Kern-Schale-Nanopartikel mit einem Polystyren-Kern und einer Polybutylcyanoacrylat-Schale.

### 5.2.1 Auswahl der geeigneten Nanopartikel

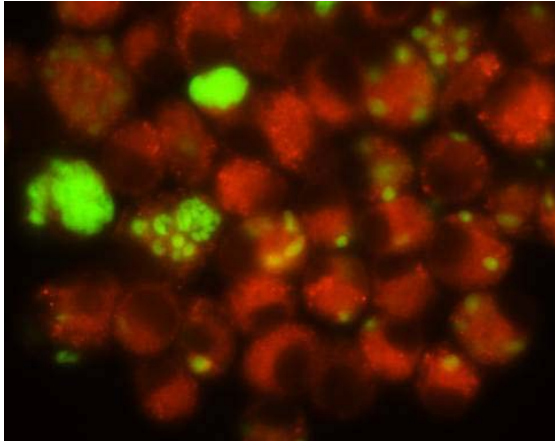
Um Partikel und Parasiten nebeneinander mit der Durchflusszytometrie oder dem Mikroskop auswerten zu können, mussten die Partikel farblich von den Parasiten unterschieden werden. Ein Vorteil dabei war, dass sowohl bei der Durchflusszytometrie als auch bei der Mikroskopie verschiedenen Filter zur Verfügung standen und daher die Parasiten unter Verwendung des grünen Filters vermessen werden konnten, während für die Bestimmung der Partikel ein anderer Filter gewählt wurde. So erfolgte eine Messung beider Parameter ohne gegenseitige Beeinflussung. Um die FACS-Messungen interpretieren zu können, war ein Vergleich der Werte mittels Mikroskopie nötig. Dazu mussten die Nanopartikel erkennbar ( $> 150$  nm) und farblich von den grünen Toxoplasmen unterschieden sein. Eine Identifizierung kleinerer extra- und vor allem intrazellulärer Partikel wäre mikroskopisch nicht möglich gewesen (Abb. 5-27). Untersucht wurden Polystyren-Nanopartikel, die mit Methylcoumarin, Coumarin und Rhodamin B markiert waren. Die mikroskopische Auswertung der Proben aus Makrophagen, *T.gondii* und Nanopartikeln ergab, dass die mit Rhodamin B markierten Nanopartikeln bei Benutzung des orangen Filters zu erkennen waren, während die mit Methylcoumarin und Coumarin gelabelten Partikel dies nicht waren. Untersuchte man die Proben unter dem grünen Filter konnte man die Toxoplasmen gut erkennen. Die mit Methylcoumarin und Coumarin gelabelten Nanopartikel waren, waren nur mit dem blauen Filter zu erkennen aber das auch nur schwach. Aufgrund der intensivsten Fluoreszenz der mit dem roten Farbstoff markierten Partikel, waren sie für mikroskopische Versuche am besten geeignet und wurden daher für diese Arbeit verwendet. Ebenso konnten sie bei den FACS-Messungen mit Hilfe des orangen Filters erfasst werden.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

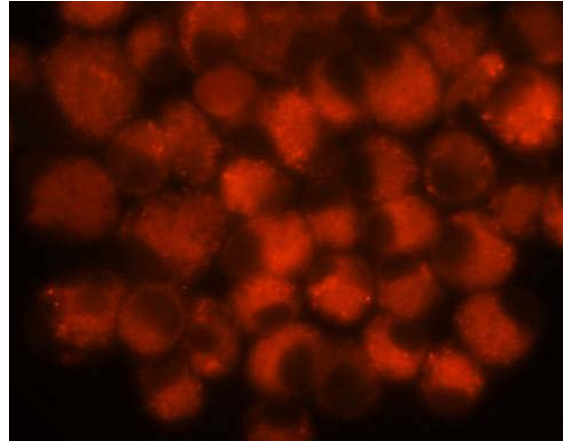
---

Die folgenden Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigen mit Rhodamin B gelabelten Partikel in der Zellkultur.

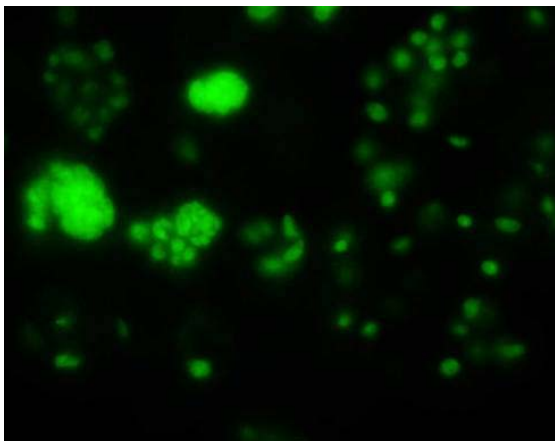
a)



b)



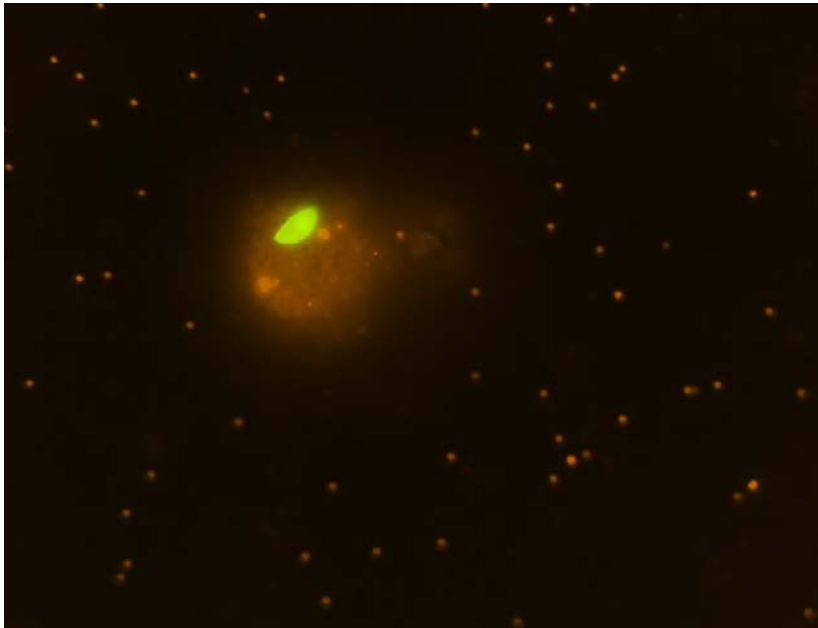
c)



**Abb. 5-26** Makrophagen, *Toxoplasma gondii* (GFP) und mit Rhodamin B gelabelte Nanopartikel. Aufnahme mit zwei Filtern (grün und rot) (a), sowie den einzelnen roten (b) und grünen (c) Filtern

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---



**Abb. 5-27** Mit *T.gondii* infizierte Makrophage, sowie intra- und extrazellulären Partikeln mit einer Größe von 213 nm

Ein weiteres Auswahlkriterium für die Nanopartikel bestand darin, dass die Partikel das Wachstum der Makrophagen nicht beeinträchtigen oder sogar zu einem Absterben der Zellen (Zytotoxizität) führen durften. Um die Beeinflussung der Partikel auf die Zellen bewerten zu können, wurde mit einem Lebend-Tod-Farbstoff gearbeitet. Bei diesen Toxizitäts-Versuchen, wurde mit zwei verschiedenen Partikelkonzentrationen gearbeitet. Dabei wurden die Konzentrationen gewählt, die für die bevorstehenden Versuche am geeignetsten waren (siehe 5.2.2). Es handelte es sich um ca. 60000 bzw. 24000 Partikel pro Zelle.

Das Ergebnis dieser Versuche zeigte, dass weder Polystyren- noch Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel zum Absterben der Zellen führten und daher Kern-Schale-Partikeln aus diesen Polymeren für den Einsatz in der Zellkultur geeignet waren.

### 5.2.2 Auswahl der geeigneten Nanopartikel- und Parasitenkonzentrationen

Damit das *in-vitro* Modell über mehrere Tage laufen konnte, mussten geeignete Konzentrationen an Zellen, Parasiten und Partikeln gefunden werden. Das Verhältnis aus Makrophagen und Zellen sollte so eingestellt werden, dass es auch am dritten Tag noch intakte Zellen gab und nicht alle Zellen durch Toxoplasmen zerstört wurden (Leyke et al. 2005). Versob sich das Verhältnis zu Gunsten der Toxoplasmen, waren die Zellen schon nach kurzer Zeit zerstört und der Versuch musste abgebrochen werden. In einer Versuchsreihe wurde getestet, welche Zellen/Parasiten-Verhältnisse für die anstehenden Versuche am besten geeignet waren. Dazu wurden definierte Mengen einer Zellsuspension, deren Zellenanzahl pro Mikroliter mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt worden war, in Wells einer 24-Wellplatte pipettiert. Hinzu kamen verschiedene Parasitenkonzentrationen, welche als MOI (multiplicity of infection) angegeben waren und das Verhältnis von Zellen zu Parasiten beschrieb. Die Tests wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und einmal wiederholt. Gearbeitet wurde mit MOI's von 1 bis 10. Die Abbildungen 5-28, 29, 30 zeigen die Ergebnisse von diesen Versuchen.  $1,36 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter wurden infiziert mit MOI's von 1, 2, 5 und 10. Die Versuche erstreckten sich über drei Tage und zur Kontrolle des Zellwachstums lief parallel eine Zellkontrolle mit. Infizierte Zellen konnten durch das Vorhandensein einer Grünfluoreszenz von nicht-infizierten Zellen unterschieden werden. Die durch das GFP verursachte Fluoreszenz erlaubte eine durchflusszytometrische und mikroskopische Analyse dieses Systems.

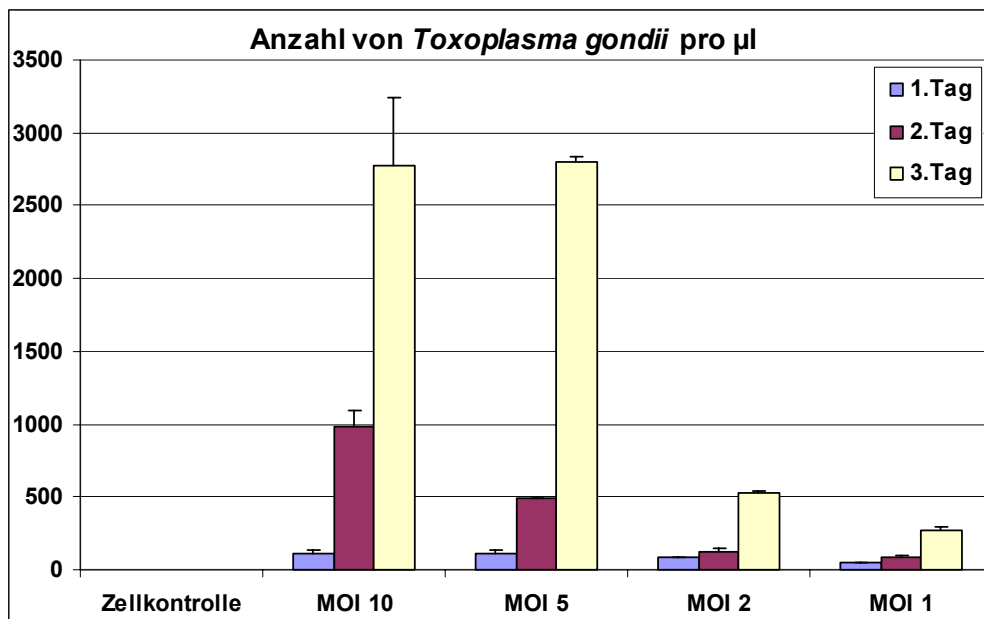


Abb. 5-28 Anzahl der extrazellulären *Toxoplasma gondii* pro Mikroliter



## 5. Ergebnisse und Diskussion

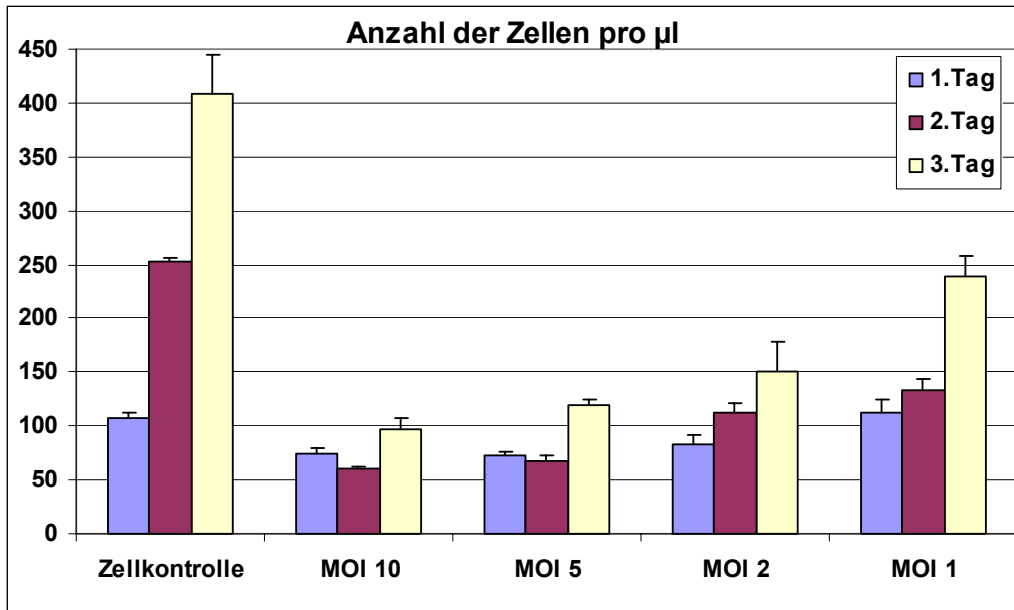


Abb. 5-29 Gesamte Anzahl der Zellen pro Mikroliter

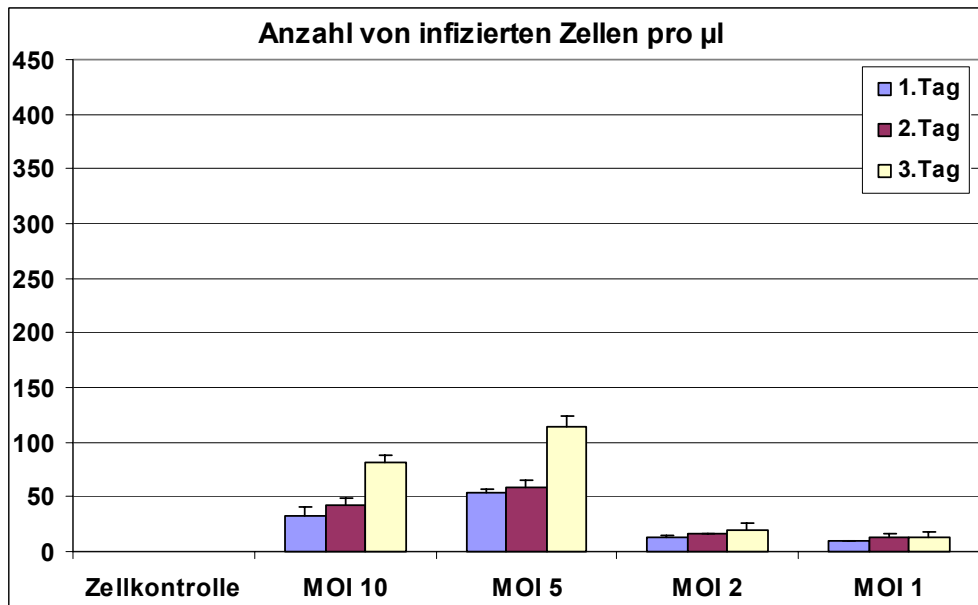


Abb. 5-30 Anzahl der mit *Toxoplasma gondii* infizierten Makrophagen pro Mikroliter (zum besseren Vergleich mit der Gesamtzellzahl wurde die gleiche Skalierung gewählt)

Die Anzahl der extrazellulären Toxoplasmen nahm bei den Zellen/Parasiten-Verhältnissen (MOI) von 1 zu 10 und 1 zu 5 über die drei Versuchstage stark zu, während sie sich bei einer MOI von 2 und 1 nur wenig bis gar nicht veränderten.

Gleichzeitig stieg die Gesamtzellzahl über die drei Versuchstage an, wenn auch nur weniger im Vergleich zu der Zellkontrolle. Die Abbildung der Anzahl der mit *T.gondii* infizierten Zel-

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

len ließ erkennen, wie viele Zellen mit den Parasiten infiziert waren. Je weniger *T.gondii* eingesetzt wurden, desto geringer war die Anzahl der infizierten Zellen und desto höher war die Anzahl der nicht-infizierten. Solange nicht-infizierte Zellen vorhanden waren, erfolgte der Prozess der Infektion und Vermehrung.

Bei MOI 10 und 5 waren nach drei Tagen alle Zellen infiziert während bei MOI 2 und 1 noch viele nicht-infizierte Zellen vorhanden waren. Das Ergebnis, dass bei MOI 5 am dritten Tag mehr Zellen infiziert waren als bei MOI 10, ließ erkennen, dass es sich hierbei um eine sehr aggressive Infektion handelte. Die Makrophagen wurden schneller zerstört und daher war die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl infizierter Zellen geringer als bei MOI 5.

Aus diesen Versuchen ließ sich ableiten, dass eine MOI von 2, also ein Zellen/*T.gondii*-Verhältnis von 1 zu 2 am besten für die bevorstehenden Versuche geeignet war, da hierbei sowohl die Anzahl der Zellen als auch der Parasiten über die drei Versuchstage zunahmen. Dieses galt als Voraussetzung für das *in-vitro* Modell. MOI 1 wäre zwar auch für die Versuche geeignet aber da der Effekt der Heilung des Systems, also Abtötung der Toxoplasmen, untersucht werden sollte, war es notwendig auch einen Anstieg von Toxoplasmen zu haben.

