

„Nanopartikel und Nanokapseln als potentielle
Wirkstofftransportsysteme:
Zelluläre Aufnahme in Leukozyten in peripherem Vollblut
und in Zellkultur“

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Daniela Kathrin Baumann

geb. in Stuttgart

Mainz, den 28.02.2012

Max-Planck-Institut für Polymerforschung

Max Planck Institute for Polymer Research



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Am ertragreichsten ist die Wissenschaftslandschaft, wo sich die Disziplinen gegenseitig befruchten.

(Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger, deutscher Chemiker, *1939)

amtierender Dekan:

1. Prüferin:

2. Prüfer:

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Mai 2012

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	1
2.	Theorie.....	6
2.1	Allgemeine theoretische Grundlagen	6
2.1.1	Miniemulsionspolymerisationsverfahren	6
2.1.2	Partikelaufnahme-mechanismen der Zellen.....	9
2.1.3	Polymere und nanopartikeläre Arzneistoffformulierungen.....	15
2.1.4	Humanes Blut und seine Komponenten	32
2.1.5	Zur Analyse ausgewählte Leukozyten.....	44
2.1.6	Proteinadsorption auf Nanopartikeln.....	49
2.2	Theorie der Messmethoden	51
2.2.1.	Durchflusszytometrie.....	51
2.2.2	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	55
3.	Material und Methoden	57
3.1	Methoden.....	57
3.1.1	Synthesen und Analysen von fluoreszierenden Poly(Styrol- <i>co</i> -Acrylsäure) und Poly(Styrol- <i>co</i> -AEMH)-Nanopartikeln	57
3.1.2	Kultivierung der Zellkulturen	59
3.1.3	Partikelaufnahmeexperimente in Zellkulturen	59
3.1.4	Zellprobenpräparation für die Durchflusszytometrie	61
3.1.5	Zellprobenpräparation für die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie.....	62
3.1.6	Probenpräparation für Inkubationsexperimente mit BSA-bedeckten Polystyrol-Nanopartikeln.....	62
3.1.7	Probenpräparation für den Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Leser.....	63
3.1.8	Partikelaufnahmeexperimente in peripherem Vollblut.....	63
3.2	Material.....	65
3.2.1	Zelllinien, Primärzellen und Leukozyten aus humanem peripherem Vollblut.	65
3.2.2	Nanopartikel und Nanokapseln	67
3.2.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien	71
3.2.4	Chemikalien und nicht-fluoreszierende Reagenzien	72
3.2.5	Fluoreszierende Reagenzien	74
4.	Resultate und Diskussion	78
4.1	Synthese und zelluläre Aufnahme von Poly(Styrol- <i>co</i> -Acrylsäure) und Poly(Styrol- <i>co</i> -2-Aminoethylmethacrylat)-Nanopartikeln	78
4.1.1	Aufnahmen in HeLa- und Jurkat-Zellen.....	79
4.1.2	Einfluss von fötalem Kälberserum im Zellkulturmedium auf die zelluläre Aufnahme.....	81
4.1.3	Markierung von dendritischen Zellen.....	82

4.2	Zelluläre Aufnahme von ionisch stabilisierten, funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln in Leukozyten in peripherem Vollblut	84
4.2.1	Etablierung des Analyseverfahrens.....	87
4.2.2	Aufnahme in CD3+, CD14+, CD16+ und CD19+ Leukozyten.....	93
4.3	Zelluläre Aufnahme von nicht-ionisch stabilisierten, funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln mit und ohne adsorbiertem bovinem Serumalbumin	111
4.3.1	Auswahl der Zelllinie für die Experimentreihe mit BSA-bedeckten Nanopartikeln.....	113
4.3.2	Aufnahmen von BSA-bedeckten Nanopartikeln in HeLa-Zellen mit und ohne.. additivem fötalem Kälberserum im Zellkulturmedium	115
4.4	Zellaufnahmen von Nanokapseln aus diversen Monomeren und biokompatiblen..... Makromolekülen	130
4.4.1	Hyaluronsäure-Nanokapseln	131
4.4.2	Heparin-Nanokapseln.....	147
4.4.3	Diverse Nanokapseln vor und nach Folsäure-Kopplung	152
4.4.4	Folsäure-gekoppelte Hydroxyethylstärke-Nanokapseln: Untersuchungen zur.... zielgerichteten Folsäure-Rezeptor α vermittelten Zellaufnahme.....	159
4.5	Zellexperimente mit Poly(5,6-Benzo-2-methylen-1,3-dioxepan)-Nanopartikeln .	172
4.5.1	Paclitaxel: Wirkmechanismus und pharmazeutische Formulierungen	174
4.5.2	Durchführung der Zellexperimente.....	177
4.5.3	Zelluläre Aufnahme von P(BMDO)-Nanopartikeln	178
4.5.4	Zelluläre Aufnahme der P(BMDO-co-Styrol)-Nanopartikel.....	184
4.5.5	Freisetzung von Paclitaxel aus P(BMDO)-Nanopartikeln.....	186
5.	Anhang	191
5.1	Abkürzungen	191
5.2	Symbole	192
6.	Zusammenfassung.....	193
7.	Conclusion	197
8.	Literaturverzeichnis	200
9.	Danksagung.....	213
10.	Lebenslauf.....	215
11.	Publikationen	216
12.	Erklärung.....	218

1. Einleitung

Die Errungenschaften der Forschung auf dem Gebiet der Nanotechnologie in den letzten Jahrzehnten stellen ein großes Potential für medizinische Anwendungen dar^[1]. Der stetig wachsende Forschungsbereich der Nanomedizin vereinigt nanotechnologische Entwicklungen aus Biologie, Physik und Chemie, um neue Wege für diagnostische Verfahren und zielgerichtete Pharmakotherapien zu schaffen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der selektiven Anreicherung oder Freisetzung des Arzneistoffes im betroffenen Gewebe^[2]. Bedingt durch ihre Größe (1 – 1000 nm) eröffnen nanoskalierte Bausteine und daraus bestehende Systeme als Diagnostika, Biosensoren und Arzneistoffvektoren (engl. *nanomedicines* oder *nanopharmaceuticals*) neue Möglichkeiten und Applikationswege, sowohl auf zellulärer Ebene, in Geweben, als auch im gesamten Organismus, die mit molekularen Arzneistoffen nicht zu erreichen sind^[3].