Zudem musste eine geeignete Konzentration an eingesetzten Partikeln gefunden werden. Die Partikelkonzentration sollte dabei so groß gewählt sein, dass alle Zellen Partikel aufnehmen konnten und die Aufnahme sicher messbar war. Andererseits sollte die Partikelkonzentration auch so niedrig wie möglich sein, da das Ziel eines Drug Targeting ist, die eingesetzte Dosis zu vermindern, um die Nebenwirkungsrate abzusenken. Dazu wurden Versuche durchgeführt, die den Einfluß der Nanopartikel auf die Vermehrung der Zellen sowie der Toxoplasmen während der drei Versuchstage darstellen sollten. Es wurde mit vier verschiedenen Partikelkonzentrationen gearbeitet:

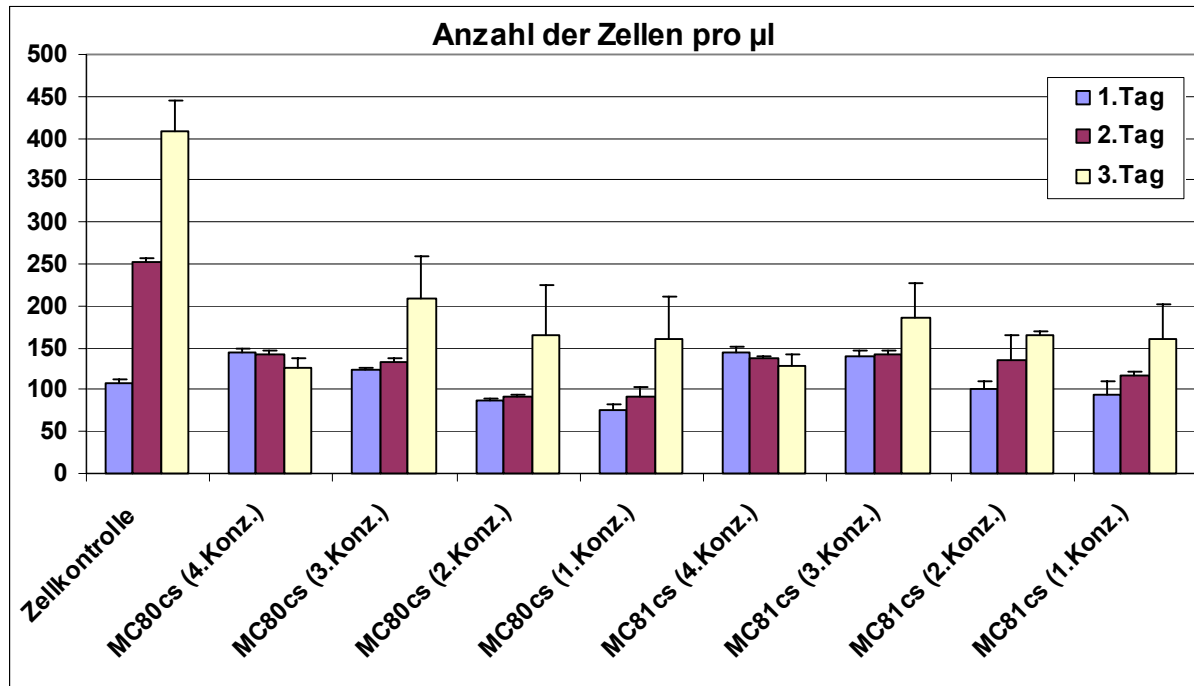
Konzentration 1 : 12 000 NP/Zelle

Konzentration 2: 24 000 NP/Zelle

Konzentration 3: 60 000 NP/Zelle

Konzentration 4: 118 000 NP/Zelle

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-31** Anzahl der Makrophagen pro Mikroliter bei verschiedenen eingesetzten Partikelkonzentrationen

Die Anzahl der Zellen am ersten Tag war bei den Proben mit den hohen Partikelkonzentrationen drei und vier größer als bei den Proben eins und zwei sowie auch bei der Zellkontrolle. Es ließ vermuten, dass die Partikel ein Signal zur verstärkten Zellproliferation auslösten. Während bei den Proben mit der höchsten Partikelkonzentration die Zellanzahl am zweiten und dritten Tag abnahm, stieg sie bei den anderen Konzentrationen an. Da die Toxizitätsversuche zeigten, dass die Partikel in den eingesetzten Konzentrationen keine zytostatische Wirkung auf die Zellen hatten, ließ darauf schließen, dass die Abnahme der Zellzahl eher von der großen Anzahl der Partikel als von deren Toxizität abhing. Die große Anzahl der Partikel pro Zelle könnte dazu führen, dass die Zellen sich nicht mehr leicht vermehren konnten. Aber nicht nur bei der höchsten Partikelkonzentration war ein Einfluß auf die Vermehrung der Makrophagen zu erkennen, sondern auch bei den anderen Konzentrationen wurde das Zellwachstum im Vergleich zu der Zellkontrolle beeinflusst. Da die Zellen Partikel phagozytiert hatten, war vermutlich durch die Aktivierung der Zellen ihre Proliferation gehemmt worden. Da die Partikel in der dritten Konzentration, also ca. 60000 Partikel pro Zelle, den etwas stärksten Impuls zur vermehrten Zellproliferation gaben, wurden diese Konzentration in den anstehenden Versuchen verwendet.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Eine Bestimmung der Anzahl der Partikel pro Zelle konnte nicht mit Hilfe der Durchflußzytometrie erfolgen, sondern musste rechnerisch aus der Anzahl der eingesetzten Partikel und der Anzahl der vorhandenen Makrophagen stattfinden. Da die Zellen unter dem Mikroskop sehr gleichmäßig mit Partikel beladen aussahen und daher von einer gleichmäßigen Verteilung der Partikel über die Zellen ausgegangen werden konnte, wurde der errechnete Wert als Beladungsrate angesehen.

Bei den größeren MC80-Nanopartikeln zeigte sich ein Phänomen das einem Quenching entspricht. Die Fluoreszenzzunahme bei steigender Partikelzahl war bei größeren Partikeln geringer als bei den kleineren. Möglicherweise verhindert das größere Volumen die Messung der Emission der im Partikelkern eingeschlossenen Farbstoffe. Daher lagen keine linearen Verhältnisse zwischen Menge der intrazellulären Partikel und der Intensität der Orange fluoreszenz vor.

Neben der Orange fluoreszenz, die durch die Aufnahme der Partikel hervorgerufen wurde, führte auch eine unspezifische Erhöhung der Eigen fluoreszenz der Makrophagen durch die Aufnahme der Partikel zu einer Erhöhung der Orange fluoreszenz. Die Eigen fluoreszenz ist ein Ergebnis des oxidativen Bursts, der ein Ausdruck der Killing-Aktivität der Makrophagen ist. Aus diesen beiden Gründen konnte nicht direkt von der gemessenen Orange fluoreszenz auf die Anzahl der intrazellulären Partikel geschlossen werden. Dennoch bestand eine Proportionalität zwischen der Orange fluoreszenz und der Anzahl der aufgenommenen Partikel. Je mehr Partikel aufgenommen wurden, desto stärker war die Orange fluoreszenz, was auch durch mikroskopische Kontrollen bestätigt wurde.

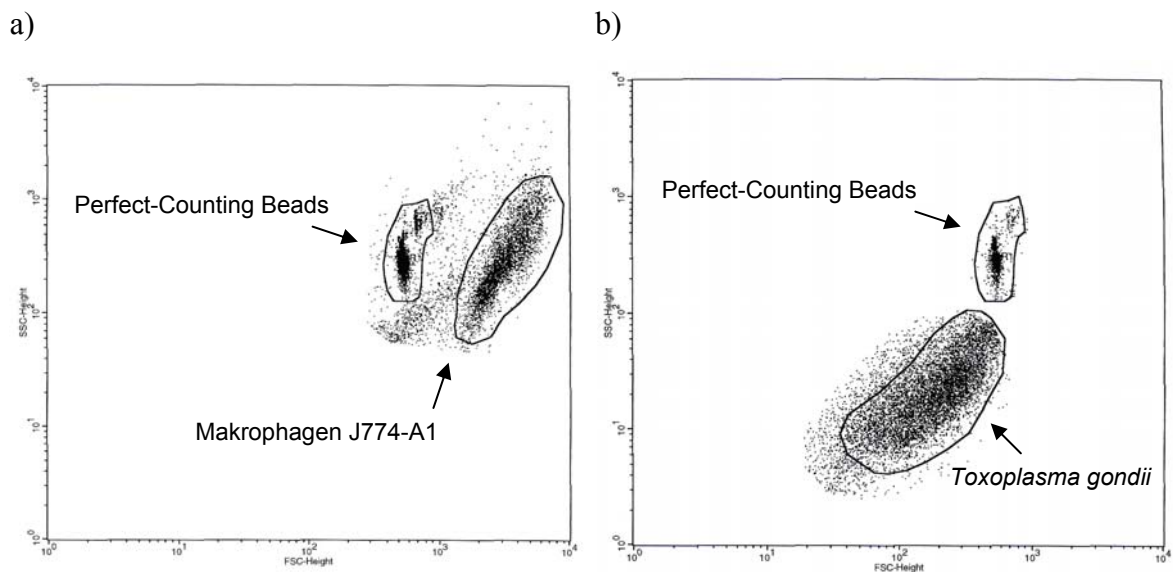
### 5.2.3 Auswertung mit Hilfe der Durchflußzytometrie

Zu einer *Toxoplasma gondii*-infizierten Zellkultur wurden arzneistoffbeladene oder unbeladene Nanopartikel gegeben. Direkt vor der Vermessung mit dem Durchflußzytometer wurden eine definierte Menge der so genannten Counting Beads zu jeder Probe gegeben. Jeder Versuch fand in dreifacher Ausführung statt. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden wurden die Proben durchflußzytometrisch charakterisiert und jeweils 10000 Ereignisse (Toxoplasmen, infizierte und nicht-infizierte Zellen sowie Perfect-Counting Beads) pro Probe erfasst. Die verwendeten Nanopartikel waren zu klein und wurden wie Zelldebris nicht gezählt. Zur Darstellung und Auswertung der Ergebnisse wurde die korrelierte Zweiparameterdarstellung gewählt. Sie zeigte die Relation zweier verschiedener Eigenschaften einer Zelle an. Die Darstellung erfolgte mit den Parametern Granularität (SSC, Seitwärtsstreulicht) und Größe (FSC;

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Vorwärtstreulicht) bzw. Fluoreszenz (FL1 und FL2). Durch anschließendes Setzen von Auswertungsgrenzen (Gating) konnten Toxoplasmen von Counting Beads sowie von Zelltrümmern (Debris) und Aggregaten unterschieden werden. Bei weiteren Analysen wurden dann nur noch die Daten berücksichtigt, die innerhalb der Gates lagen.

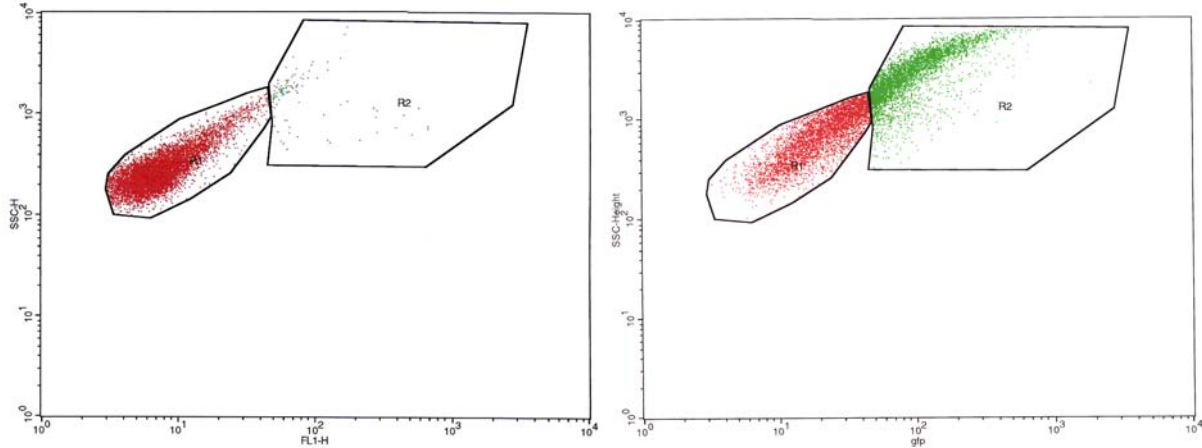
Abbildung 5-32 zeigt Zweiparameter-Dotplotdarstellung einer Zellkontrolle und einer Infektionskontrolle aus Makrophagen und *Toxoplasma gondii*. Um die absolute Anzahl der Zellen und der Toxoplasmen bestimmen zu können, wurde um die Counting Beads ebenfalls ein Gate gesetzt und alle Werte wurden auf die darin gezählten Beads bezogen.



**Abb. 5-32** Darstellung der Partikelgröße (FSC – x-Achse) und Granularität (SSC – y-Achse) in einem Dotplot-Diagramm. a) Makrophagen und b) *Toxoplasma gondii* werden in Relation zu der Anzahl der Perfect-Counting Beads bestimmt. Die Beads erscheinen immer an der gleichen Position.

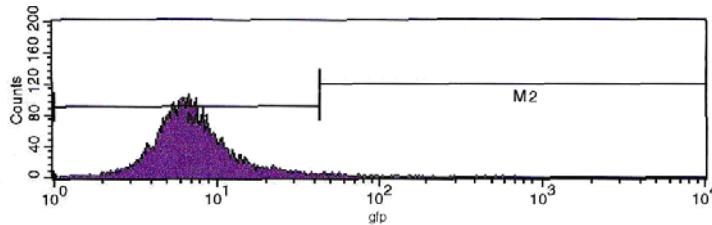
Neben der Anzahl der vorhandenen Zellen oder Toxoplasmen konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie auch deren Fluoreszenzintensität gemessen werden. Abbildungen 5-33 und 5-34 veranschaulichen eine Zweiparameter-Dotplotdarstellung (A) sowie ein Histogramm (B), bei denen die Granularität (SSC) bzw. die Anzahl der Events (Counts) gegen die Grünfluoreszenz (GFP) aufgetragen wurde. Mit diesen Darstellungen konnten die infizierten und nicht-infizierten Zellen voneinander unterschieden werden. Eine Abnahme der Anzahl infizierter und eine gleichzeitige Zunahme nicht-infizierter Zellen über die drei Versuchstage erbrachte neben der Zunahme der Gesamtzellzahl das gewünschte Therapieergebnis.

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-33 a und b** Dotplot-Darstellung einer a) Zellkontrolle und b) Infektionskontrolle (R1 = nicht-infizierte Zellen, R2 = infizierte Zellen)

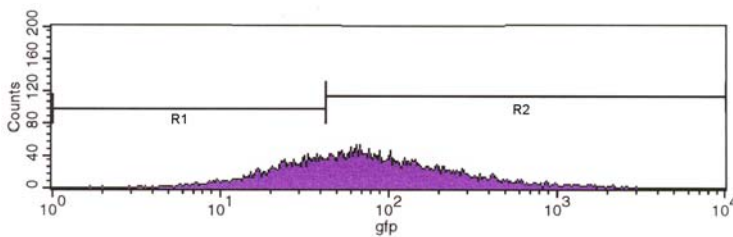
a)



Tube: tube #13 Zellkontrolle

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	9.29	7.30	181.26	6.79
M1	1, 43	9864	98.64	98.64	8.12	7.08	63.11	6.73
M2	43, 9910	139	1.39	1.39	92.97	70.91	115.64	57.25

b)



Tube: tube #6 Zellen+TG

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	127.46	70.30	157.39	66.12
R1	1, 43	3325	33.25	33.25	25.65	23.32	38.65	25.71
R2	43, 9910	6704	67.04	67.04	177.58	121.25	128.86	103.66

**Abb. 5-34 a und b** Histogramm mit dazugehöriger Tabelle einer a) Zellkontrolle und b) Infektionskontrolle

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Die mit angeführten Tabellen zeigen, wie die CellQuest<sup>®</sup> Software die gemessenen Daten präsentiert. Neben der prozentualen Anzahl der gemessenen Ereignisse wurden auch verschiedene Mittelwerte angeführt. Dabei handelte es sich um das geometrische Mittel, den Median und das arithmetische Mittel (Mean). Das geometrische Mittel der Grünfluoreszenz gab Informationen über die Heterogenität der jeweiligen Zellpopulation aber vermied die Überbewertung von sehr stark infizierten einzelnen Makrophagen. Der Median zeigte die Verschiebung der Population zu infizierten oder nicht-infizierten Zellen an. Je näher der Median einer Probe aus mit Nanopartikel behandelten infizierten Zellen dem Median einer Zellkontrolle kam, desto besser war der Therapieerfolg zu bewerten. Das arithmetische Mittel gab Auskünfte über die Toxoplasmenlast. Da das arithmetische Mittel von Ausreißern beeinflusst wurde, führte eine starke Infektion von wenigen Zellen zu einem Anstieg dieses Wertes, obwohl in der Kultur noch viele nicht-infizierte Zellen vorhanden waren.

Da das arithmetische Mittel die Situation der Gesamtpopulation in der Zellkultur am besten wiedergeben konnte, wurde es bei den Versuchen zur Auswertung herangezogen. Je mehr das arithmetische Mittel einer Probe aus Zellen, Toxoplasmen und Nanopartikeln sich dem der Zellkontrolle annährte, desto besser war der Therapieerfolg. Im Hinblick auf den Therapieerfolg durfte aber nicht nur das arithmetische Mittel in die Auswertung mit einbezogen werden, sondern es musste immer im Zusammenhang mit dem prozentualen Anteil der infizierten und nicht-infizierten Zellen betrachtet werden. Erst wenn beide Parameter zur Auswertung herangezogen wurden, konnten aussagefähige Ergebnisse erhalten werden, die einem infizierten Versuchstier nahe kommen. Des Weiteren musste bei der Auswertung in Betracht gezogen werden, dass die Makrophagen durch die Aufnahme von Nanopartikeln unspezifisch aktiviert wurden und dadurch eine unspezifische Fluoreszenz sowohl im Rot- wie auch im Grünfluoreszenzbereich zeigten (Gamazo et al. 2004). Die Zunahme der unspezifischen Fluoreszenz lässt sich mit dem oxidativen Burst erklären. Der oxidative Burst ist eine spezielle Zellfunktion von Phagozyten, der zusammen mit der Phagozytose einen Mechanismus der Immunantwort der Zellen darstellt. Nach der Phagozytose von Mikroorganismen oder Nanopartikeln bildet die Zelle reaktive Sauerstoffspezies, die zur oxidativen Inaktivierung des aufgenommenen Mikroorganismus führen.