Bereits im vorigen Jahrhundert erkannte Paul Ehrlich, Nobelpreisträger für Physiologie und Medizin 1908 und Begründer der Immunologie und Chemotherapie, wie bedeutend „die Verteilung der Stoffe im Organismus“ für eine erfolgreiche Pharmakotherapie ist. Viele Jahre beschäftigte sich Ehrlich mit dem Anfärben von Geweben und Bakterien und konnte hierbei wichtige Erfahrungen über Struktur und Eigenschaften der Farbstoffe sammeln, die er dann im Anschluss für seine weitere Arbeit und Entwicklung von weiteren Postulaten nutzen konnte^[4]. Er bezeichnet „eine therapeutische Richtung, die von chemischen Gesichtspunkten ausgehend, Arzneistoffe von zweckmäßiger Lokalisationskraft aufsucht, als 'Therapia Distributiva'“^[5]. Er erkannte, dass vom Körper selbst gebildete antibakterielle Stoffe dieses distributive Prinzip verkörpern und „gewissermaßen ihr Ziel wie die Freikugeln des Freischütz treffen, ohne daß es einer besonderen Zielung bedarf“^[5].

Seine Vision war es in Analogie „durch chemische Substitutionen den betreffenden schwach wirksamen Körper so lange zu modifizieren, bis die optimale Wirkung erreicht ist. Hier heißt es also, zielen lernen, um ein bestimmtes Objekt unter möglichster Schonung der lebenswichtigen Bestandteile des Organismus vorwiegend zu treffen“^[5]. Ehrlich beschrieb somit im Beitrag „Biologische Therapie (1907)“ eine perfekte, zielgerichtete Pharmakotherapie, die bis heute als idealisiertes Ziel nichts an Aktualität verloren hat. Bei der Entwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen ist in den vergangenen Jahrzehnten für verschiedene pathogene Keime eine solche zielgerichtete Pharmakotherapie entwickelt worden, die mit sehr hoher Selektivität in deren Stoffwechsel eingreift und bakterizid oder bakteriostatisch wirkt, ohne körpereigene Zellen zu schädigen oder zu beeinflussen. Ein Beispiel hierfür stellt Clarithromycin, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Makrolide, dar, dessen bakterizide Wirkung auf

eine Bindung an die 50S-Untereinheit (nur in prokaryotischen Zellen vorkommend) der bakteriellen Ribosomen zurückzuführen ist. Trotzdem ist ein Kontakt des Antibiotikums allein mit dem Pathogen wünschenswert, um allgemeine systemische Nebenwirkungen, wie beispielsweise eine Veränderung der Erregungsleitung des Herzmuskels zu verhindern oder eine Schädigung der körpereigenen Bakterienbesiedlung (z.B. auf Schleimhäuten) zu unterbinden.

Bei Krebs oder Autoimmunerkrankungen ist eine zielgerichtete Pharmakotherapie noch deutlich komplizierter umzusetzen, weil es schwierig ist, das erkrankte Gewebe (Tumore, Entzündungsherd) von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden und somit selektiv zu erreichen. Hier gilt es, eine zielgerichtete Pharmakotherapie zu entwickeln, die einen möglichst spezifischen Wirkstoff in therapeutisch relevanten Dosen selektiv im Zielgewebe anreichert, ohne gesundes Gewebe zu schädigen. Daneben ist es wichtig, eine ausreichende Zirkulationsdauer zur Distribution der nanopartikulären Wirkstofftransportsysteme über die Blutbahn zu gewähren, um die Zielstrukturen zu erreichen. Dies ist beispielsweise mit einer Besetzung der Oberfläche von Nanovektoren mit hydrophilen Polymeren (z.B. Polyethylenglykolen, PEG) möglich^[6-7]. Des Weiteren muss der Einfluss der Plasmaproteine auf den zielgerichteten Transport, die eine Adsorptionsschicht auf Nanovektoren ausbilden und diesen somit ein neues Erscheinungsbild geben, erforscht werden^[8].

Dem Effekt der erhöhten Permeabilität und Retention (engl. *enhanced permeability and retention*, EPR) ist die Anreicherung von Nanovektoren in tumorösem und entzündetem Gewebe aufgrund der Hypervaskularisierung und der Ausbildung defekter und deutlich permeablerer Kapillargefäße sowie dem verlangsamten Abtransport über das unzureichend ausgebildete lymphatische System zuzuschreiben^[9-10]. Eine zielgerichtete Pharmakotherapie (engl. *drug-targeting*) ist also auf einem passiven Weg in diesen Geweben möglich. Eine aktive, zielgerichtete Pharmakotherapie ist mit nanopartikulären Wirkstofftransportsystemen durch die Konjugation von Liganden an deren Oberfläche wie Proteinen^[11], Antikörpern^[12], Peptiden^[13] oder kleinen Molekülen wie Folsäure^[14] möglich.

Die kontrollierte oder gezielt eingeleitete Freisetzung des Arzneistoffs am Wirkort^[15] ist für das Erreichen einer therapeutischen Dosis von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Pharmakotherapie. Die toxikologische Unbedenklichkeit des verwendeten Trägermaterials und dessen Abbauprodukten sowie deren Elimination und Auswirkungen durch einen möglichen Verbleib im Organismus müssen analysiert werden. Kontakte und Reaktionen des

Immunsystem mit den Nanovektoren müssen untersucht werden sowie deren Anreicherung in bzw. deren Elimination durch Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS).

Durch innovative Entwicklungen im Bereich der Nanomedizin lassen sich Verbesserungen für einen zielgerichteten Wirkstofftransport erreichen, die teilweise schon Eingang in die moderne Pharmakotherapie gefunden haben, wie beispielsweise Liposomen (Doxorubicin (Caelyx[®], Janssen-Cilag)), Dendrimere (SPL7013-Dendrimer, haftet an der Oberfläche des humanen Immundefizienz-Virus (HI-Virus) und inhibiert dadurch eine Infektion präventiv als topisches Vaginalgel (VivaGel(TM), Starpharma)), polymere Arzneistoffkonjugate (PEGylierter, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (Neulasta[®], Amgen Europe B.V.)) oder Nanopartikel (Paclitaxel (Abraxane[®], Abraxis Bioscience/Celgene)).

In den letzten Jahren konnte durch Arbeiten in unserer und anderen Forschungsgruppen gezeigt werden, dass im Besonderen bei Nanopartikeln in einem Größenbereich von 50 – 750 nm Aufnahmen in verschiedenste Zelllinien stattfinden^[16] und diese Nanopartikel einen vielversprechenden Weg für eine gezielte Zellmarkierung und somit effizientere Pharmakotherapie darstellen. Nanopartikel und Nanokapseln dienen in diesen Anwendungen als Wirkstofftransporter. Sie schützen den Wirkstoff, der frei, d.h. unkonjugiert, in der Polymermatrix bzw. der Polymerhülle vorliegt, vor Verstoffwechslung und Abbau. Viele kleine Wirkstoff-Moleküle und -Makromoleküle wie Nukleinsäuren, Peptide oder Proteine, die unter physiologischen Bedingungen instabil sind, können durch das Einbetten in nanopartikuläre Wirkstofftransporter intrazellulär eingebracht und daran gehindert werden, wieder direkt von Transmembranproteinen (engl. *multidrug resistance-related proteins*, MRP), die als Efflux-Pumpen wirken und somit eine Wirkstoffresistenz verursachen^[17], aus dem Zellinneren ausgeschleust zu werden. Eine erworbene Arzneistoffresistenz stellt insbesondere bei der Krebstherapie ein weiteres Problem dar. Mit Nanopartikeln ist das Erreichen einer therapeutischen Dosierung in den Zellen auch in diesem Fall möglich.

In der vorliegenden Arbeit werden mehrere grundlegende Aspekte, die für das erweiterte biologische Verständnis und die Entwicklung weiterer zielgerichteter Strategien zur Pharmakotherapie mit Nanopartikeln und -kapseln notwendig sind^[18], näher untersucht. Durch gezielte Oberflächenmodifikationen der sphärischen Nanopartikel werden die Eigenschaften hinsichtlich der zellulären Aufnahme verändert und können entsprechend ihrer an sie gestellten Anforderungen entwickelt werden.

Die Interaktionen von Zellen mit sphärischen Nanopartikeln und -kapseln werden in dieser Arbeit mit diversen immortalisierten Zelllinien sowie mit humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) untersucht. Nanopartikel mit unterschiedlichen Oberflächenladungen stehen bei der vorliegenden Arbeit im zentralen Fokus. Die mittels Miniemulsionspolymerisationsverfahren synthetisierten Polystyrol-Nanopartikel sind biologisch inert. Durch den Einsatz von Comonomeren und ionischen Tensiden wurden Nanopartikel mit positiven (aminofunktionalisiert) oder negativen (carboxylfunktionalisiert) Oberflächenladungen hergestellt. Nach der Synthese wurden diese Nanopartikel charakterisiert und Zellaufnahmeexperimente in verschiedenen Zelllinien durchgeführt; mit den aminofunktionalisierten Nanopartikeln konnten dendritische Zellen erfolgreich markiert werden^[19]. Mit diesen Nanopartikeln und einem weiteren Set an Polystyrol-Nanopartikeln mit einheitlichen Oberflächenladungen, die auf dieselbe Weise hergestellt wurden^[20], sind zelluläre Aufnahmeexperimente in anti-coaguliertem peripheren Vollblut durchgeführt worden. Der Einfluss der vielfältigen, im Blut vorhandenen Komponenten wie Plasmaproteinen wird während der Inkubationszeit mit einbezogen. Auf diese Weise konnte eine *ex vivo*-Analysemethode entwickelt werden, die ein wichtiges Bindeglied zwischen *in vitro*-Analysen mit Zellkulturen und *in vivo*-Experimenten in Tierversuchen darstellt. Die zeit- und konzentrationsabhängige zelluläre Aufnahme in diverse Antikörper-markierte Leukozyten wurde durchflusszytometrisch untersucht. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse konnten mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie-Aufnahmen bestätigt werden. Die analysierten T- und B-Lymphozyten stellen interessante Zielzellen für einen zielgerichteten Wirkstofftransport dar. Des Weiteren wurden Monozyten und neutrophile Granulozyten analysiert, die der unspezifischen Immunabwehr zugerechnet werden und zur Phagozytose befähigt sind, um u.a. Pathogene, körperfremde Partikel und apoptotische oder tote körpereigene Zellen zu entfernen. Die Eliminierung der zirkulierenden Nanopartikel durch diese Zellen kann durch Änderungen von nanopartikelspezifischen Charakteristika beeinflusst werden, wie in Experimenten der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

Der Einfluss der Proteinadsorption auf der Nanopartikeloberfläche wurde gesondert mit amino- und carboxylfunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln in Zellkultur (HeLa-Zellen) untersucht^[21]. Hierbei wurden die Nanopartikel nach der Adsorption von bovinem Serumalbumin (BSA) an deren Oberfläche in Zellkultur inkubiert.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit ist die Analyse der zellulären Aufnahme von innovativen Nanokapseln aus verschiedenen biokompatiblen Monomeren und Makromolekülen (Synthese Frau Dr. Grit Baier) in diverse immortalisierte Zelllinien sowie in mesenchymale Stammzellen. Miteingeschlossen sind erste Experimente für einen selektiven, zielgerichteten Transport von Folsäure-gekoppelten Hydroxyethylstärke-Nanokapseln (HES) in Folsäure-Rezeptor α (FR α)- exprimierende HeLa-Zellen.