Durch den Einsatz der Durchflusszytometrie konnten innerhalb sehr kurzer Zeit die Parameter von 10000 Ereignissen, wie Makrophagen, Toxoplasmen und Counting Beads, charakterisiert werden. Da mit der Durchflusszytometrie eine so große Menge gemessen und statistisch bewertet werden konnte, bietet sie einen großen Vorteil gegenüber der Mikroskopie, bei der nur

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

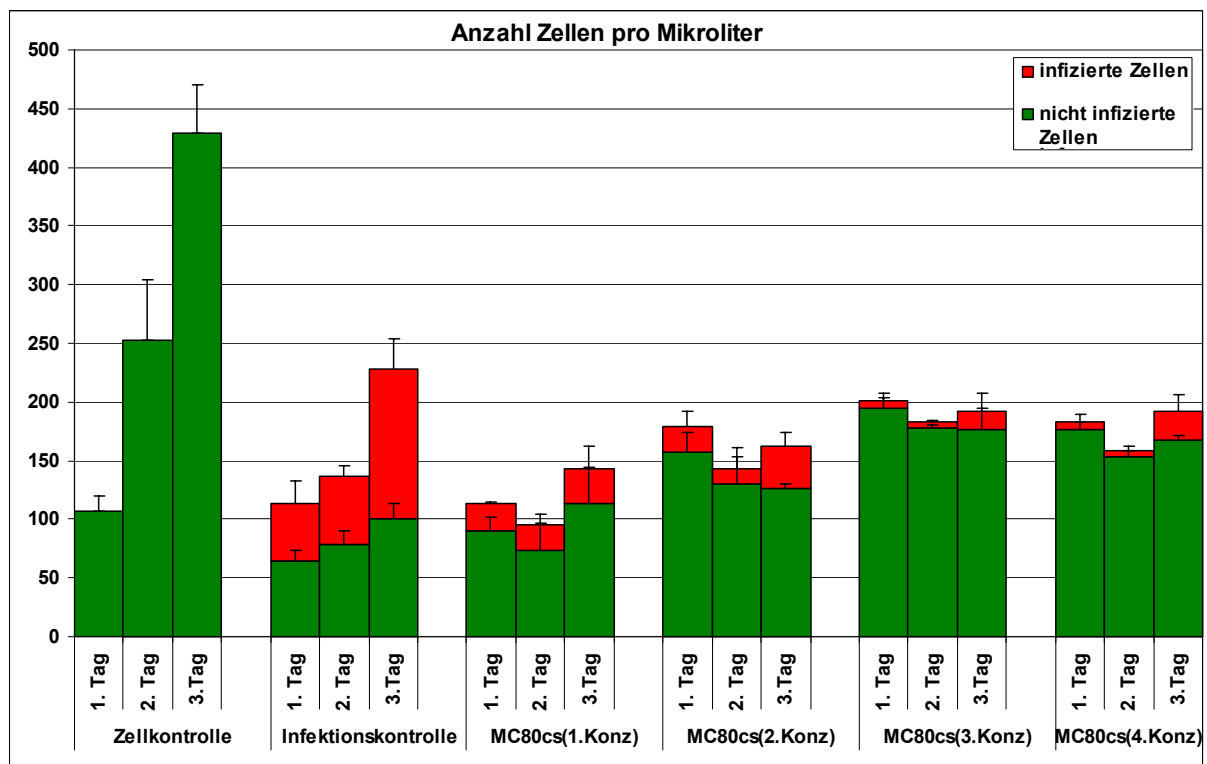
ein kleiner Ausschnitt der Probe analysiert werden kann. Hinzu kommt, dass subjektive Fehler vermieden werden. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass durch das Setzen der Gates zwischen den zu analysieren gewünschten Parametern und Zelltrümmern oder Aggregaten unterschieden werden kann. Es ist zwar nicht möglich die genaue Anzahl der intrazellulären Toxoplasmen oder Nanopartikel zu bestimmen, aber das Ausmaß der Verschiebung in Richtung der Grünfluoreszenz (Toxoplasmen) oder der Orange fluoreszenz (Nanopartikel) ist proportional zur Anzahl der intrazellulären Parasiten oder Partikel.



### 5.3 Anwendung des in-vitro Modells

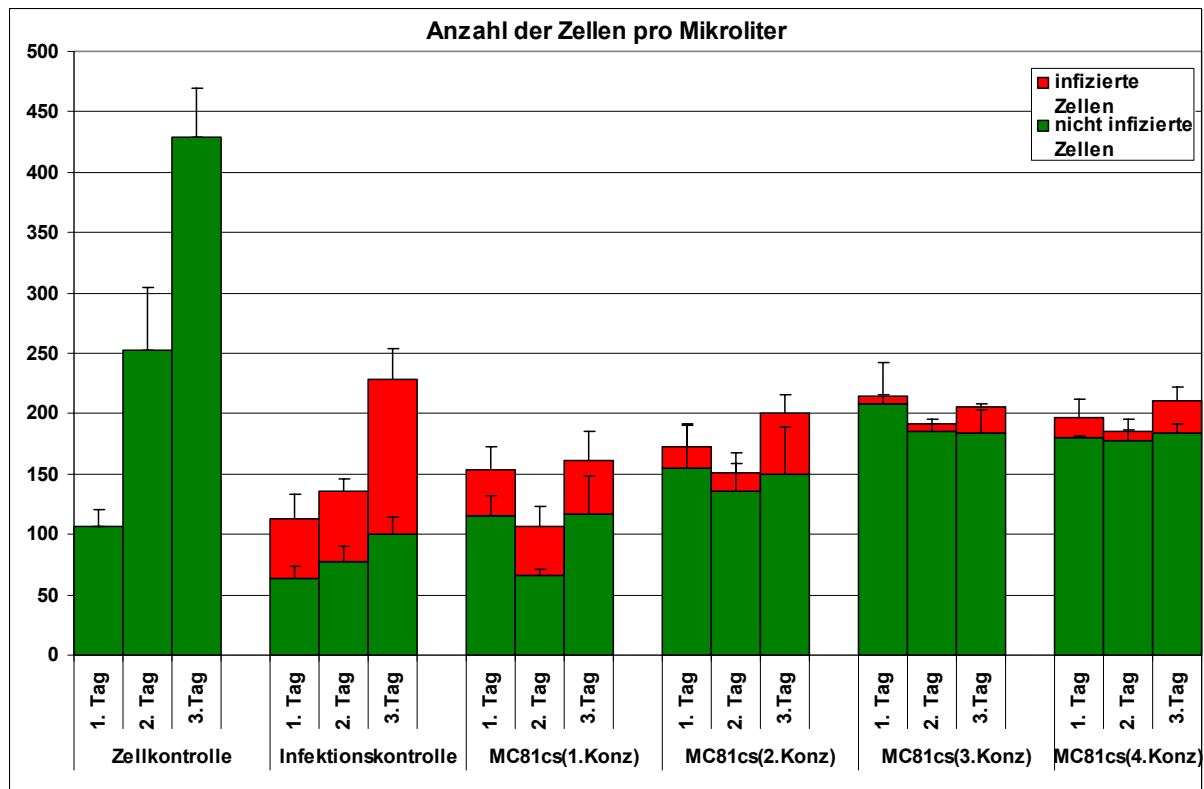
#### 5.3.1 Wirkung von Nanopartikeln ohne Wirkstoff

In den Versuchen, bei denen die geeigneten Partikelkonzentrationen gefunden werden sollten, zeigte sich, dass auch Kern-Schale-Nanopartikel (Polystyren/PBCA) ohne Arzneistoff einen dosisabhängigen Einfluss auf die Parasitenvermehrung aufwiesen. Die folgenden Abbildungen spiegeln Anzahlen der mit Toxoplasmen infizierten Zellen sowie die Anzahl nicht-infizierter Zellen wieder.



**Abb. 5-35** Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit MC80-PBCA-Nanopartikeln ohne Arzneistoff. Die Summe aus beiden ergibt die Gesamtzellzahl der Population (n=6)

## 5. Ergebnisse und Diskussion

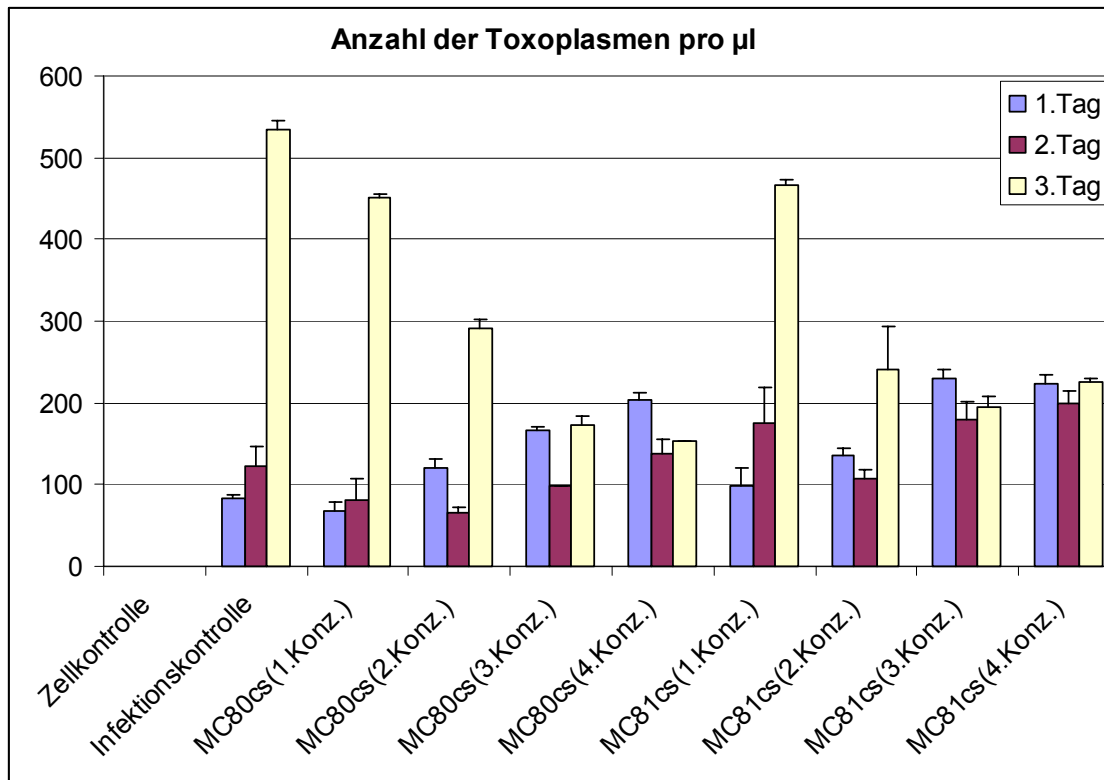


**Abb. 5-36** Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit MC81-PBCA-Nanopartikeln ohne Arzneistoff. Die Summe aus beiden ergibt die Gesamtzellzahl der Population (n=6)

Die Behandlung der infizierten Zellen mit Nanopartikeln führte an allen drei Versuchstagen im Vergleich zu der Infektionskontrolle zu einer Senkung der Anzahl von infizierten Zellen. Dies ließ sich damit erklären, dass die Nanopartikel die von den Parasiten ausgehende Hemmung der Zellfunktionen entgegenwirkten. Dringen Toxoplasmen in eine Zelle, so greifen sie in deren Abwehrfunktionen ein und beeinträchtigen sie (Butcher und Denkers, 2002). Auf diese Weise gelingt es den Parasiten in Makrophagen innerhalb der parasitophoren Vakuole zu überleben und sich dort zu vermehren.

Die unspezifische Stimulation der Makrophagen, die durch die phagozytierten Nanopartikel hervorgerufen wurde, war demnach stärker ausgeprägt als die Hemmung der Zellfunktion durch die Toxoplasmen. Je höher die Konzentration an eingesetzten Partikeln war, desto geringer war die Anzahl der infizierten und desto höher die Anzahl der nicht-infizierten Zellen. Der Einsatz der Nanopartikeldispersionen führte zu einer gesteigerten Zellvermehrung am ersten Versuchstag im Vergleich zu der Zellkontrolle. Die stimulierende Wirkung der Nanopartikel richtete sich daher nicht nur auf die Abwehrfunktionen der Makrophagen aus, sondern zumindest in der Anfangsphase auch auf deren Fähigkeit zur Vermehrung.

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-37** Anzahl der extrazellulären *Toxoplasma gondii* pro Mikroliter nach Behandlung mit Nanopartikeln (PS/PBCA) ohne Arzneistoff (n=6)

Das Ergebnis, dass auch schon Nanopartikel ohne einen Arzneistoff eine Wirkung zeigten, ließ sich auch mit der Anzahl der extrazellulären Toxoplasmen nachweisen. Je größer die Konzentration der eingesetzten Nanopartikel war, desto geringer war die Anzahl der extrazellulären Toxoplasmen. Dass die Anzahl der freien Toxoplasmen am ersten und zum Teil auch am zweiten Tag bei den Proben mit Nanopartikeln höher war als bei der Infektionskontrolle, könnte damit erklärt werden, dass sich die Makrophagen in Anwesenheit von Nanopartikeln vor dem Eindringen, der Parasiten schützen konnten.

Bewertete man den Versuch nicht nur über die Zunahme und Abnahme der Zellen- oder Toxoplasmen-Anzahl, sondern betrachtete auch die Grünfluoreszenz der Zellen, so zeigte sich auch hier, dass die Nanopartikel ohne Arzneistoff eine dosisabhängige Wirkung besaßen (Tabelle 1 im Anhang). Die Betrachtung der Mittelwerte (Mean), die die Toxoplasmenlast der Population wiedergab, stellte dar, dass sich bei der Infektionskontrolle eine starke Verschiebung in Richtung der stärkeren Grünfluoreszenz vollzog, während die Verschiebung der Mittelwerte bei den mit Partikel behandelten Proben verhältnismäßig schwach ausgeprägt war. Je höher die eingesetzte Partikelkonzentration war, desto mehr verschob sich das prozentuale Verhältnis der infizierten und nicht-infizierten Zellen hin zu dem der Zellkontrolle.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Es lässt sich zusammenfassen, dass Nanopartikel auch ohne Arzneistoff einen dosisabhängigen Therapieerfolg aufwiesen, der auf die Stimulation der Makrophagen zurückzuführen war. Die erhöhte Makrophagen-Aktivität kann durch einen gesteigerten oxidativen Burst (unspezifische Fluoreszenzerhöhung) erklärt werden. Zudem beeinflussten die Nanopartikel die Aufnahmefähigkeit der Makrophagen in der Weise, dass an den ersten zwei Versuchstagen weniger Toxoplasmen phagozytiert wurden im Vergleich zu der Infektionskontrolle. Dieser unspezifische Effekt ist sicher nur bei phagozytierenden Zellen zu erwarten, sollte dann aber auch gegen andere Mikroorganismen wirksam sein.

### 5.3.2 Auswirkung von Nanopartikeln mit Arzneistoff

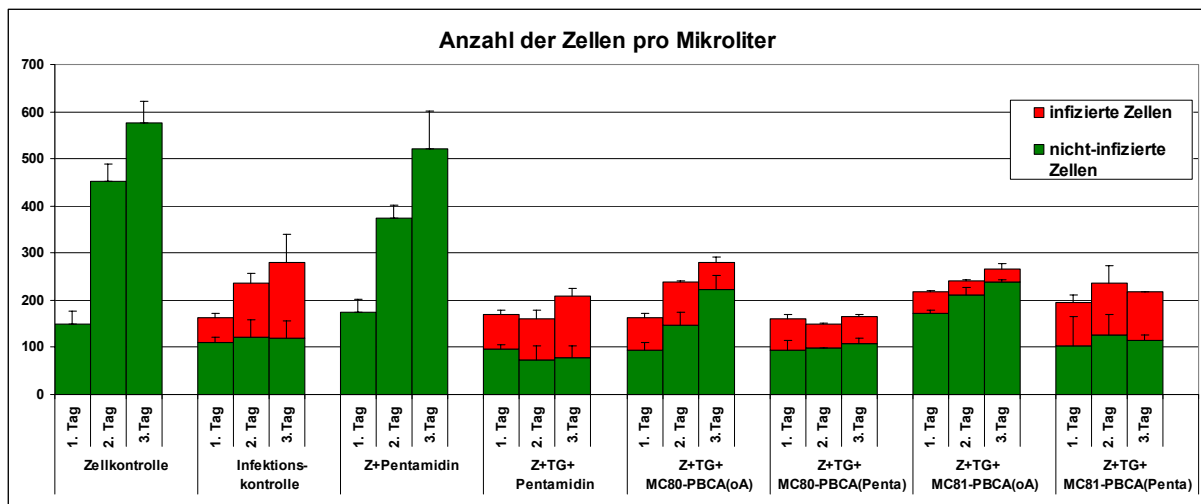
Mit Nanopartikeln als Wirkstoffträger sollte untersucht werden, ob der Therapieerfolg gegenüber der Behandlung mit dem freiem Arzneistoff verbessert werden konnte. Hierfür wurden die beiden Arzneistoffe Pentamidin und Spiramycin eingesetzt.

Zum Vergleich der Wirkung des an Partikel gebundenen oder freien Arzneistoffes wurde bei jedem Versuch eine Probe mit ungebundenem Arzneistoff eingesetzt. Da die freien Wirkstoffe in der Konzentration, die der Menge an eingesetzten gebundenen Arzneistoff entsprach im angewandten Zellkultursystem, keine Wirkung auf die Toxoplasmen zeigten und auch nicht zelltoxisch wirkten, wurde ihre Konzentration auf die zehnfache Menge erhöht. Die Versuche liefen über drei Tage jeweils in drei parallelen Ansätzen. Um auch Aussagen über die Reproduzierbarkeit treffen zu können, wurde jeder Versuch mindestens einmal wiederholt.