Mit diversen Poly(5,6-Benzo-2-methylen-1,3-dioxepan)-Nanopartikeln (P(BMDO)-Nanopartikel, Synthese Herr Dr. Jörg Max Siebert) wurden Experimente zur zellulären Aufnahme in HeLa-Zellen und zum intrazellulären Wirkstofftransport des Zytostatikums Paclitaxel durchgeführt. Die Bioabbaubarkeit der wirkstoffbeladenen P(BMDO)-Nanopartikel und die Wirksamkeit des inkorporierten Paclitaxels wurden durch einen Vergleich mit auf dem Arzneimittelmarkt erhältlichen Fertigarzneimitteln nachgewiesen.

2. Theorie

2.1 Allgemeine theoretische Grundlagen

2.1.1 Miniemulsionspolymerisationsverfahren

2.1.1.1 Emulsionen

Als Emulsion wird ein Heterophasensystem aus zwei miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten bezeichnet, bei dem die disperse (innere) Phase in der kontinuierlichen (äußeren) Phase dispergiert vorliegt.

Um die Grenzflächenspannung zwischen diesen nicht mischbaren Phasen zu vermindern werden Tenside als grenzflächenaktive Reagenzien eingesetzt. Die Tenside bilden in Wasser und anderen Lösungsmitteln oberhalb einer als kritisch bezeichneten Konzentration meist kugelförmige Mizellen. Stellt Wasser die kontinuierliche Phase dar, ordnen sich die einzelnen Tensidmoleküle so an, dass ihre hydrophoben Molekülteile in die Mitte der kugelförmigen Mizelle zeigen. In deren Inneren kann dann die hydrophobe, wasserunlösliche disperse Phase stabilisiert werden.

Tenside lassen sich in nicht-ionische und ionische Tenside kategorisieren.

Nicht-ionische Tenside, die in vielen Fällen Block-Copolymere sind (z.B. aus einem hydrophoben Alkylblock und einer hydrophilen Ethylenoxideinheit), stabilisieren die Emulsion sterisch. Dadurch können sich die einzelnen dispergierten Tröpfchen nicht soweit untereinander annähern, dass sie koaleszieren. *Griffin* führte 1954 den „*hydrophilic-lipophilic balance*“-Wert (HLB-Wert) ein, der das Verhältnis von hydrophobem zu hydrophilem Teil eines nicht-ionischen Tensids angibt^[22]. Beispiele für nicht-ionische Tenside sind das aus einem Poly(ethylen-*co*-butylen)block- und einem Poly(ethylenoxid)block-bestehende P(E/B-*b*-EO), das zur Stabilisierung von Nanokapseln im inversen Miniemulsionsprozess eingesetzt werden kann und Lutensol[®] AT50, einem Poly(ethylenoxid)-Hexadecylether mit 50 Ethylenoxid-Einheiten, das im direkten Miniemulsionsprozess verwendet wird.

Ionische Tenside bestehen ebenfalls aus einer hydrophoben Kohlenstoffkette, die eine ionische hydrophile Kopfgruppe trägt. Bei der Annäherung von zwei mit ionischem Tensid bedeckten Tröpfchen kommt es zu einer *Coulomb*-Abstoßung, verursacht durch die gleiche Ladung der Tensid-Kopfgruppen, wodurch eine Stabilisierung des Systems bewirkt wird. Diese elektrostatische Stabilisierung wird in der DLVO-Theorie von *Derjaguin*, *Landau*, *Verveij* und *Overbeek* beschrieben^[23-24]. Die am häufigsten eingesetzten ionischen Tenside sind das kationische Hexadecyltrimethylammoniumchlorid (CTMA-Cl) und das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS).

2.1.1.2 Gliederung der einzelnen Heterophasensysteme

Durch Rühren wird bei konventionellen Emulsionen die disperse in der kontinuierlichen Phase mit Hilfe von Tensiden dispergiert. Dabei können die Tensidkonzentrationen so hoch sein, dass in der kontinuierlichen Phase Tensidmizellen vorliegen. Dennoch zeigen diese Emulsionen eine sehr uneinheitliche Größenverteilung zwischen 100 nm und mehreren μm und neigen zur Phasenseparation.

Bei den erstmals von *Schulmann* et al. beschriebenen Mikroemulsionen^[25] liegt die Tensidkonzentration weit über der kritischen Mizellenkonzentration. Die zusätzliche Verwendung von Cotensiden (meist mittelkettige Alkohole) als oberflächenaktive Substanzen, die selbst keine Mizellen bilden, reduziert die Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen auf ein Minimum von beinahe Null $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Mikroemulsionen bilden sich spontan, sind thermodynamisch stabil und die Tröpfchengrößen betragen zwischen 1 und 100 nm. Mikroemulsionen werden schon seit 1920 für pharmazeutische Anwendungen wie das Löslichmachen von wasserunlöslichen Arzneistoffen eingesetzt.

Bei der Präparation eines Miniemulsionspolymerisationsansatzes werden durch zusätzlichen Energieeintrag die primär dispergierten Tröpfchen einer Emulsion zerkleinert und homogenisiert. Bei den dafür verwendeten Methoden mit Ultraschall (Frequenzen bis 20 kHz) oder Hochdruckhomogenisation entstehen hohe Scherkräfte, die Kavitationen in der Probe mit lokalen sehr hohen Drücken und Temperaturen erzeugen, welche die Homogenisation des Systems bewirken^[26]. Dabei bilden sich Tröpfchen mit der vom Tensid maximal zu stabilisierenden Grenzfläche (größtmögliche Tröpfchenoberfläche insgesamt), die Tröpfchengrößen nehmen dabei ab und die Monodispersität der Probe nimmt zu. Die erzeugten Tröpfchen werden als „kritisch stabilisiert“ bezeichnet^[27]. Dies wird bei einer Miniemulsion über zwei unabhängige Mechanismen erreicht: Tenside stabilisieren die Tröpfchen sterisch bzw. ionische Tenside zusätzlich noch elektrostatisch. Bei direkten Miniemulsionen verhindert ein zugesetztes ultrahydrophobes, osmotisches Reagenz die *Ostwald-Reifung*^[28], ein Anwachsen der großen Tröpfchen zu Lasten der kleinen. Das Reagenz baut in den Tröpfchen einen osmotischen Druck auf, der dem mit wachsenden Tröpfchendurchmesser immer geringer werdenden *Laplace*-Druck entgegenwirkt.

2.1.1.3 Heterophasenpolymerisation und Eigenschaften der Miniemulsionspolymerisation

Werden wasserunlösliche Monomere als innere Phasen verwendet, können diese mittels unterschiedlicher Mechanismen polymerisiert werden. Diese Heterophasenpolymerisationsverfahren sind für die Herstellung von Polymerpartikeln für medizinische Anwendungen sehr

gut geeignet. Die Polymerisationen können in Wasser durchgeführt werden, eine weitere Verwendung der erzeugten Partikeldispersionen in wässrigem bzw. physiologischem Milieu ist damit direkt möglich.

Bei Emulsionspolymerisationen werden die Polymerkolloide durch kontinuierliche Monomer-Diffusion aus den großen Tropfen in die aktiven Mizellen gebildet^[29]. Im Unterschied zu Emulsionspolymerisationen findet bei Miniemulsionspolymerisationen kein effektiver Materialtransport zwischen den Tröpfchen statt. Bei der Miniemulsionspolymerisation bilden sich, bedingt durch die Präparation des Reaktionsansatzes, sehr fein verteilte Monomertröpfchen aus. Jedes für sich kann als eigenständiges System betrachtet werden und stellt einen stabilen „Nanoreaktor“ dar, in dem die Polymerisation stattfindet. Die bei der Polymerisation entstehenden Polymerteilchen haben deshalb die gleiche Größe wie die ursprünglichen Monomertröpfchen^[27]. Durch Variation der verwendeten Tensidmenge lassen sich Tröpfchengrößen im Bereich von 50 bis 750 nm mit einer hohen Monodispersität herstellen^[27]. Somit ist es mit der Miniemulsionspolymerisationstechnik möglich, reproduzierbar Nanopartikel mit einheitlichen Größen für Zellkulturexperimente herzustellen. Einen Vorteil des Miniemulsionspolymerisationsverfahrens in Bezug auf medizinische Anwendungen ist der geringe Einsatz von Tensiden (0,1-5 Gew.-%). Tenside können die Membranfluidität der Zellen im Gewebe stören und sich somit toxisch auf Zellen auswirken^[30-31].

Das Miniemulsionspolymerisationsverfahren ist für verschiedene Polymerisationsreaktionen geeignet. Die gebräuchlichste Art stellt die radikalische Polymerisation dar, mit der eine Vielzahl von Monomeren wie Styrol, Acrylate oder Methacrylate polymerisiert werden können^[28]. Die Initiierung erfolgt mit unterschiedlichen Radikalinitiatoren wie Kaliumperoxodisulfat (KPS), Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) oder 2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril) (V 59). Durch die Copolymerisation von funktionellen Monomeren lassen sich Nanopartikel mit unterschiedlichsten Oberflächenfunktionalisierungen herstellen^[20, 32].

Diese Oberflächenfunktionalisierungen (z.B. Carboxyl-, Amino- oder Phosphonatgruppen) bewirken ein unterschiedliches Zellaufnahmeverhalten der Nanopartikel in diversen Zelllinien und ein geändertes Proteinadsorptionsverhalten auf deren Oberflächen^[16, 33]. Die Oberflächenfunktionalisierungen bieten auch die Möglichkeit, reaktive Gruppen für die Konjugation von weiteren kleinen Molekülen, wie Folsäure oder Antikörper bei sonstiger Verwendung von diesbezüglich nicht reaktiven Monomeren bereitzustellen (siehe 2.1.3.3 und 4.4.3.2).

Das Miniemulsionspolymerisationsverfahren ermöglicht es außerdem hydrophobe Materialien, wie beispielsweise den Fluoreszenzfarbstoff N-(2,6-diisopropylphenyl)-perylene-3,4-

dicarbonacidimid (PMI) in die Nanopartikel zu inkorporieren, die es erlauben Zellaufnahmeexperimenten mit Fluoreszenzmethoden zu analysieren^[34].

Diese Beispiele zeigen das große Potential der Miniemulsionspolymerisationstechnik zur Einbettung von hydrophoben Arzneistoffen in die Matrix von Nanopartikeln.

2.1.1.4 Heterophasenpolymerisationssysteme zur Herstellung von Nanokapseln

Die Synthese von Polymernanokapseln mit dem Miniemulsionsverfahren ist ebenfalls möglich. Hierbei können Flüssigkeiten mittels verschiedener Techniken verkapselt werden. Hydrophobe Flüssigkeiten werden dem Monomer beigemischt, während der Polymerisation erfolgt die Phasentrennung von Flüssigkeit und entstehendem Polymer, dabei entsteht eine Polymerhülle, welche die Flüssigkeit umschließt^[35]. Hydrophile Flüssigkeiten lassen sich durch Grenzflächenpolymerisationen in inversen Miniemulsionsreaktionen verkapseln. Auf diese Weise können auch hydrophile Fluoreszenzfarbstoffe wie Sulforhodamin 101 und CyTM5 Mono NHS-Ester eingekapselt werden. Sie dienen als Modellsubstanzen für hydrophile Arzneistoffe, die in diese Nanokapseln eingebettet werden können. Für die Synthese der Polymerhülle bestehen dabei unterschiedliche Möglichkeiten, die auf die jeweilige Zusammensetzung des Ansatzes abgestimmt werden. Varianten stellen dabei die radikalische^[36] oder anionische Polymerisation^[37] dar, ansonsten kann auch eine Synthese mittels Polyaddition oder Polykondensation^[38-39] erfolgen.

Alternativ kann die Polymerhülle der Nanokapseln auch durch eine „Nanofällung“ eines in der kontinuierlichen Phase gelösten Polymers durch Zugabe eines Nicht-Lösungsmittels erzeugt werden^[40].