#### 5.3.2.1 Pentamidin

Obwohl Pentamidin als Antiprotozoenmittel keinen nachgewiesenen Therapieeffekt bei einer Toxoplasmose aufweist und daher nicht in der Therapie eingesetzt wird, wurde es in dieser Arbeit als Vergleichssubstanz zum Spiramycin verwendet, da es einen breiten antimikrobiellen Effekt aufweist und in einer parallelen Arbeit gegen Leishmanien getestet wird. Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Zunahme und Abnahme der Zellen über die drei Versuchstage. Die gesamte Säule aus infizierten und nicht-infizierten Zellen stellt die Gesamtzellzahl im System dar.

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-38** Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit Nanopartikeln ohne oder mit Pentamidin, Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, oA = ohne Arzneistoff (n=6)

Durch den Vergleich der Infektionskontrolle mit der Probe aus Zellen, Toxoplasmen und freiem Pentamidin konnte die Wirkung des ungebundenen Arzneistoffes auf das System untersucht werden. Wie bei der Infektionskontrolle blieb die Anzahl der nicht-infizierten Zellen über die drei Versuchstage fast konstant und die Anzahl der infizierten Zellen vergrößerte sich. Dabei war die Anzahl der infizierten Zellen bei der Probe mit freiem Pentamidin geringer als bei der Infektionskontrolle. Bevor jedoch vermutet werden konnte, dass freies Pentamidin eine Wirkung gegen Toxoplasmen aufwies, musste auch die Toxoplasmenlast betrachtet werden. Wurden die Mean-Werte der Grünfluoreszenz (hervorgerufen durch das GFP) verglichen, so zeigte sich, dass durch freies Pentamidin keine toxoplasmizide Effekte auftraten (siehe Anhang Tabelle 2). Die Mittelwerte der Grünfluoreszenz der Infektionskontrolle waren nämlich an allen drei Versuchstagen geringer als bei der Probe mit freiem Pentamidin: 1.Tag: 123,99 zu 176,87; 2.Tag: 204,28 zu 292,69 und am 3.Tag: 218,60 zu 235,7. Dies bedeutete, dass die Menge der intrazellulären Toxoplasmen bei der Probe mit freiem Pentamidin höher war als bei der Infektionskontrolle. Beim Vergleich des prozentualen Anteils der infizierten und nicht-infizierten Zellen wurde deutlich, dass bei der Probe mit freiem Pentamidin mehr Zellen infiziert waren als bei der Infektionskontrolle. Nicht am Nanopartikel gebundenes Pentamidin hatte demnach, wie schon erwartet, keinen toxoplasmiziden Effekt. Des Weiteren ergaben die Versuche, dass Nanopartikel ohne Arzneistoff eine bessere Wirkung aufwies als mit Pentamidin beladene Partikel. Zu erkennen war dieses daran, dass bei den Partikeln ohne Arzneistoff insgesamt mehr Zellen pro Mikroliter über die Versuchstage

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

vorhanden waren. Der Vergleich der Toxoplasmenlasten sowie der prozentualen Anteile der infizierten Zellen zeigte, dass diese bei den Partikeln ohne Arzneistoff signifikant niedriger waren als bei den Partikeln mit Pentamidin. Der Unterschied der prozentualen Anteile der infizierten Zellen war dabei zwischen den Proben mit und ohne Pentamidin signifikant. Die Anzahl der extrazellulären Toxoplasmen war bei den eingesetzten Nanopartikeln ohne Arzneistoff signifikant geringer als bei den Partikeln mit Pentamidin.

Die großen mit Pentamidin beladenen MC80-PBCA-Nanopartikel wiesen eine geringere toxoplasemizide Wirkung auf als die kleineren MC81-PBCA-Partikel mit Pentamidin. Dieser Unterschied in der toxoplasemiziden Wirkung war bei den Partikeln ohne Arzneistoff weit ausgeprägter.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Nanopartikel, die nicht mit Arzneistoff beladen waren, durch die höhere Gesamtzellzahl, die niedrigere Anzahl der infizierten Zellen und die geringere Toxoplasmenlast, eher einen therapeutischen Effekt haben als mit Pentamidin beladene Partikel. Obwohl freies Pentamidin in der eingesetzten Konzentration nicht zelltoxisch wirkte und keine toxoplasemizide Wirkung hervorrief, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass an Partikel gebundenes Pentamidin keinen Einfluß auf das System hatte. Dieses zeigte sich dadurch, dass die Partikel mit Pentamidin anders auf das System wirkten als die Partikel ohne. Würde Pentamidin keinen Einfluß ausüben, so hätten bei den Proben mit und ohne Pentamidin die gleichen Ergebnisse erbringen müssen.

Das unterschiedliche Verhalten der Partikel mit und ohne Pentamidin zeigte sich auch bei der Betrachtung der Orange fluoreszenz der Zellen, die durch die aufgenommenen Partikel hervorgerufen wurde. Dabei stellte sich heraus, dass die mit Pentamidin beladenen Partikel in einem signifikant höheren Ausmaß von den Zellen phagozytiert wurden.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-23** Effekte von Nanopartikeln auf die Mittelwerte der Orange fluoreszenzintensität (FL2) der Zellen, R1 = prozentualer Anteil der Zellen die keine Nanopartikeln aufgenommen haben; R2 = prozentualer Anteil der Zellen, die Nanopartikel aufgenommen habe (Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, oA = ohne Arzneistoff, Penta = Pentamidin)

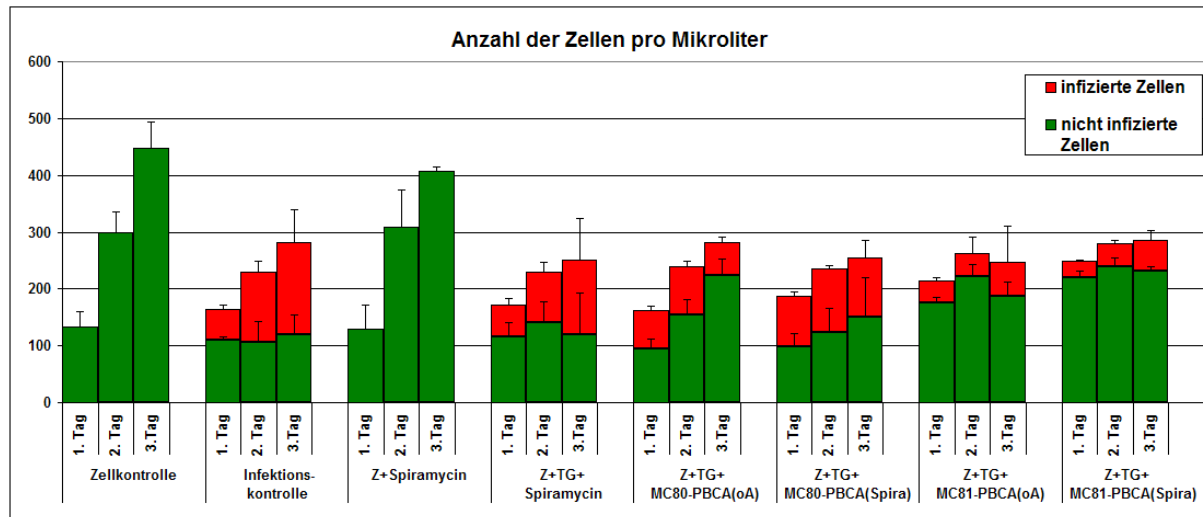
Auswertung nach der Orange fluoreszenz	1. Tag			2. Tag			3. Tag		
	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)
Z+TG+ MC80-PBCA(oA)		88,51	12,08		81,43	16,03		75,50	25,82
Mean	174,9			185,3			203,3		
Z+TG+ MC80-PBCA(Penta)		84,12	14,21		82,96	16,40		73,55	26,01
Mean	136,5			253,7			320,2		
Z+TG+ MC81-PBCA(oA)		90,43	8,37		85,94	14,07		76,03	24,13
Mean	105,7			142,6			167,8		
Z+TG+ MC81-PBCA(Penta)		87,06	7,93		76,49	12,98		80,98	21,10
Mean	127,2			198,3			219,4		

Da die physikochemische Charakterisierung ergeben hatte, dass sich die Nanopartikel nur wenig unterschieden, war zu vermuten gewesen, dass sie sich in den der Zellkultur ähnlich verhalten würden. Dies wurde aber nicht bestätigt, da die Partikel mit Pentamidin stärker von den Makrophagen phagozytiert wurde. Demnach reichen auch die geringen physikochemischen Unterschiede aus, um in verändertes Verhalten in der Zellkultur sowie unterschiedliche toxoplasmiziden Effekte hervorzurufen.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.3.2.2 Spiramycin

Als zweiter Wirkstoff wurde in dieser Arbeit Spiramycin verwendet. Obwohl es nur eine schwache toxoplasmizide Wirkung aufweist, gehört es derzeit zur Standardtherapie der Schwangerschaftstoxoplasmose.



**Abb. 5-39** Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit Nanopartikeln ohne oder mit Spiramycin, Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, oA = ohne Arzneistoff (n=6)

Bei der Kontrolle aus Zellen und freiem Spiramycin ergab sich wie auch beim freien Pentamidin keine zelltoxische Wirkung. Durch die geringere Anzahl an infizierten Zellen gegenüber der Infektionskontrolle über die drei Versuchstage entstand der Eindruck, dass freies Spiramycin in der eingesetzten Konzentration eine gewisse Wirkung auf die Toxoplasmenvermehrung haben könnte. Wurde aber die Bewertung der Toxoplasmenlast der Population hinzugezogen, so stellte sich heraus, dass die Toxoplasmenlast der Probe mit freiem Spiramycin an allen Versuchstagen signifikant höher war als bei der Infektionskontrolle (siehe Anhang Tabelle 3). Daneben war auch der prozentuale Anteil der infizierten Zellen bei der Probe mit dem freien Spiramycin an allen drei Tagen höher als bei der Infektionskontrolle. Gleichzeitig war die Anzahl der extrazellulären Toxoplasmen verglichen mit der Infektionskontrolle fast identisch. Freies Spiramycin führte also bei diesen Versuchen zu keinem Effekt. Dabei musste natürlich beachtet werden, dass unbekannt war, wie viel freies Spiramycin überhaupt in die Zellen gelangte.



## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Gesamtzellzahlen der Proben mit beladenen und unbeladenen Partikeln unterschieden sich nur wenig. Der Vergleich der Grünfluoreszenz der Zellen (siehe Tabelle 3 im Anhang) verdeutlichte, dass die Toxoplasmenlasten sowie die prozentualen Anteile der infizierten Zellen bei den Proben mit den MC80-PBCA(oA)-Nanopartikeln an allen drei Versuchstagen signifikant geringer waren als bei den MC80-PBCA(Spiramycin). Demnach wiesen die MC80-PBCA-Partikel ohne Arzneistoff die deutlich stärkere toxoplasmizide Wirkung auf. Dagegen war bei den kleineren MC81-PBCA-Nanopartikeln der Unterschied zwischen den beladenen und unbeladenen Teilchen nicht so stark ausgeprägt. Durch die etwas bessere Zellenvermehrung, die kleinere Anzahl infizierter Zellen und die geringere Toxoplasmenlast ließ sich ein nicht signifikant besserer Therapieerfolg durch die mit Spiramycin beladenen Nanopartikel erzielen.

Die Analyse des Einflusses der Partikelgröße auf das System zeigte, dass die kleineren MC81-PBCA-Nanopartikel zu einem besseren Therapieerfolg gegenüber den größeren MC80-PBCA-Partikeln führten. Dieses war vor allem an der Bewertung der Toxoplasmenlast und der prozentualen Anteile der infizierten und nicht-infizierten Zellen festzumachen. Während die Toxoplasmenlast bei den MC80-PBCA-Partikeln über die drei Versuchstage stark zunahm, blieb sie bei den kleineren MC81-PBCA-Partikeln fast gleich bzw. verringerte sich sogar etwas. Des Weiteren stieg der prozentuale Anteil der infizierten Zellen bei den MC80-PBCA-Partikeln über die drei Tage an, während sie bei den MC81-PBCA-Partikeln abnahm. Die Bewertung dieses unterschiedlichen Verhaltens der großen und kleinen Partikel durch den Vergleich der Orange fluoreszenz, also der Aufnahme der Nanopartikel war erschwert da bei den größeren Partikeln ein Quenching der Fluoreszenz stattfand. Daher konnte nicht direkt von der Fluoreszenzintensität auf die Menge der aufgenommenen Partikel geschlossen werden. Mit der Analyse der Orange fluoreszenz war es aber möglich innerhalb einer Partikelgröße zwischen den beladenen und unbeladenen Partikeln zu vergleichen.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-24** Effekt von Nanopartikeln auf die Mittelwerte der Orangefluoreszenzintensität (FL2) der Zellen, R1 = prozentualer Anteil der Zellen die keine Nanopartikeln aufgenommen haben; R2 = prozentualer Anteil der Zellen, die Nanopartikel aufgenommen habe (Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, oA = ohne Arzneistoff, Spira = Spiramycin)

Auswertung nach der Orangefluoreszenz	1.Tag			2.Tag			3.Tag		
	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(oA)</b>		93,76	5,04		85,94	14,07		76,03	24,13
<b>Mean</b>	145,2			240,1			319,2		
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(Spira)</b>		91,38	7,40		71,35	28,79		54,37	45,93
<b>Mean</b>	169,5			235,9			497,8		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(oA)</b>		81,21	16,16		83,76	13,72		75,55	25,52
<b>Mean</b>	252,3			224,3			251,9		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(Spira)</b>		80,89	14,95		83,27	15,82		71,77	24,98
<b>Mean</b>	234,1			205,7			228,2		

So zeigte sich, dass die Aufnahme von MC80-PBCA-Nanopartikel über die drei Versuchstage stetig zunahm. Die Nanopartikel ohne Spiramycin wurden aber dabei in geringerem Ausmaß phagozytiert als die Partikel mit Spiramycin. Erkennbar war dies an den Mittelwerten der Orangefluoreszenz sowie am prozentualen Anteil der Zellen, die Partikel aufgenommen hatten. Beide Parameter waren bei den MC80-PBCA(oA)-Nanopartikeln niedriger als bei den Partikeln mit Spiramycin. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die MC80-PBCA(Spiramycin)-Nanopartikel stärker von den Makrophagen aufgenommen wurden als die Partikel ohne Spiramycin, waren sie in der toxoplasmiziden Wirkung weniger effektiv. Ein Grund könnte sein, dass bei Zellen, die zu viele Nanopartikel aufgenommen hatten, die stimulierende Wirkung verloren ging, da die Makrophagen übersättigt waren.

Bei den kleineren MC81-PBCA-Partikeln veränderte sich die Orangefluoreszenz-Intensität der Zellen über die drei Versuchstage nur wenig. Es wurden demnach während der Versuchsdauer nur wenig neue Partikel aufgenommen. Trotzdem zeigte sich über die drei Tage ein immer besser werdender Therapieerfolg. Warum bei den kleineren MC81-PBCA-Partikeln ohne Spiramycin die Aufnahme durch die Zellen ausgeprägter ist als bei den Partikeln mit

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

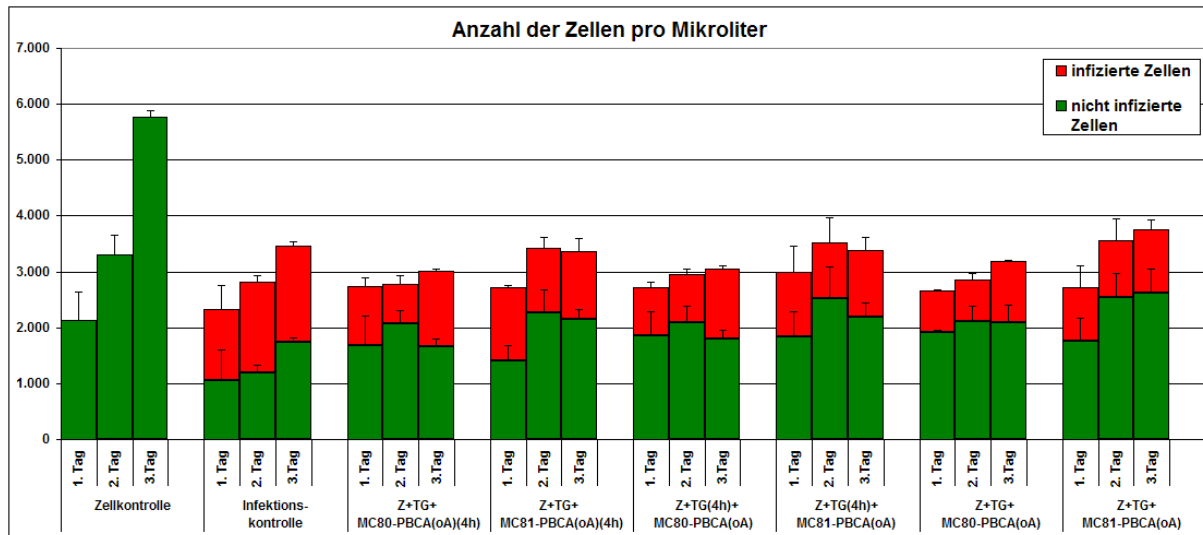
Arzneistoff- sonst war die Aufnahme der beladenen Partikeln stärker- konnte mit der 2D-PAGE geklärt werden (s. 5.4.1).

### 5.3.2.3 Fazit

Durch die Beladung der Nanopartikel mit Pentamidin konnte keine Wirkungsverbesserung erreicht werden und die Beladung mit Spiramycin führte nur bei den kleineren MC81-PBCA-Partikeln zu einer sehr geringen Verbesserung des toxoplasmiziden Effekts der Partikel. Die größeren MC80-PBCA-Nanopartikel zeigten, obwohl sie stärker von den Zellen phagozytiert wurden, einen weniger effektiven Therapieerfolg als die kleinen. Da sich die mit Arzneistoff beladenen und nicht-beladenen Nanopartikel in ihren physikochemischen Eigenschaften nur wenig unterscheiden, ließ sich dieses unterschiedliche Verhalten in der Zellkultur nicht eindeutig erklären. Im Rahmen dieser Arbeit konnte daher die genaue Ursache des unterschiedlichen Verhaltens nicht aufgeklärt werden und es müssten weitere Versuche folgen, bei denen genau untersucht wird, welche unterschiedlichen Veränderungen die einzelnen Partikelsorten in den Makrophagen bewirken. Da die größeren Partikel besser von den Makrophagen phagozytiert wurden als die kleinen und dennoch zu einem geringeren Therapieerfolg führten, ließ sich ableiten, dass eine zu starke Partikelaufnahme der toxoplasmizide Wirkung entgegenstand.

### 5.3.3 Veränderung der Reihenfolge von Infektion und Behandlung

Bei den bisherigen Zellkultur-Versuchen wurde die Behandlung mit den Nanopartikeln sofort im Anschluss an die Infektion mit Toxoplasmen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Nanopartikel alleine eine toxoplasmizide Wirkung aufwiesen. Um zu überprüfen, ob die Partikel auch als Prophylaxe vor einer Toxoplasmose-Infektion eingesetzt werden könnten, wurde der Versuchsansatz in der Weise verändert, dass die Infektion mit dem Erreger erst vier Stunden nach der Behandlung mit Nanopartikeln durchgeführt wurde. Bei zusätzlichen Ansätzen erfolgte die Behandlung mit Nanopartikeln vier Stunden nach der Infektion der Makrophagen.



**Abb. 5-40** Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit Nanopartikeln vier Stunden vor oder nach der Infektion oder gleichzeitig, Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*; oA = ohne Arzneistoff (n=6)

Der Vergleich der Gesamtzellzahl zeigte, dass sie unabhängig vom Zeitpunkt der Behandlung war. Für die Vermehrung der Zellen war es demnach nicht wichtig, ob die Behandlung und Infektion gleichzeitig oder um vier Stunden verschoben ablief. Da die Gesamtzellzahl keine ausreichende Bewertung der Situation in der Zellkultur zuließ, wurden die Mittelwerte der Grünfluoreszenz der Zellen und die prozentualen Anteile der infizierten Zellen hinzugezogen.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-25** Intensität der Grünfluoreszenzen (FL1) der Zellen bei unterschiedlicher Reihenfolge der Infektion und Behandlung mit den Standardpartikeln mit einer PBCA-Schale, R1 = prozentualer Anteil der nicht-infizierten Zellen; R2 = prozentualer Anteil der infizierten Zellen (TG = *Toxoplasma gondii*, oA = ohne Arzneistoff)

Auswertung nach der Grünfluoreszenz	1.Tag			2.Tag			3.Tag		
	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)
<b>Infektionskontrolle</b>		35,41	54,66		41,34	43,29		45,27	42,91
<b>Mean</b>	86,27			71,03			53,37		
<b>Zellen+TG+ MC80-PBCA(oA)(4h)</b>		75,77	23,39		71,15	28,05		64,63	34,96
<b>Mean</b>	26,10			37,91			36,96		
<b>Zellen+TG+ MC81-PBCA(oA)(4h)</b>		74,15	26,11		70,31	29,47		63,19	35,63
<b>Mean</b>	24,74			34,54			35,32		
<b>Zellen+ MC80-BCA(oA)+TG(4h)</b>		76,58	23,81		73,99	24,33		62,67	35,46
<b>Mean</b>	24,25			34,17			37,33		
<b>Zellen+ MC81-PBCA(oA) +TG(4h)</b>		74,79	23,20		70,26	27,24		61,95	35,44
<b>Mean</b>	22,60			35,50			36,15		
<b>Zellen+TG+ MC80-PBCA(oA)</b>		76,89	23,91		70,31	28,11		60,63	34,38
<b>Mean</b>	28,89			37,82			36,07		
<b>Zellen+TG+ MC81-PBCA(oA)</b>		74,36	23,59		72,05	26,68		60,94	36,95
<b>Mean</b>	23,00			34,97			35,64		

Auch hier zeigte sich, dass der Zeitpunkt der Behandlung auf die Wirkungsweise der Nanopartikel keinen Einfluß hatte. Die Mittelwerte der Grünfluoreszenzen, sowie die prozentualen Anteile der infizierten Zellen unterschieden sich nur wenig. Es ergaben sich daher keine signifikanten Unterschiede in den toxoplasmiziden Effekten der einzelnen Proben. Dem zufolge hätte die prophylaktische Gabe von Nanopartikeln Vergleich zu einer Behandlung nach erfolgter Toxoplasmose keinen Vorteil.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

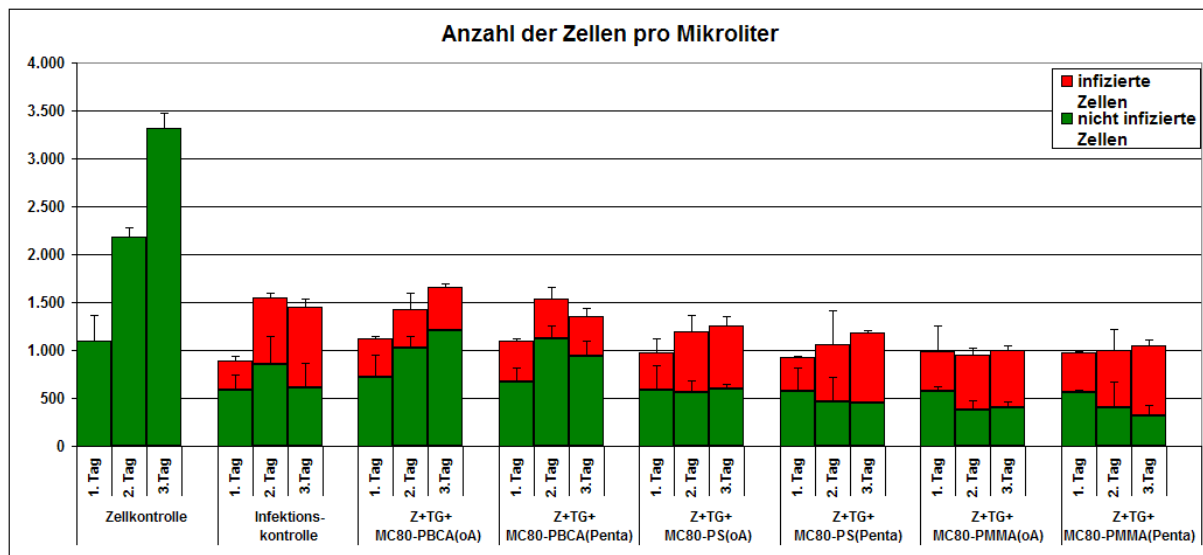
### 5.3.4 Überprüfung der Referenzpartikel in der Zellkultur

Nachdem die Standardpartikel aus einem Polystyren-Kern und einer Polybutylcyanoacrylat-Schale in der Zellkultur verdeutlicht hatten, dass Partikel ohne Arzneistoff einen Einfluss auf die Toxoplasmen-Vermehrung bzw. -Abtötung haben, sollte überprüft werden, ob dieses Ergebnis auch mit anderen Partikeln erreicht werden konnte. Es wurde somit kontrolliert, ob die Wirkung der Standardpartikel wirklich durch eine Stimulation der Makrophagen hervorgerufen wurde oder eventuell durch andere Parameter, wie z.B. Abbauprodukte der Partikelschale. Als Referenzpartikel kamen Polystyren-Kerne mit einer Polystyren-Schale oder einer Polymethylmethacrylat-Schale zum Einsatz.

#### 5.3.4.1 Pentamidin

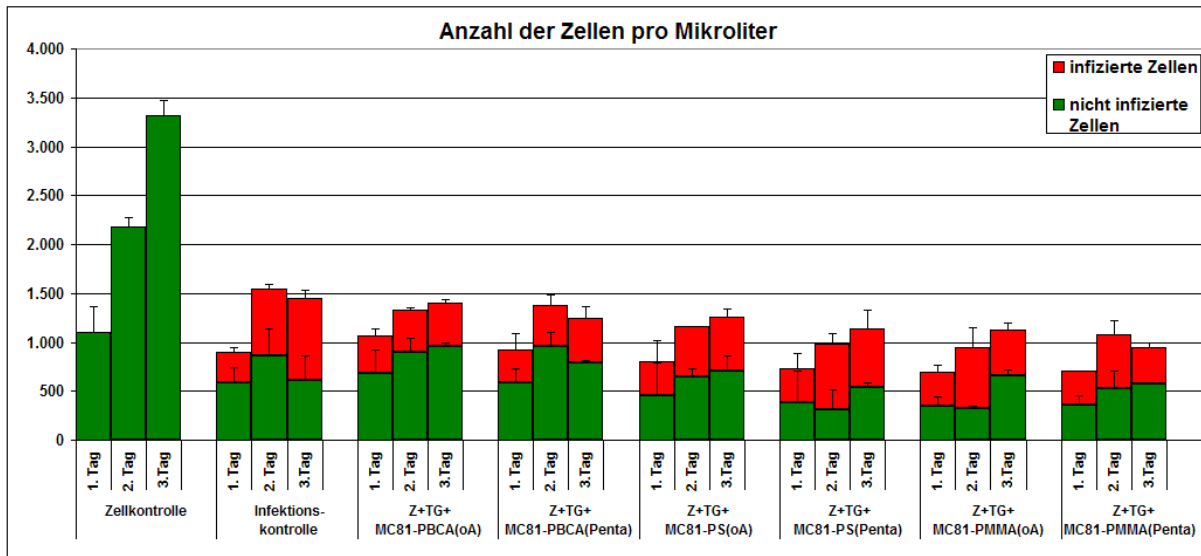
Beim Vergleich der Gesamtzellzahlen zeigte sich, dass die Standardpartikel mit einer PBCA-Schale das Zellwachstum weniger beeinflussten als bei den Referenzpartikeln. Zur genaueren Betrachtung des Geschehens in der Zellkultur wurden die Auswertung der Toxoplasmenlasten sowie die prozentualen Anteile der infizierten und nicht-infizierten Makrophagen hinzugezogen (Tabelle 4 im Anhang).

a)



## 5. Ergebnisse und Diskussion

b)



**Abb. 5-41 a und b** Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit Nanopartikeln ohne oder mit Pentamidin, a) = MC80cs, b) = MC81cs, Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, PS = Polystyrol, PMMA = Polymethylmethacrylat, oA = ohne Arzneistoff (n=6)

Wie bei den Standardpartikeln wirkten auch bei den Referenzpartikeln mit einer PS-Schale die Teilchen ohne Arzneistoff besser als die mit Pentamidin. Erkennbar war dies durch die geringeren Toxoplasmenlasten und die geringeren prozentualen Anteile der infizierten Zellen. Bei den Referenzpartikeln mit einer PMMA-Schale war der Unterschied zwischen den Nanopartikeln mit und ohne Arzneistoff schwerer zu ermitteln. Hier waren zwar die Toxoplasmenlasten der Partikel mit Pentamidin niedriger als bei den Partikeln ohne aber dafür waren die prozentualen Anteile der infizierten Zellen höher. Es wurde daher nicht von einer besseren Wirkung der Partikel mit oder ohne Pentamidin gesprochen, sondern von einer vergleichbaren.

Wie bei den Standardpartikeln wiesen auch bei den Referenzpartikeln die kleineren MC81-Nanopartikel eine bessere toxoplasmizide Wirkung auf als die größeren MC80-Partikel. Besonders deutlich wurde dies beim Vergleich der prozentualen Anteile der infizierten Zellen. Sie waren bei den MC81cs-Nanopartikeln signifikant kleiner als bei den MC80cs-Partikeln.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Der Vergleich der verschiedenen Partikelarten untereinander ergab, dass die Standardpartikel mit einer PBCA-Schale nicht nur im Hinblick auf die größte Gesamtanzahl der Zellen, sondern auch durch die geringsten Toxoplasmenlasten sowie die geringsten prozentualen Anteile der infizierten Zellen einen positiveren Therapie-Effekt auf das Modell hatten als die Referenzpartikel. Unter den Referenzpartikeln zeigten die mit einer Polystyren-Schale eine stärkere toxoplasemizide Wirkung als die Partikel mit einer Polymethylmethacrylat-Hülle.

Das unterschiedliche Verhalten der eingesetzten Nanopartikeldispersionen ließ sich unter Bezugnahme der Auswertung der Orange fluoreszenz (Nanopartikel Aufnahme) erklären (Tab. 5-26).

Die Intensitäten der Orange fluoreszenz der Zellen waren bei den Standardpartikeln mit einer PBCA-Schale am geringsten und stiegen über die Referenzpartikel mit einer PS-Schale zu denen mit einer PMMA-Schale hin an. Ebenso verhielten sich die prozentualen Anteile der mit Partikeln beladenen Zellen. Die Phagozytose war demnach bei den Standardpartikeln mit einer PBCA-Schale am wenigsten ausgeprägt, während die Referenzpartikel mit einer Polystyren-Schale schon besser aufgenommen wurden. Die stärkste Aufnahme war bei den Partikeln mit einer Polymethylmethacrylat-Schale zu sehen.



## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-26** Effekt von Nanopartikeln auf die Mittelwerte der Orangefluoreszenzintensität (FL2) der Zellen, R1 = prozentualer Anteil der Zellen die keine Nanopartikeln aufgenommen haben; R2 = prozentualer Anteil der Zellen, die Nanopartikel aufgenommen habe (Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, oA = ohne Arzneistoff)

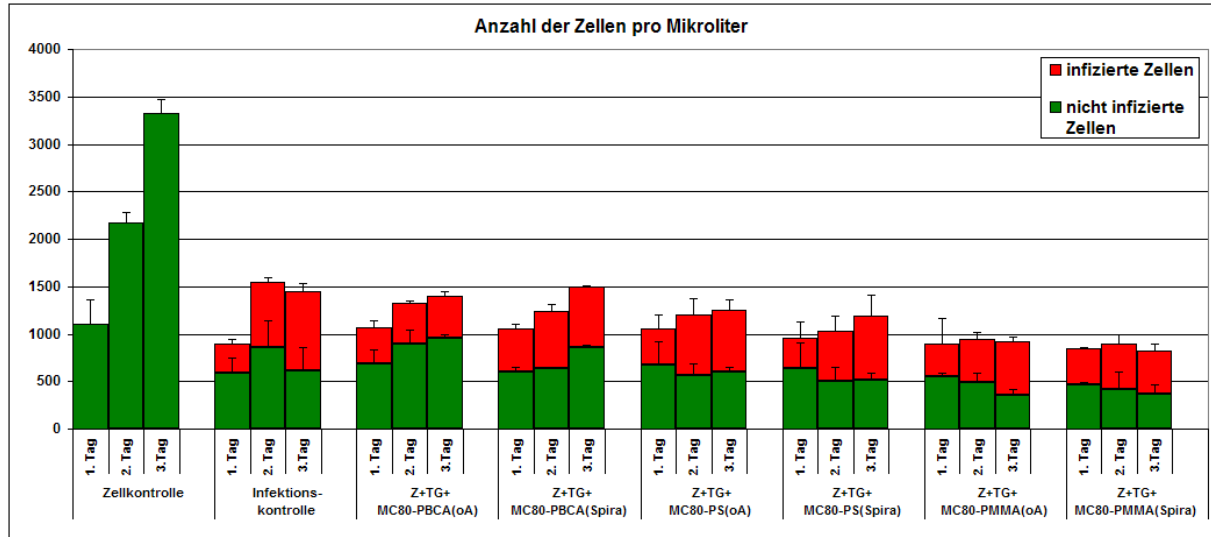
Auswertung nach der Orangefluoreszenz	1.Tag			2.Tag			3.Tag		
	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(oA)</b>		69,23	31,08		75,10	25,67		60,68	39,61
<b>Mean</b>	92,50			110,15			117,30		
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(Penta)</b>		72,41	28,05		68,06	28,07		75,40	24,99
<b>Mean</b>	78,17			112,32			119,78		
<b>Z+TG+ MC80-PS(oA)</b>		78,93	21,14		65,40	31,93		75,89	24,39
<b>Mean</b>	141,85			143,43			147,23		
<b>Z+TG+ MC80-PS(Penta)</b>		78,74	17,73		69,46	28,37		68,58	29,13
<b>Mean</b>	130,57			153,16			168,28		
<b>Z+TG+ MC80-PMMA(oA)</b>		69,88	30,21		57,04	40,80		52,26	37,77
<b>Mean</b>	193,89			197,96			180,58		
<b>Z+TG+ MC80-PMMA(Penta)</b>		74,01	20,61		61,58	38,68		51,12	48,89
<b>Mean</b>	203,3			212,49			204,27		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(oA)</b>		72,58	27,79		78,52	24,10		76,11	24,16
<b>Mean</b>	85,7			90,30			81,88		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(Penta)</b>		73,22	26,97		84,28	16,44		77,70	22,39
<b>Mean</b>	85,23			92,53			85,70		
<b>Z+TG+ MC81-PS (oA)</b>		77,81	22,26		62,88	39,42		68,97	31,09
<b>Mean</b>	131,62			135,57			153,45		
<b>Z+TG+ MC81-PS (Penta)</b>		78,51	21,18		72,90	24,85		70,74	28,34
<b>Mean</b>	139,28			183,37			155,47		
<b>Z+TG+ MC81-PMMA (oA)</b>		66,98	33,46		58,70	41,60		53,36	43,42
<b>Mean</b>	220,99			249,00			204,93		
<b>Z+TG+ MC81-PMMA(Penta)</b>		74,85	28,37		65,79	28,17		51,93	44,86
<b>Mean</b>	228,02			201,75			204,53		

## 5. Ergebnisse und Diskussion

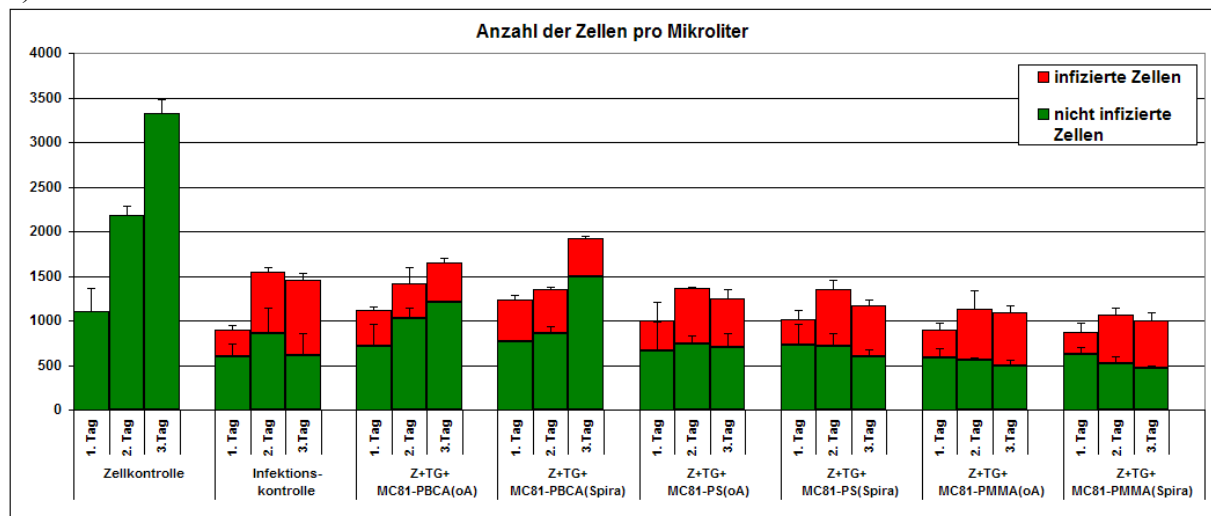
### 5.3.4.2 Spiramycin

Wie bei den Standardpartikeln wurden auch die Referenzpartikel nicht nur mit Pentamidin, sondern auch mit Spiramycin beladen. Als erstes wurde die Gesamtzellzahl in den Proben betrachtet.

a)



b)



**Abb. 5-42 a und b** Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit Nanopartikeln ohne oder mit Spiramycin, Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, PS = Polystyrol, PMMA = Polymethylmethacrylat, oA = ohne Arzneistoff (n=6)

Die Gesamtzellzahlen waren sich innerhalb einer Partikelart, mit und ohne Spiramycin, sehr ähnlich, nur zwischen den einzelnen Polymertypen traten Unterschiede auf. Bei den Partikeln mit einer PBCA-Schale wurde das Zellwachstum am wenigsten beeinflusst, während bei den

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Kern-Schale-Nanopartikeln mit einer PS-Schale die Beeinflussung der Proliferation zunahm und sie bei denen mit einer PMMA-Schale am größten war. Über die Wirkung der Nanopartikel auf die infizierten Zellen konnten wieder durch die Auswertung der Grünfluoreszenz der Zellen Aussagen getroffen werden (Tabelle 5 im Anhang).