Erfolgt die Synthese der Kapseln in nicht-wässrigem Medium, muss anschließend eine Redispersierung in wässrigen Tensidlösungen durchgeführt werden. Danach liegen die Nanokapseln in Wasser dispergiert vor und können im biologischen Milieu eingesetzt werden^[41].

2.1.2 Partikelauftnahmemechanismen der Zellen

Für die Zellaufnahme von Nanopartikeln oder –kapseln, die als Wirkstofftransportsysteme eingesetzt werden, ist das Verständnis für den Aufnahmemechanismus in die Zielzelle bzw. den Wirkort ebenso wichtig wie das Wissen über den Verbleib der nanopartikulären Systeme in Vesikeln, Endosomen und Lysosomen im Zellinneren^[42]. Solche Untersuchungen erlauben

es Nanopartikel zu entwickeln, die eine Freisetzung des Wirkstoffes in den entsprechenden Zellkompartimenten etwa durch pH-Änderungen oder entsprechenden Enzyme ermöglichen. Wesentliche Eigenschaften von Nanopartikeln, welche die Zellaufnahme beeinflussen werden in Abschnitt 2.1.3.3 beschrieben. In den Abb. 2.1 und 2.2 wird ein schematischer Überblick über die möglichen zellulären Aufnahmewege dargestellt.

2.1.2.1 Endozytose

Durch die dynamische Struktur der Plasmamembran wird der Ein- und Austritt von Molekülen (Nährstoffe, Signalmoleküle, Proteinen, etc.) in Zellen kontrolliert. Kleine Moleküle, die zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion essentiell sind, wie z.B. Aminosäuren, Ionen oder Zuckermoleküle, gelangen mittels Transmembranproteinen oder Ionenkanälen in das Zellinnere. Makromoleküle gelangen durch verschiedene Endozytosemechanismen in das Zellinnere, die mit Einstülpungen und Abschnürungen von Teilen der Zellmembran und der Ausbildung von Transportvesikeln einhergehen. Diese Mechanismen, über die auch Nanopartikel und -kapseln aufgenommen werden^[43], lassen sich in Phagozytose- und Pinozytose-Mechanismen unterteilen^[44].

a.) Pinozytose-Mechanismen

Die Fähigkeit zur Pinozytose besitzen alle Zellen. Durch Ausstülpungen der Plasmamembran können Partikel mit einer Größe von mehr als 1 µm durch Makropinozytose (Abb. 2.1, A) internalisiert werden^[45]; Aktin-Filamente sind an diesem Prozess wie auch bei der Phagozytose (siehe unten) beteiligt.

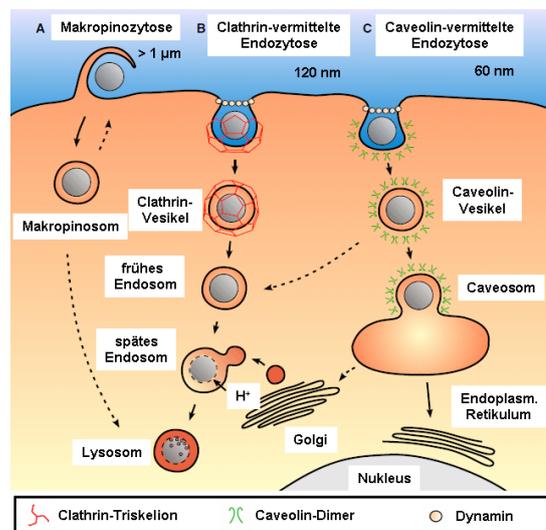


Abb. 2.1: Schematische Darstellung diverser Pinozytose-Mechanismen (nach H. Hillaireau^[42]).

Die Clathrin-vermittelte Endozytose (Abb. 2.1, B) entsteht durch kugelförmige Einstülpungen der Plasmamembran (mit Größen von bis ca. 150 nm), die sich durch die Formierung von Clathrin-Proteinen an den Membraninnenseiten ausbilden^[46]. Clathrin ist ein Hexamer und besitzt die Form eines Triskelions^[47]. Die abgeschnürten Vesikel haben eine durchschnittliche Größe von 120 nm^[44]. Diese Clathrin-Vesikel überführen ihren Inhalt in frühe Endosomen (ca. pH 6). Anschließend reifen diese Endosomen zu späten Endosomen heran (ca. pH 5), die wiederum nach der Fusion mit Vesikeln, die saure Hydrolasen enthalten, zu Lysosomen werden und die internalisierten Partikel abbauen^[48].

Caveolin ist ein weiteres Membranprotein, das in bestimmten Membrandomänen (sogenannten „lipid-rafts“) mit Cholesterol und Sphingolipiden Einstülpungen (ca. 60 nm) in den Plasmamembranen ausbildet (Abb. 2.1, C). Caveolin wird nicht in allen Zellen exprimiert; eine starke Expression ist in Endothelzellen zu verzeichnen^[49]. Die Caveolin-vermittelte zelluläre Aufnahme verläuft deutlich langsamer als Clathrin-vermittelte Endozytose. Die Caveolin-Vesikel enthalten deutlich weniger Enzyme. Pathogene nutzen diesen Aufnahmeweg, um dem lysosomalen Verdau zu entkommen. Eine Caveolin-vermittelte Aufnahme ist daher auch für Wirkstofftransportsysteme zu präferieren^[42]. Es ist bekannt, dass Liganden wie Folsäure, Albumin oder Cholesterol ebenfalls Caveolin-vermittelt internalisiert werden^[48]. Durch Dynamin wird enzymatisch die Abschnürung von Clathrin- oder Caveolin-Vesikeln von der Plasmamembran intrazellulär vermittelt.

Des Weiteren gibt es noch Caveolin- und Clathrin- unabhängige Endozytose-Mechanismen, an denen Dynamin ebenfalls beteiligt ist^[44] (nicht dargestellt in Abb. 2.1).

Die diversen zellulären Aufnahmewege laufen meist auf verschiedenen Wegen parallel ab. Wird ein Weg durch spezifische Inhibitoren gehemmt, ist noch eine Internalisierung der Nanopartikel über andere Aufnahmemechanismen zu detektieren^[43, 50].

b.) Phagozytose-Mechanismen

Zellen (eukaryotische) mit Phagozytoseaktivität sind spezialisierte Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten (neutrophile, basophile und eosinophile) und dendritische Zellen (DC) und Mastzellen, die zur Abwehr von Pathogenen und körperfremden Partikeln sowie zur Elimination von körpereigenen apoptotischen und toten Zellen befähigt sind^[51]. Andere Zellen wie Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen werden als para- und nicht-professionelle phagozytierende Zellen mit einer sehr schwach ausgeprägten Phagozytoseaktivität bezeichnet^[52]. In Abb. 2.2 ist der Ablauf der Phagozytose dargestellt.

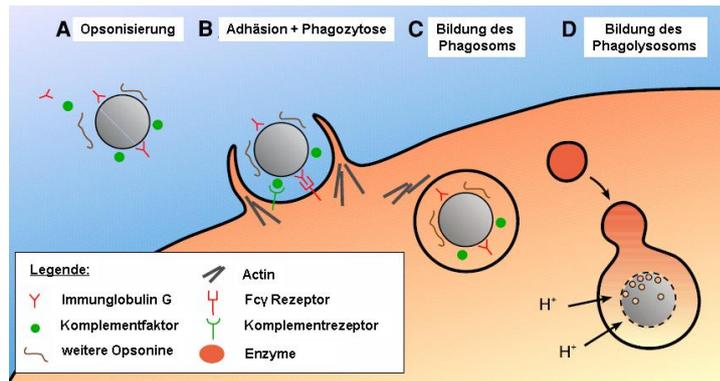


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Opsonisierung und Phagozytose (nach H. Hillaireau ^[42]).

Phagozytose geht mit drei wichtigen Schritten einher. Zuerst werden die körperfremden Partikel mit den Opsoninen (Abb. 2.2, A) (bestimmte Proteine wie Immunglobulin G (IgG) und M (IgM) und die Komplementfaktoren C3, C4 und C5) im Blutstrom besetzt, anschließend mit weiteren Proteinen^[53] (vgl. Abschnitt 2.1.4.3 und Kapitel 2.6 und 4.3). Die opsonierten Partikel binden (Abb. 2.2, B) an den Fc-Rezeptoren (FcR) oder Komplementrezeptoren auf der Zelloberfläche. Andere Rezeptoren wie der Mannose-, Fructose- und Scavenger-Rezeptor können ebenfalls eine Rolle bei der Phagozytose von Makrophagen und dendritischen Zellen spielen^[51, 54]. Die Rezeptorbindung löst eine Signalkaskade der Rho-Familie der GTPasen (Guanosintriphosphatasen) aus^[55], welche die Aktinformierung und die Ausbildung von Pseudopodien um den Nanopartikel herum auslöst und schließlich zur Aufnahme des Partikels in Phagosomen (Abb. 2.2, C) im Zytoplasma führt^[56]. Die Häufigkeit dieser Fusionierungen hängt von den Oberflächeneigenschaften des Nanopartikels ab und verläuft zwischen einer halben und mehreren Stunden nach Exposition^[51]. Das Phagosom fusioniert mit späten Endosomen und Lysosomen zu Phagolysosomen (Abb. 2.2, D), deren pH-Wert durch Protonen, die von der membranständige ATPase (Adenosintriphosphatase) in das Zellinnere gepumpt werden, erniedrigt wird; des Weiteren gelangen Enzyme wie Esterasen und Cathepsine in die Phagolysosomen^[57].

Einfluss der Partikelgröße

Von Korn et al. konnte gezeigt werden, dass Polystyrol-Partikel bis 3 µm phagozytiert werden können^[58]. Für Partikel, bestehend aus anderen Polymeren, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie bis zu einer Partikelgröße von mehreren Mikrometern phagozytiert werden. Unter anderem wurden Studien mit Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA)^[59], modifizierter Cellulose^[60], sowie Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polyalkylcyanoacrylat (PACA)^[59] durchgeführt. Für Liposomen gibt es Studien, welche den Einfluss von deren Größe auf die Quantität der zellulären Aufnahme unterschiedlich bewerten^[61-63]. Ein Grund

hierfür könnte der Einfluss der Oberflächeneigenschaften darstellen (siehe unten). In Gegenwart von Plasmaproteinen zeigte sich, dass die Größe einen bedeutenden Einfluss auf die Opsoninadsorption hat und infolgedessen auf die Phagozytose. Mit zunehmender Größe nimmt die Oberflächenbedeckung mit Opsoninen von Lipid-Nanokapseln zu^[64]. Es wird diskutiert, dass bei kleineren Nanopartikeln eine ausreichende Bedeckung mit Opsoninen in der aktiven Konfiguration, die für eine effektive Komplementaktivierung erforderlich ist, aufgrund ihrer starken Oberflächenkrümmung schwieriger zu erreichen ist, als bei größeren Nanopartikeln mit geringerer Oberflächenkrümmung^[65].

Einfluss von Oberflächeneigenschaften der Partikel

Die physikochemischen Eigenschaften der Partikeloberfläche beeinflussen deren Interaktionen mit den Phagozytenmembranen sowie mit Opsoninen. Ionische und hydrophobe Wechselwirkungen sind hauptsächlich verantwortlich für die Adsorption von Proteinen auf der Partikeloberfläche. Neben spezifischen Komplementfaktoren begünstigen bestimmte adsorbierte Proteine die Phagozytose der Partikel^[53]. Hierzu gehören Immunglobulin IgG und Fibrinogen^[53, 66]. Proteine mit Dysopsonin-Charakter wie Serumalbumin verlängern die Zirkulationszeit im Blutstrom^[66-67] (siehe Kapitel 2.1.6).

Wechselwirkungen der unterschiedlichen Oberflächenstrukturen von Nanopartikeln mit den Zellmembranen der Zellen des MPS wurden in vielen Studien als wesentliches Aufnahmekriterium beschrieben.