Während bei den größeren MC80-PBCA-Standardpartikeln (PS/PBCA) die Teilchen ohne Arzneistoff eine signifikant stärkere toxoplasmizide Wirkung aufwiesen im Gegensatz zu den mit Spiramycin, war dieser Unterschied bei den MC80cs-Referenzpartikeln kaum vorhanden. Vielmehr waren sich bei den Partikeln mit einer PS-Schale die Toxoplasmenlasten sowie die prozentualen Anteile der infizierten Zellen sehr ähnlich. Bei den Partikeln mit einer PMMA-Schale waren die Toxoplasmenlasten sowie die prozentualen Anteile der infizierten Zellen bei denen mit Spiramycin etwas geringer als bei denen ohne, wenn auch nicht signifikant.

Die kleineren MC81cs-Partikel mit Spiramycin zeigten bei den Standard- sowie den Referenzpartikeln mit einer PMMA-Schale eine nicht signifikant bessere toxoplasmizide Wirkung als die entsprechenden Partikel ohne Arzneistoff. Dagegen wirkten bei den Referenzpartikeln mit einer PS-Schale, die ohne Spiramycin geringfügig aber nicht signifikant besser als die Partikel mit Spiramycin. Da die Effekte zwischen den Partikeln mit und ohne Spiramycin so gering waren, wurde von einer vergleichbaren Wirkung dieser beiden Partikelarten ausgegangen.

Wie bei den größeren Partikeln zeigten auch bei den kleineren die Standardpartikel mit einer PBCA-Schale den signifikant ausgeprägtesten toxoplasmiziden Effekt, gefolgt von den Referenzpartikeln mit einer Polystyren-Schale. Die Partikel mit einer Polymethylmethacrylat führten zu dem geringsten Behandlungserfolg.

Diese Ergebnisse wurden im Zusammenhang mit der Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen betrachtet. Wie beim Versuch mit Pentamidin wurden auch bei diesem Versuch mit Spiramycin die Partikel mit einer PMMA-Schale am stärksten aufgenommen, gefolgt von denen mit einer PS-Schale und am wenigsten wurden die Partikel mit einer PBCA-Schale phagozytiert.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-27** Effekte von Nanopartikeln auf die Intensität der Orangefluoreszenzen (FL2) der Zellen, R1 = prozentualer Anteil der Zellen die keine Nanopartikeln ^ aufgenommen haben; R2 = prozentualer Anteil der Zellen, die Nanopartikel aufgenommen habe (Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, oA = ohne Arzneistoff)

Auswertung nach der Orangefluoreszenz	1.Tag			2.Tag			3.Tag		
	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(oA)</b>		88,22	11,62		82,55	17,07		40,65	59,21
<b>Mean</b>	104,3			154,8			261,5		
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(Spira)</b>		88,99	11,17		71,60	27,78		52,80	47,27
<b>Mean</b>	96,1			179,5			297,1		
<b>Z+TG+ MC80-PS(oA)</b>		19,91	78,31		7,51	91,62		11,19	88,60
<b>Mean</b>	159,7			223,0			302,4		
<b>Z+TG+ MC80-PS(Spira)</b>		29,42	68,24		9,42	90,12		9,82	89,99
<b>Mean</b>	161,2			220,6			336,8		
<b>Z+TG+ MC80-PMMA(oA)</b>		5,02	95,02		4,90	95,12		11,64	88,20
<b>Mean</b>	227,6			298,3			424,8		
<b>Z+TG+ MC80-PMMA(Spira)</b>		6,69	93,76		7,63	92,08		15,77	84,04
<b>Mean</b>	189,8			274,7			433,4		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(oA)</b>		85,58	15,56		88,05	12,52		59,62	21,96
<b>Mean</b>	74,9			86,4			126,3		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(Spira)</b>		86,89	14,00		61,62	36,42		74,22	27,71
<b>Mean</b>	73,7			97,2			92,9		
<b>Z+TG+ MC81-PS (oA)</b>		27,99	69,97		12,67	86,30		25,43	73,62
<b>Mean</b>	201,5			157,3			139,9		
<b>Z+TG+ MC81-PS (Spira)</b>		30,16	67,41		41,07	87,44		37,04	62,38
<b>Mean</b>	181,8			163,8			155,4		
<b>Z+TG+ MC81-PMMA (oA)</b>		7,16	92,76		8,95	90,94		10,72	89,06
<b>Mean</b>	239,2			208,5			226,1		
<b>Z+TG+ MC81-PMMA(Spira)</b>		4,62	95,50		3,65	96,45		2,54	97,55
<b>Mean</b>	248,2			263,1			249,9		

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Auch die Abhängigkeit der Partikelaufnahme von der Partikelgröße wurde wieder bestätigt, da die größeren MC80cs-Partikel in einem größeren Ausmaß aufgenommen wurden als die kleinen MC81cs-Nanopartikel.

### 5.3.4.3 Fazit

Obwohl die Referenz-Nanopartikel vermehrt von den Makrophagen aufgenommen wurden, zeigte sich bei diesen Partikeln keine ausgeprägtere toxoplasmizide Wirkung im Vergleich zu den Standardpartikeln. Dies bedeutete, dass die stimulierende Wirkung der Nanopartikel verloren ging, wenn die Zellen zu viele Partikel aufgenommen hatten.

Die Aufnahme der Polymerpartikel in kultivierte Zellen hing unter anderem von der Größe und der Hydrophobie der Teilchen ab (Müller et al., 1991, 1997).

Bei etwa gleicher Partikelgröße würde danach in einer Hydrophobie-Reihe von Polystyren über Polybutylcyanoacrylat zu Polymethylmethacrylat eine gemäß dieser Folge sinkende Aufnahmerate erwartet werden. Dies war aber nicht so, da bei den Versuchen die Aufnahmerate bei Polymethylmethacrylat am höchsten war, gefolgt von Polystyren und Polybutylcyanoacrylat.

Es wurde vermutet, dass die gefundene Abstufung in der Partikelaufnahme der Reihenfolge der effektiven Oberflächen-Hydrophobie/Hydrophilie nach Kontakt mit den im Zellkulturmedium gelösten Komponenten entsprach. Es enthielt neben Proteinen verschiedene Salze und Aminosäuren. Die Anionen der Salze und verschiedene Aminosäuren wurden in starkem Maße auf der hydrophoben Polystyren-Oberfläche adsorbiert und steigerten dadurch die Hydrophilie. In geringerem Ausmaß geschah dies auch auf der Polybutylcyanoacrylat-Oberfläche. Die von ihrer chemischen Struktur her hydrophilere Polymethylmethacrylat-Oberfläche war dagegen über weite Areale mit Wasserdipolen besetzt (Jacobasch, 1984) und somit gegenüber der Adsorption hydrophob wechselwirkender, wasserlöslicher Substanzen abgeschirmt. Die PMMA-Oberfläche hatte sich somit im Kontakt mit dem Zellkulturmedium nur wenig verändert. Daher wurde die ursprüngliche Hydrophobie-Reihenfolge der Oberflächen von Polystyren und Polymethylmethacrylat verändert, was die beobachtete Abstufung in der Aufnahmerate der Partikel erklärt.

Das Geschehen bei der Inkubation solcher Nanopartikel mit Blutplasma weist im Sinne dieser Betrachtungsweise große Parallelen auf (Lück et al., 1997). Hier kommen jedoch weitere Einflussfaktoren hinzu, wie z.B. die Fragmentierung oder auch Denaturierung von Eiweißstruktu-

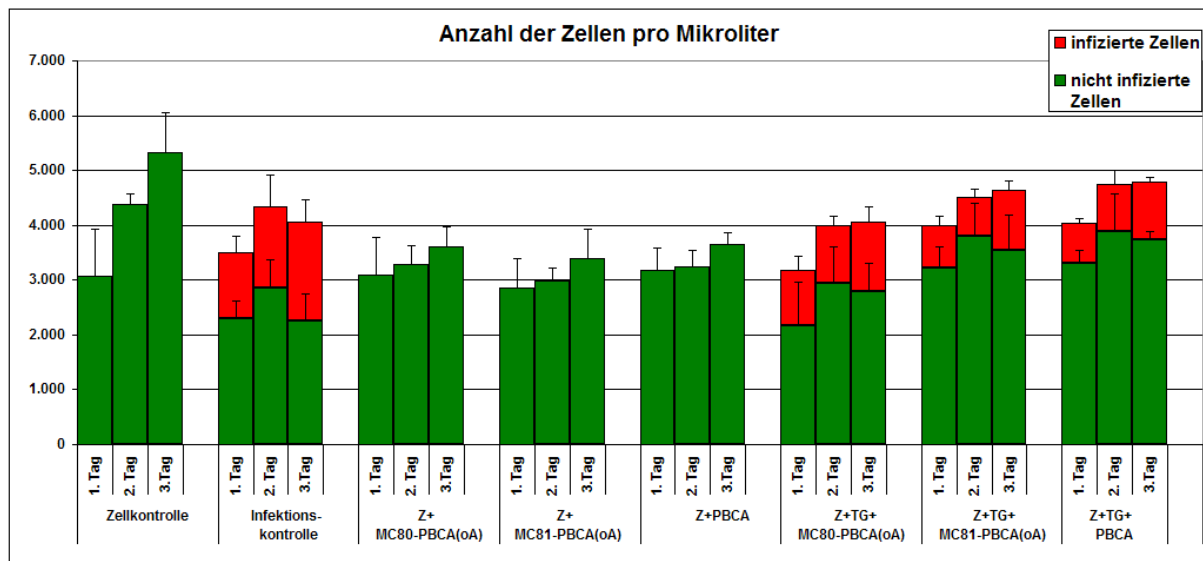
## 5. Ergebnisse und Diskussion

ren auf extrem körperfremden Grenzflächen. (Lück et al., 1999) Die Resultate dieser Vorgänge sind für die Aufnahmeraten *in-vivo* von erheblicher Bedeutung.

### 5.3.4.4 Reine PBCA-Partikel als Referenzpartikel

Als weitere Referenzpartikel wurden neben den Kern-Schale-Partikeln mit einer PMMA- oder PS-Schale auch reine Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel untersucht. Sie waren nicht mit Arzneistoff beladen und daher wurde ihre Wirkung auf die infizierte Zellkultur im Vergleich zu den ebenfalls nicht-beladenen Standardpartikeln analysiert.

Während bei den Kontrollansätzen ohne Toxoplasmen zwischen den Zellzahlen der Proben mit den Standardpartikeln aus Polystyren-Kern mit PBCA-Schale und den reinen PBCA-Partikeln kein signifikanter Unterschied auftrat, war das bei den Ansätzen mit Toxoplasmen anders. Hier war die Zellvermehrung bei den Proben mit MC80-PBCA-Nanopartikeln im Vergleich zu den MC81-PBCA- sowie den reinen PBCA-Partikeln vermindert (Abb. 5-43).



**Abb. 5-43** Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit Kern-Schale- oder reinen PBCA-Nanopartikeln, Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, PBCA = Polybutylcyanoacrylat, oA = ohne Arzneistoff (n=6)

Dies stand mit der Toxoplasmenlast im Zusammenhang, denn je mehr Toxoplasmen vorhanden waren, desto schneller wurden die Makrophagen zerstört und der prozentuale Anteil der nicht-infizierten Zellen nahm ab. Wie in Tabelle 6 im Anhang dargestellt wird, waren die Toxoplasmenlasten sowie die prozentualen Anteile der infizierten Zellen bei den MC80-PBCA-

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Partikeln höher als bei den MC81-PBCA- bzw. den reinen PBCA-Partikeln. Demnach hatten die kleinen MC81-Partikel und die PBCA-Partikel eine ausgeprägtere toxoplasmizide Wirkung als die größeren. Die Wirkung der MC81cs-Partikel war dabei stärker - jedoch nicht signifikant- als die der reinen PBCA-Partikel.

Wie schon in den vorausgegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, hatten kleinere Partikel eine stärkere toxoplasmizide Wirkung als größere, obwohl diese besser von den Makrophagen aufgenommen wurden. Mit einem Durchmesser von 239 nm lagen die reinen PBCA-Partikel mit ihrer Größe zwischen denen der Standardpartikeln, genauso wie mit ihrer toxoplasmiziden Wirkung.

### 5.3.5 Absättigung der Nanopartikel mit Proteinen

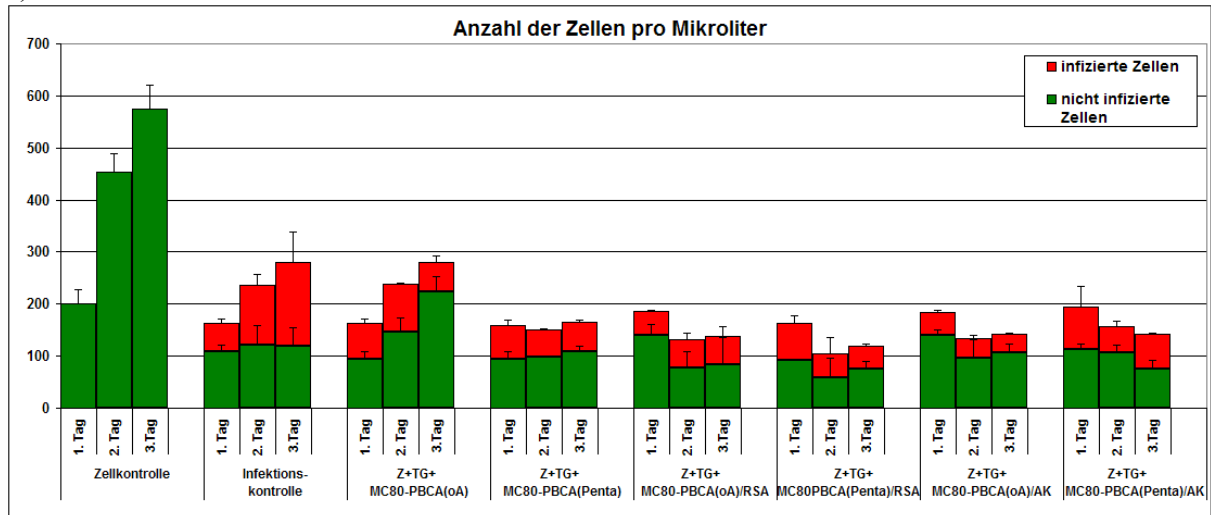
Werden Nanopartikel zu den mit Toxoplasmen infizierten Zellen gegeben, so adsorbieren auf ihnen Proteine, die im Zellkulturmedium vorhanden sind. Um auszuschließen, dass diese Proteine in unterschiedlichem Ausmaße unkontrolliert an den Partikel adsorbierten und dadurch eventuell zu einem unterschiedlichem Aufnahmeverhalten durch die Zellen führten, wurden die Nanopartikel vor ihrem Einsatz mit Proteinen abgesättigt. Dies erfolgte einmal mit reinem Rinderserumalbumin (RSA) und zum anderen mit Patientenserum, das einen positiven Titer gegen Toxoplasmen (AK) aufwies. Dadurch wurden standardisierte Partikel erhalten, die sich in der Zellkultur gleich verhalten sollten. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob durch die Absättigung die Effektivität der Nanopartikel in der Zellkultur weiter verbessert werden kann. Es wurden jeweils Nanopartikel ohne Arzneistoff sowie mit Pentamidin oder Spiramycin untersucht und die Behandlung mit den Partikeln erfolgte direkt im Anschluss an die Infektion der Makrophagen.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

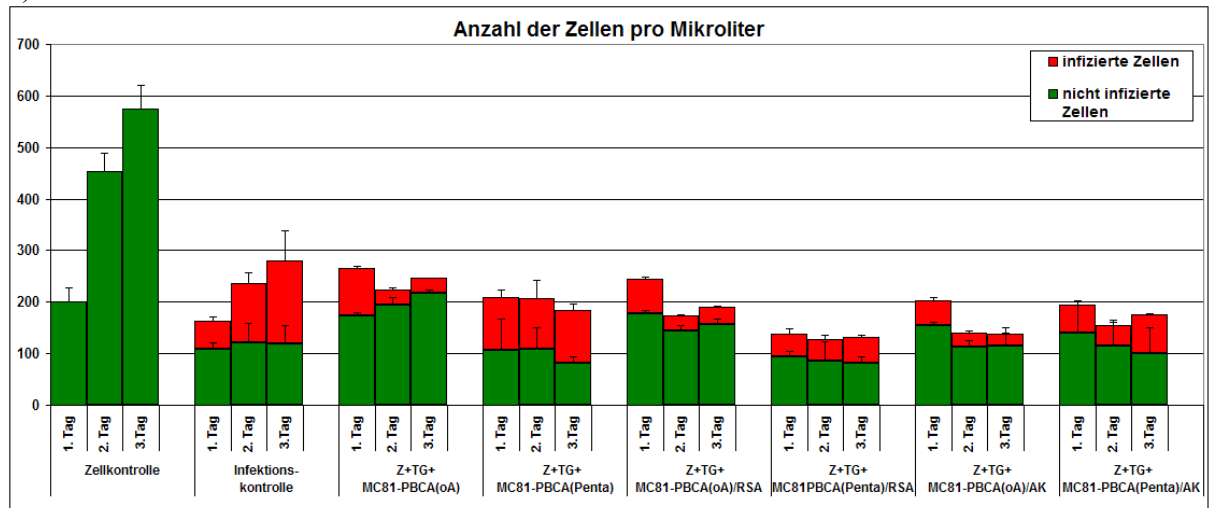
### 5.3.5.1 Pentamidin

Abbildung 5-44 a und b zeigen, dass die Partikel ohne Arzneistoff gegenüber den Partikeln mit Pentamidin zu einer höheren Gesamtzellzahl sowie zu einem höheren prozentualen Anteil an nicht-infizierten Zellen führten.

a)



b)



**Abb. 5-44 a und b** Einfluß der Proteinbeladung: Anzahl der infizierten und nicht infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit Nanopartikeln ohne oder mit Pentamidin, Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*; RSA = Rinderserumalbumin, AK = Patientenserum mit positivem Titer gegen Toxoplasmose, oA = ohne Arzneistoff (n=6)



## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Toxoplasmenlasten (Tabelle 7 im Anhang) der Proben mit den Nanopartikeln ohne Arzneistoff waren signifikant niedriger als bei den mit Pentamidin beladenen Partikeln. Des Weiteren war die Anzahl der extrazellulären Toxoplasmen bei den Proben ohne Arzneistoff geringer als bei denen mit Pentamidin. Beim Vergleich der nicht abgesättigten Partikeln mit den abgesättigten, wiesen die nicht abgesättigten die ausgeprägteste toxoplasmizide Wirkung auf. Während bei den größeren MC80cs-Nanopartikeln die mit AK-abgesättigten Partikel sowohl bezogen auf die Toxoplasmenlast als auch auf den prozentualen Anteil der infizierten Zellen, den besseren Therapieerfolg zeigten als die mit RSA abgesättigten Partikel, war dies bei den kleineren MC81cs-Nanopartikeln genau umgekehrt. Hier waren die mit RSA abgesättigten Partikel wirkungsvoller.

Um die Auswirkungen der gezielten Proteinabsättigung auf das System im Zusammenhang mit der Partikelaufnahme bewerten zu können, wurden die Orange fluoreszenz (FL2) der Zellen betrachtet. Tabelle 5-28 zeigt die Orange fluoreszenzen der Zellen über die drei Versuchstage.

Bei allen Nanopartikelarten (abgesättigten und nicht abgesättigten) war die Aufnahme der unbeladenen Partikel signifikant geringer als bei den entsprechenden mit Pentamidin beladenen. Während bei den großen MC80cs-Nanopartikeln die nicht abgesättigten Partikel signifikant am wenigsten von den Makrophagen aufgenommen wurden, wurden die Partikel, die mit AK abgesättigt waren besser und die mit RSA abgesättigten Partikel am besten aufgenommen.

Bei den kleineren MC81cs-Partikeln waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Aufnahme der nicht abgesättigten und der abgesättigten Partikel zu finden. Die unterschiedlichen Aufnahmen der Nanopartikel in die Zellen bestätigten die Aussagen der toxoplasmiziden Wirkungen, die durch die Auswertung der Grün fluoreszenz (Toxoplasmenlast) gefunden wurden, da Partikel, die am stärksten aufgenommen wurden, die geringsten toxoplasmiziden Effekte zeigten.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-28** Effekte von Nanopartikeln auf Mittelwerte der Intensitäten der Orange fluoreszenzen (FL2) der Zellen, R1 = prozentualer Anteil der Zellen die keine Nanopartikeln aufgenommen haben; R2 = prozentualer Anteil der Zellen, die Nanopartikel aufgenommen habe (TG = *Toxoplasma gondii*, oA = ohne Arzneistoff, RSA = Rinderserumalbumin, AK = Patientenserum mit positivem Titer gegen Toxoplasmose)

Auswertung nach der Orange fluoreszenz	1.Tag			2.Tag			3.Tag		
	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)
Z+TG+ MC80-PBCA(oA)		90,43	8,37		85,94	14,07		76,03	24,13
<b>Mean</b>	105,7			142,6			167,8		
Z+TG+ MC80-PBCA(Penta)		87,06	7,93		76,49	21,10		80,98	12,98
<b>Mean</b>	127,2			198,3			219,4		
Z+TG+ MC80-PBCA(oA)/RSA		91,95	6,19		72,52	26,68		75,52	15,16
<b>Mean</b>	130,9			320,6			226,3		
Z+TG+ MC80-PBCA(Penta)/RSA		85,34	12,45		74,48	21,84		57,72	41,13
<b>Mean</b>	188,0			311,9			503,1		
Z+TG+ MC80-PBCA(oA)/AK		92,40	4,83		81,51	16,31		71,83	21,60
<b>Mean</b>	121,0			223,9			221,9		
Z+TG+ MC80-PBCA(Penta)/AK		89,28	7,24		82,30	12,65		67,61	13,19
<b>Mean</b>	152,8			226,6			296,1		
Z+TG+ MC81-PBCA(oA)		91,84	8,08		94,76	2,69		95,50	2,49
<b>Mean</b>	97,2			109,0			127,0		
Z+TG+ MC81-PBCA(Penta)		87,45	11,21		82,96	16,40		76,88	22,67
<b>Mean</b>	136,5			228,7			320,2		
Z+TG+ MC81-PBCA(oA)/RSA		95,26	2,28		93,63	4,37		92,17	9,87
<b>Mean</b>	97,0			115,7			131,4		
Z+TG+ MC81-PBCA(Penta)/RSA		90,73	7,43		82,52	16,16		80,16	17,21
<b>Mean</b>	134,7			234,0			319,4		
Z+TG+ MC81-PBCA(oA)/AK		94,68	2,66		91,81	5,70		89,50	7,02
<b>Mean</b>	102,5			132,1			139,8		
Z+TG+ MC81-PBCA(Penta)/AK		91,20	6,46		80,28	17,59		71,35	23,36
<b>Mean</b>	139,1			263,2			331,7		

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Es lässt sich zusammenfassen, dass die toxoplasmiziden Wirkungen der Partikel ohne Arzneistoff bei den nicht abgesättigten sowie den abgesättigten Partikeln signifikant besser waren als bei den entsprechenden Partikeln mit Pentamidin. Bestätigt wurde dies durch die größere Gesamtzellzahl, der größeren Anzahl an nicht-infizierten Zellen, der geringeren Toxoplasmenlast sowie der geringeren Anzahl an extrazellulären Toxoplasmen.

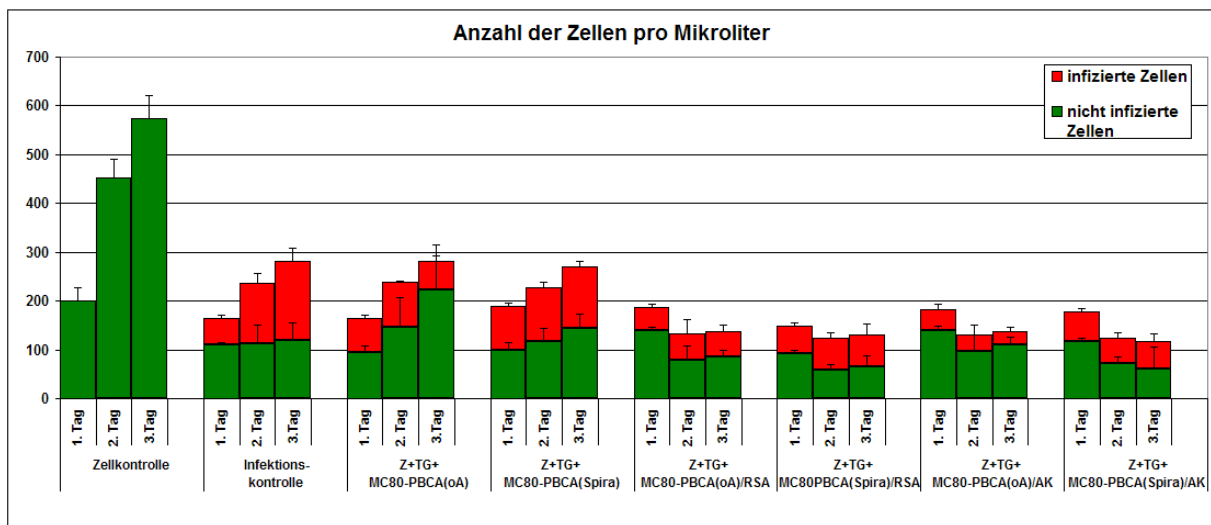
Durch die Absättigung der Partikel mit Proteinen konnte keine Wirkungsverbesserung erzielt werden. Der Grund, warum die nicht abgesättigten Partikel die ausgeprägtere toxoplasmizide Wirkung zeigten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Es konnte nicht nur mit der Menge der aufgenommenen Partikel und somit einer eventuellen Übersättigung der Zellen argumentiert werden, da die abgesättigten sowie nicht abgesättigten kleineren MC81cs-Nanopartikel in sehr ähnlichem Ausmaß von den Zellen phagozytiert wurden. Es müssten weitere Studien über die genaue Auswirkung der verschiedenen Partikel auf die Makrophagen folgen, wie zum Beispiel die Bestimmung der bei der Partikelaufnahme freigesetzten Interleukine.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

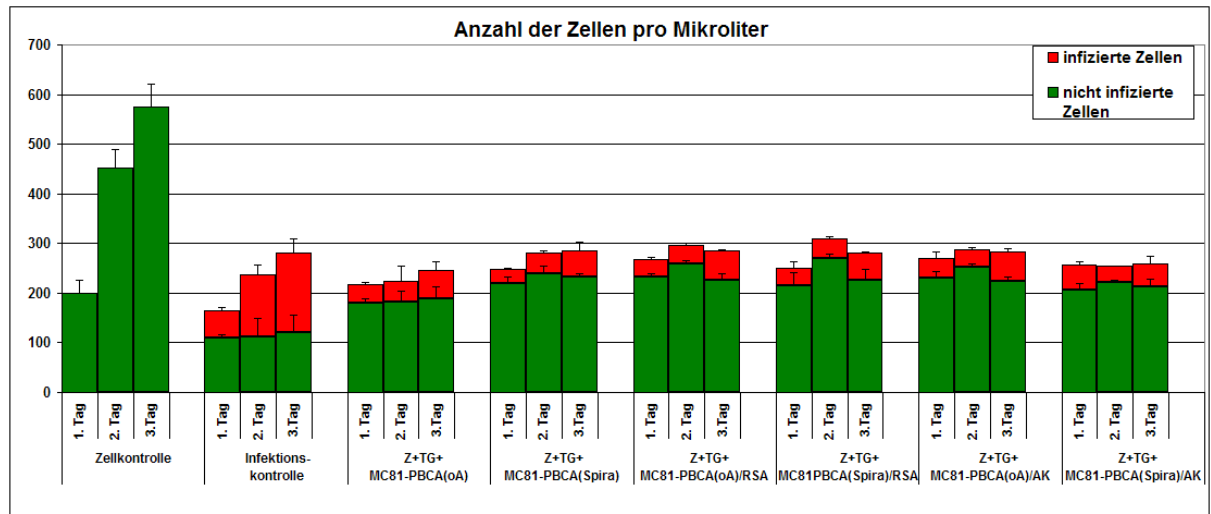
### 5.3.5.2 Spiramycin

Neben den Partikeln, die mit Pentamidin beladenen waren, wurden auch die mit Spiramycin beladenen mit Proteinen abgesättigt. Die Bewertung der Gesamtzellzahlen zeigte, dass diese innerhalb einer Partikelorte ähnlich waren. Auffallend war jedoch der signifikante Unterschied zwischen der Anzahl der nicht-infizierten Zellen bei den größeren und kleineren Partikeln, der besonders bei den abgesättigten Partikeln deutlich wurde.

a)



b)



**Abb. 5-45 a und b** Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Mikroliter nach Behandlung mit Nanopartikeln ohne oder mit Spiramycin, Z = Zellen, TG = *Toxoplasma gondii*, RSA = Rinderserumalbumin, AK = Patientenserum mit positivem Titer gegen Toxoplasmose, oA = ohne Arzneistoff (n=6)

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Tabelle 8 in Anhang zeigt die Mittelwerte der Grünfluoreszenzen der Zellen, die durch die intrazellulären Toxoplasmen hervorgerufen wurden. Unter den größeren MC80cs-Nanopartikeln wiesen sowohl die nicht abgesättigten als auch die abgesättigten Partikeln ohne Spiramycin signifikant geringere Toxoplasmenlasten gegenüber den mit Spiramycin beladenen auf. Neben der geringeren Anzahl der intrazellulären Toxoplasmen waren bei den Proben ohne Spiramycin auch weniger extrazellulären Toxoplasmen vorhanden.

Bei den kleinen MC81cs-Nanopartikeln waren im Hinblick auf die Toxoplasmenlasten die nicht abgesättigten Partikel sowie die mit RSA abgesättigten Partikeln ohne Spiramycin denen mit Spiramycin sehr ähnlich. Bei den mit Antikörpern abgesättigten MC81cs-Nanopartikeln war hingegen ein signifikanter Unterschied zwischen den ohne Arzneistoff und den mit Spiramycin beladenen zu sehen. Hier ergaben sich bei der MC81(Spiramycin)/AK-Partikel signifikant geringe Toxoplasmenlasten als bei den MC81(oA)/AK-Partikeln.

Der Vergleich der Toxoplasmenlasten ergab, dass diese bei den nicht abgesättigten Polymerpartikeln am geringsten waren, bei den mit RSA-abgesättigten höher und am höchsten bei den mit Antikörper abgesättigten Partikeln. Die Unterschiede waren dabei jeweils signifikant. Sowohl bei den großen als auch bei den kleinen Nanopartikeln konnte demnach keine Verbesserung der toxoplasmiziden Wirkung durch Absättigung der Partikel erzielt werden. Um dieses Ergebnis im Zusammenhang mit der Partikelaufnahme betrachten zu können, wurde wieder die Bewertung der Orange fluoreszenz (FL2) hinzugezogen.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 5-29** Effekte der Nanopartikel auf die Mittelwerte der Intensitäten der Orange fluoreszenzen (FL2) der Zellen, R1 = prozentualer Anteil der Zellen die keine NP aufgenommen haben; R2 = prozentualer Anteil der Zellen, die NP aufgenommen habe (TG = *Toxoplasma gondii*, oA = ohne Arzneistoff, RSA = Rinderserumalbumin, AK = Patientenserum mit positivem Titer gegen Toxoplasmose)

Auswertung nach der Orange fluoreszenz	1.Tag			2.Tag			3.Tag		
	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)	all	R1 (%)	R2 (%)
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(oA)</b>		93,76	5,04		85,94	14,07		76,03	24,13
<b>Mean</b>	145,2			240,1			319,2		
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(Spira)</b>		91,38	7,40		71,35	28,79		54,37	45,93
<b>Mean</b>	169,5			235,9			497,8		
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(oA)/RSA</b>		91,95	6,19		72,52	26,68		57,72	41,13
<b>Mean</b>	130,9			320,6			503,1		
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(Spira)/RSA</b>		87,45	10,41		64,94	34,80		54,11	44,02
<b>Mean</b>	174,0			406,8			614,7		
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(oA)/AK</b>		92,40	4,83		81,51	16,31		71,83	21,60
<b>Mean</b>	121,0			257,2			496,1		
<b>Z+TG+ MC80-PBCA(Spira)/AK</b>		89,50	8,96		65,42	34,11		49,57	48,45
<b>Mean</b>	174,8			400,1			559,2		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(oA)</b>		92,36	6,86		83,76	13,72		75,55	25,52
<b>Mean</b>	97,6			107,3			106,1		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(Spira)</b>		92,67	5,93		88,33	11,91		83,11	20,93
<b>Mean</b>	90,5			108,4			106,1		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(oA)/RSA</b>		95,26	2,28		51,83	40,43		63,07	33,04
<b>Mean</b>	97,0			115,7			131,4		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(Spira)/RSA</b>		97,94	2,37		60,09	33,49		59,54	31,52
<b>Mean</b>	105,7			126,0			142,0		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(oA)/AK</b>		94,68	4,66		54,30	39,31		63,12	27,72
<b>Mean</b>	102,5			132,1			139,8		
<b>Z+TG+ MC81-PBCA(Spira)/AK</b>		87,26	11,25		84,77	15,51		73,07	21,30
<b>Mean</b>	64,0			87,4			93,3		

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Bei den größeren MC80cs-Nanopartikeln wurden die, die mit Spiramycin beladen waren in einem signifikant größeren Ausmaß von den Zellen phagozytiert als die Partikel ohne Arzneistoff. Dabei war die Aufnahme der nicht abgesättigten Partikel am schwächsten ausgeprägt und nahm signifikant über die mit AK abgesättigten zu den mit RSA abgesättigten Partikeln zu.

Bei den kleineren MC81cs-Nanopartikeln waren die Unterschiede zwischen den mit Arzneistoff beladenen und unbeladenen Partikeln nicht signifikant, wobei die Aufnahme der mit Spiramycin-beladenen Partikel geringfügig stärker war. Eine Ausnahme bildeten dabei jedoch die MC81(Spiramycin)-Partikel, die mit AK abgesättigten waren. Ihre Aufnahme in die Zellen war an allen drei Versuchstagen geringer ausgeprägt als bei den Partikeln ohne Spiramycin und sogar als bei den nicht abgesättigten Partikeln.

Dass die stimulierende Wirkung, die die Nanopartikel auf die Zellen ausübten, von der Menge der aufgenommenen Partikelmenge abhing, konnte auch in dieser Versuchsreihe bewiesen werden. Eine Ausnahme bildeten dabei die MC81(Spiramycin)-Nanopartikel, die mit Antikörpern abgesättigt waren. Diese wurden im Vergleich zu den nicht abgesättigten Polymerpartikeln weniger stark von den Makrophagen aufgenommen. Dennoch war ihre toxoplasmizide Wirkung ebenfalls weniger ausgeprägt. Demnach durfte die Menge der aufgenommenen Partikel auch nicht zu gering sein, da erst eine gewisse Menge an phagozytierten Partikeln nötig war, um die Zellen zu ihrer höchsten Aktivität zu stimulieren.

### 5.3.5.3 Fazit

Die Absättigung der Nanopartikel mit Proteinen führte zwar zu einer erhöhten Aufnahme der Partikel in die Zellen aber zu keiner Verbesserung des Therapieerfolgs gegenüber den nicht abgesättigten Partikeln. Da eine zu große Menge an aufgenommenen Partikeln ihre toxoplasmizide Wirkung zu beeinträchtigen scheint, wurde keine Steigerung der Wirkung beobachtet. Es konnte kein einheitliches Ergebnis erhalten werden, ob die mit AK oder mit RSA abgesättigten Partikel die besseren toxoplasmiziden Wirkungen besaßen. Vielmehr wirkten bei einigen Versuchen die mit AK und bei anderen die mit RSA abgesättigten Partikel stärker, jedoch immer schlechter als die nicht abgesättigten Partikel. Um eine Antwort auf dieses Verhalten finden zu können, müssten die Mechanismen, die in den Zellen nach der Partikelaufnahme ablaufen, genauer untersucht werden.

Obwohl durch die Absättigung mehr Partikel phagozytiert wurden und dadurch die Konzentration an in den Zellen durch Zellesterasen freigesetztem Spiramycin vergrößert wurde, konn-

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

te keine höhere toxoplasmizide Effizienz gegenüber den Partikeln ohne Spiramycin erreicht werden. Demnach hatte in den Zellen die Konzentration des freigesetzten Spiramycins scheinbar keinen Einfluss auf den Therapieerfolg.

### 5.4. Plasmaproteinadsorption auf Kern-Schale-Nanopartikeln

Beim Einsatz im *in-vitro* Modell kamen die Nanopartikel mit fetalem Kälberserum (FKS) in Kontakt. Daher sollten die entsprechenden Proteinadsorptionsmuster der Partikel bestimmt werden. Das Ziel hierbei war, durch die erhaltenen Proteinmuster eine Beziehung zu der Aufnahmefähigkeit durch die Zellen aufstellen zu können. Um auch das Verhalten der Partikel in einem möglichen *in-vivo* Versuch bewerten zu können, wurden die Partikel auch nach Inkubation in Humanplasma vermessen. Für die Ergebnisse nach Inkubation mit Humanserum sei auf die Dissertation von Herrn Göppert verwiesen (Göppert, 2005).

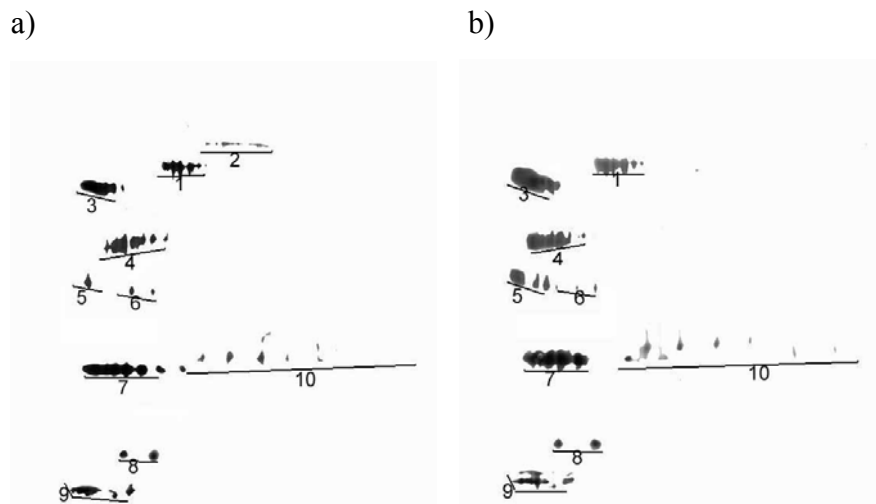
Die Untersuchungen der Adsorption von Plasmaproteinen auf den Nanopartikeln erfolgte mit Hilfe der zwei-dimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese (2-D PAGE oder 2-DE). Bei diesem Verfahren erfolgt die Trennung der Proteine in der ersten Dimension (isoelektrische Fokussierung, IEF) nach ihrer Ladung (nach dem pI) und in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) nach dem Molekulargewicht (MW).

Die 2-D PAGE ermöglicht die Bestimmung des Adsorptionsverhaltens von Proteinen des Serums oder Blutplasmas in Abhängigkeit der verschiedenen Oberflächeneigenschaften der Partikel. Die Durchführung der Analyse erfolgte durch Herrn Göppert. Eine Kurzbeschreibung der Methode befindet sich in Kapitel 3.2.8. Eine ausführliche Darstellung findet sich in der Dissertation von Herrn Göppert (Göppert, 2005). Bei den untersuchten Partikeln handelte es sich um die Standard-Kern-Schale-Partikel MC81-PBCA-Nanopartikel mit und ohne Spiramycin.



### 5.4.1 Adsorptionsmuster nach Inkubation in fetalem Kälberserum (FKS)

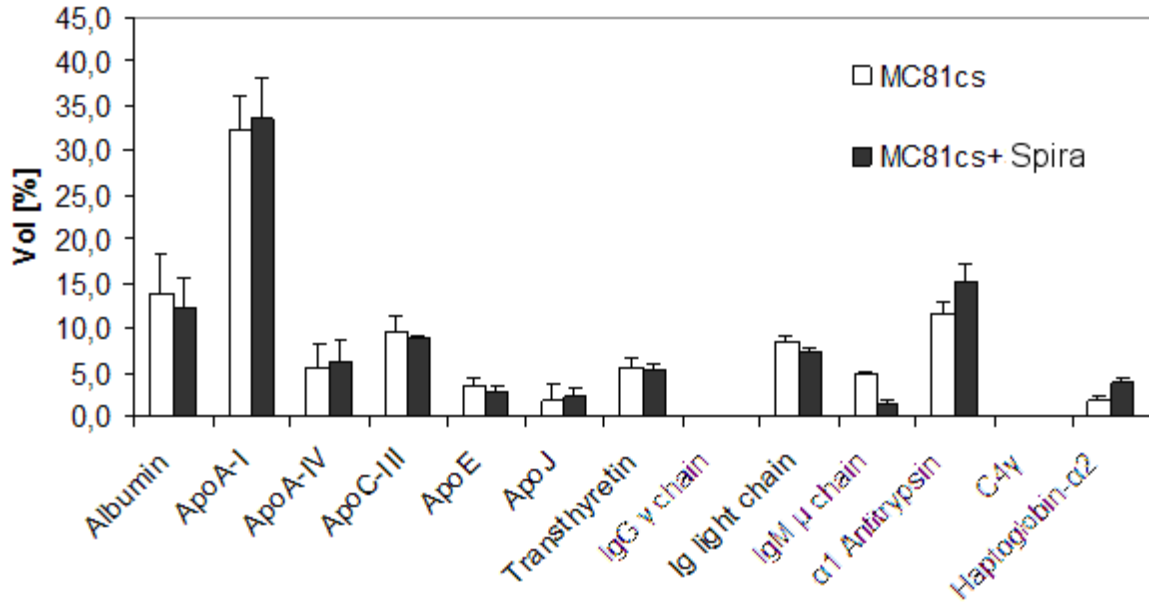
Da die Nanopartikel durch Zugabe zur Zelldispersion mit fetalem Kälberserum in Kontakt kamen, wurden diese Adsorptionsmuster bestimmt.



**Abb. 5-46** Proteinadsorptionsmuster auf (a) MC81cs bzw. (b) MC81cs+SM nach Inkubation in FBS. Markierte Proteinspots: (1) Albumin, (2) IgM  $\mu$  Kette, (3)  $\alpha$ 1-Antitrypsin, (4) ApoA-IV, (5) ApoJ, (6) ApoE, (7) ApoA-I, (8) Transthyretin, (9) ApoC, (10) Ig leichte Ketten.

Auffallend war die große Dominanz der Apolipoproteine. (Apolipoproteine sind Bestandteile der so genannten Lipoproteine, deren Aufgabe es ist, wasserunlösliche Lipide im Blut zu transportieren. Sie befinden sich auf der Oberfläche der Lipoproteine und sind entscheidend für die deren Erkennung durch die Zielzellen. Es gibt verschiedene Apolipoproteinklassen: ApoA-E).

## 5. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 5-47** Prozentualer Anteil der Proteine am insgesamt detektierten Proteinmuster auf MC81-Polymerpartikeln nach Inkubation in FBS (in Volumen [%]), n = 2.

Auf den ersten Blick sahen die Adsorptionsmuster der Partikel mit und ohne Arzneistoff sehr ähnlich aus. Aber mit dem Hintergrund, dass die mit Arzneistoff beladenen und unbeladenen Partikel in verschieden ausgeprägten Umfängen von den Zellen phagozytiert wurden, fielen die kleinen Unterschiede im Adsorptionsverhalten schwerer ins Gewicht.

Hierbei spielte vor allem der höhere Anteil der adsorbierten IgM an die Partikeloberfläche eine entscheidende Rolle (siehe Tabelle 5-31). Das IgM fördert als Opsonin die Phagozytose der Partikel und durch eine erhöhte Anreicherung dieses Immunglobulins war mit einer erhöhten Aufnahme der Partikel in der Zellkultur zu rechnen. Wie in Kapitel 5.3.2.2 beschrieben wurden die MC81-PBCA(Spiramycin)-Polymerpartikel gegenüber den MC81(oA)-Partikeln in einem geringeren Ausmaß von den Zellen phagozytiert, so dass die durch die 2-D-Page gefundenen Ergebnisse mit denen in der Zellstudie gefundenen übereinstimmten.

**Tab. 5-31** Prozentualer Anteil des auf den Partikeln adsorbierten IgM.

	MC81cs	MC81cs+Penta	MC81cs+Spira
IgM (FBS)	4,9%	n. b.	1,3%

### 5.4.1.2 Fazit

Mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese wurden die Proteinadsorptionsmuster von unbeladenen und mit Arzneistoff beladenen Nanopartikeln bestimmt. Dieses erfolgte sowohl nach Inkubation der Partikel in Humanplasma sowie in fetalem Kälberserum. Die erhaltenen Proteinadsorptionsmuster wiesen keine größeren qualitativen oder quantitativen Unterschiede, was angesichts der ähnlichen physikochemischen Eigenschaften auch nicht überraschend war. Den größten Anteil der adsorbierten Proteinen bildeten die Apolipoproteine, wodurch ein eventueller Durchtritt der Bluthirnschranke möglich wäre.

Beim Vergleich der Adsorptionsmustern von unbeladenen und mit Spiramycin beladenen MC81-PBCA-Nanopartikeln in fetalem Kälberserum zeigte sich eine höhere Adsorption von Opsoninen (v. a. IgM) an den unbeladenen Partikeln. Da bei der *in-vitro* Studie ebenfalls eine erhöhte Phagozytose der unbeladenen MC81-PBCA-Partikel gefunden wurde, konnte abgeleitet werden, dass auch nur kleine Veränderungen im Proteinadsorptionsmuster einen Einfluss auf ein unterschiedliches Aufnahmeverhalten in die Zellen haben konnten.

### 5.5 Weiterführende Diskussion

Die Entwicklung neuer Arzneiformulierungen, die die Anwendungen schon bestehender Arzneistoffe verbessern und nebenwirkungsfreier machen sollen, nimmt einen immer breiteren Raum in der pharmazeutischen Forschung ein. Eine Möglichkeit ist dabei auch der Einsatz von Nanopartikeln zum Beispiel um Wirkstoffe gezielt in bestimmte Zellen oder Gewebe zu bringen. Um das Potential, welches im Einsatz von Nanopartikeln steckt, optimal nutzen zu können, werden genauere Daten über die Wechselwirkung auf zellulärer Ebene benötigt.

Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Polymerpartikeln konnten schon einige interessante Ergebnisse in unterschiedlichen Studien erzielt werden (z.B. Alyautdin et al., 1997, Gulyaev et al. 1999, Friese et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde mit rotem Fluoreszenzfarbstoff gefärbte Kern-Schale- Polymernanopartikeln eingesetzt, bei denen der Kern aus nicht abbaubaren Polystyren und die Schale aus abbaubaren Polybutylcyanoacrylat bestand. Die nicht abbaubaren Kerne waren für die durchgeführten Versuche sinnvoll, da so über die Messung der Orange fluoreszenz mittels Durchflußzytometrie die Anwesenheit der Partikel in den Zellen über die drei Versuchstage verfolgt werden konnte. Mit dieser Methode war es jedoch nicht möglich herauszufinden, ob die Partikelschalen abgebaut wurden. Wäre die Schale vollständig abgebaut worden, würden immer noch die nichtabbaubaren Polystyren-Kerne vorhanden sein, so dass keine Unterschiede in der Granularität der Zellen gemessen werden könnten.

Nach der Partikelphagozytose liegen die Nanopartikel im Phagolysosom der Zellen vor, während sich die Parasiten in der parasitophoren Vakuole befinden. Unklar ist, ob und in welchem Ausmaß in den Phagolysosomen freigesetzten Arzneistoff in die parasitophore Vakuole gelangt. Durch Einsatz von Partikel gebundenen Farbstoffen, die durch Hydrolyse freigesetzt werden, könnte auch diese Frage in dem entwickelten System geklärt werden.

Diese Frage ist deshalb interessant, da die verschiedenen intrazellulären Mikroorganismen unterschiedliche Evasionsstrategien haben, mittels derer sie die Fusion von Phagosom und Lysosom verhindern oder die Bedingungen (pH und damit enzymatische Aktivitäten) im Phagolysosom beeinflussen. Ebenfalls könnten Untersuchungen mittels konfokaler Lasermikroskopie weiteren Aufschluss über die Wechselwirkungen von Zelle, Nanopartikeln und Erreger in diesem System bringen.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Es ist zu erwarten, dass sich eine mit Nanopartikeln „gesättigte“ Zelle anders verhält, als eine Zelle die immer noch phagozytiert. Derartige Unterschiede könnten durch Messung von Interleukinen in diesem System gefunden werden. Wichtig wäre es, die Einflüsse der „gesättigten“ Zelle auf das Killing von Parasiten zu erkennen. Interessant wird dies insbesondere dann, wenn vollständig abbaubare Nanopartikel eingesetzt werden und damit die Möglichkeit besteht über die Dosierung einen derartigen Effekt, also die Beeinflussung der Killing-Aktivität, zu nutzen.

Die stimulierende Wirkung der Nanopartikel wurde in dieser Arbeit über drei Tage beobachtet. Ob diese stimulierende Wirkung der Partikel auch über einen noch längeren Zeitraum anhalten würde, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt. Ebenso ist nicht bekannt, wie die Zellen reagieren würden, wenn sie über einen längeren Zeitraum stimuliert werden. Erkenntnisse aus der Wirkung von Feinstäuben auf die Abwehr lassen vermuten, dass bei nicht abbaubaren Nanopartikeln bei chronischer Belastung auch mit negativen Wirkungen zu rechnen ist (Krewski et al., 2005). Würden die Zellen durch die anhaltenden Stimulierung keinen Schaden nehmen, so könnten durch die einmalige Gabe von nichtabbaubaren Partikeln „chronische -langdauernde - Effekte“ erreicht werden können.

Bei *in-vivo* Studien werden im Gegensatz zu *in-vitro* Studien andere Anforderungen an die Partikel gestellt. Hier sollten vollständig abbaubare Partikel verwendet werden, da sich sonst immer mehr Partikeln in den Zellen des Organismus ansammeln würden. Da Zellen, die zu große Mengen an Partikel aufgenommen haben in ihrer Aktivität gehemmt werden, sollte dieses möglichst verhindert werden. Des Weiteren ist es nötig abbaubare Partikel einzusetzen, um über die Therapiedauer immer weitere Dosen der Arzneistoffe in die Zellen transportieren zu lassen, ohne die Zellen mit Partikeln zu überladen.

Die Vorteile des verwendeten *in-vitro* Modells werden in den Experimenten deutlich. Durch eine Erweiterung des Modells durch Proteinabsättigung oder den Einsatz von Referenzpartikeln war es möglich, die sich daraus ergebenden Wirkungen direkt bewerten zu können. Da es durchführbar ist immer nur eine Komponente im System zu verändern, können die daraus entstehenden Veränderungen im Modell direkt auf die neuen Bedingungen bezogen werden. Der Nachteil eines *in-vitro* Modells gegenüber einem Mausmodell besteht darin, dass keine Unterschiede in der Therapie einer akuten, chronischen oder asymptomatisch persistierenden Infektionen gemacht werden können.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

Nachdem sich das in der vorliegenden Arbeit entwickelte *in-vitro* Modell als geeignet für die Versuche mit Makrophagen und Toxoplasmen erwiesen hat, wäre es interessant ob es sich auch auf andere Zelltypen und andere Parasiten übertragen lässt. Durch einen Vergleich mit anderen Erregern, die z.B. über einen anderen Mechanismus in die Zellen gelangen (mehr auf Phagozytose angewiesen sind) oder eine andere Wechselwirkung mit Phagolysosomen induzieren, könnten neben neuen, erregerspezifischen auch allgemeingültige Aussagen gewonnen werden. Durch Ersatz der Mäusezellen durch humane permanente Zellen oder sogar primäre humane Zellen sind Testsysteme möglich, die der Situation im infizierten Patienten noch besser entsprechen würden.