Beispielsweise zeigten positiv und negativ geladene Polymer-Nanopartikel gegenüber ungeladenen eine deutlich größere zelluläre Aufnahme in Makrophagen^[60, 68]. Die Beobachtung, dass negativ geladene Partikel mehr Komplementfaktoren aktivieren als positiv geladene, kann darin begründet sein, dass die Menge an adsorbierten Proteinen und das Verhältnis von Opsonin zu Dysopsonin sich unterscheiden. Dysopsonine schwächen die Erkennung durch Phagozyten ab^[69]. Im Falle von Polymer-Nanopartikeln wird die negative Ladung mit einer stärkeren Aufnahme verbunden^[65]. Insbesondere für negativ geladene Partikel wurden unspezifische Wechselwirkungen mit unspezifischen Rezeptoren für anionische Phospholipide wie Scavenger-Rezeptor B oder CD36 (immunphänotypisches Oberflächenmerkmal, engl. *cluster of differentiation*) nachgewiesen^[70]. Des Weiteren konnten durch Kopplungen von Liganden wie Antikörpern oder Mannose Liposomen erfolgreich in Monozyten und Makrophagen gebracht werden^[71-72].

Die Hydrophobizität der Oberflächen ist ausschlaggebend für die Opsonisierung. Nanopartikel, die aus hydrophoben Polymeren bestehen, wie Polystyrol^[21, 73], Polylaktid (PLA)^[74], Poly(laktid-*co*-glykolid) (PLGA)^[75] und Poly(butylcyanoacrylat) (PCA)^[76] unterliegen einer großen Adsorption von Ig, Komplementfaktoren und anderen Plasmaproteinen wie Albumin, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*^[21, 77]. Es wurde nachgewiesen, dass auf hydrophoben Oberflächen andere Proteine adsorbieren als auf hydrophilen und dass für IgG und Albumin eine hohe Affinität für hydrophobe *van der Waals*-Wechselwirkungen^[78-79] besteht. Generell wird jeder körperfremde Partikel oder Liposom opsonisiert und dann von Zellen des MPS phagozytiert. Sind die Partikel < 50-100 nm oder haben eine hydrophile Beschichtung (beispielsweise PEG), welche Proteine und Opsonine abstößt, wird die Aufnahme von Zellen des MPS reduziert^[80] (siehe 2.1.3.3). Eine PEGylierung reduziert somit die Opsonisierung und die zelluläre Aufnahme in Zellen des MPS^[81-82]. Dies führt zu einer längeren Zirkulation in der Blutbahn nach intravenöser Applikation^[83]. Durch die Länge und Anzahl der PEG-Einheiten kann die Dauer der Zirkulationszeit eingestellt werden^[84]. In letzter Zeit wurden auch die Polysaccharide als mögliche Alternative zu hydrophilen Polymeren diskutiert^[85-87].

Einfluss der Partikelform

Die Form der Partikel stellt einen entscheidenden Einflussfaktor dar, um das Phagozytoseverhalten von Partikeln zu kontrollieren. Die bisher untersuchten Partikel besitzen vorwiegend eine sphärische Form. Zunehmend werden Partikel mit anderen Formen in Bezug auf deren Phagozytoseaktivität analysiert. *Champion* et al. analysierten ellipsoide und diskoide Polystyrol-Partikel und konnten zeigen^[88], dass Ellipsoide innerhalb von wenigen Minuten internalisiert werden, wenn der Makrophage am spitzen Ende anhaftet und es über 12 h dauert, wenn der Makrophage zuerst auf der flachen Seite den Kontakt findet. Für den Phagozytoseprozess werden Aktinfilamente benötigt, um die Bildung und das Abschnüren der Phagosomen zu vollziehen. Dieser Prozess funktioniert mit steifen Partikeln besser als mit weichen Partikeln. Dies wurde von *Beningo* et al. mit harten und weichen Polyacrylamid-Partikeln derselben molaren Masse und denselben Oberflächeneigenschaften nachgewiesen^[89]. Dieses Ergebnis wird damit begründet, dass Bakterien und andere Pathogene meist eine steife Zellwand haben.

Andererseits kann die Steifheit der Partikel auch einen gegensätzlichen Effekt auf die Opsonisierung haben. Starre Liposomenmembranen aus Cholesterol und gesättigten Phospholipiden mit einem hohen Schmelzpunkt verlangsamten die Komplementaktivierung und senkten damit die Phagozytoserate^[63]. Auch Kern-Schale-Partikel mit einer starren Polystyrol-Schale

werden schlechter aufgenommen als Kern-Schale-Partikel mit einer verformbaren Polymethylacrylat (PMA)^[90]. Ähnliche Beobachtungen wurden von Lorenz et al. mit diversen Zellkulturlinien gemacht^[91]. Dies wird damit begründet, dass flexible Partikel eine größere Anzahl von Oberflächeninteraktionen mit dem biologischen Umfeld ermöglichen. Es wurde gezeigt, dass unabhängig von der Opsonisierung die Kontaktstelle der Partikel mit der Oberfläche der Makrophagen Unterschiede bezüglich der Phagozytoserate verursacht.

c.) Alternative Aufnahmemechanismen von Phagozytose-fähigen Blutzellen

Die Internalisierung von Nanopartikeln in professionelle Phagozyten verläuft nicht zwangsläufig über die in Abschnitt 2.1.2.1 b.) beschriebenen Phagozytosemechanismen. Makropinozytosemechanismen können für die Internalisierung von Nanopartikeln eine größere Relevanz haben als Phagozytosemechanismen^[92]. Bartneck et al.^[54] zeigten in Studien mit Makrophagen, dass eine Blockade der phagozytosespezifischen Fc^[93]- und Mannose-Rezeptoren mit Piceatannol bzw. Mannan^[94] nicht zu einer Reduzierung der intrazellulären Aufnahme von Gold-Nanopartikeln (< 50 nm) geführt hat. Die Größe der internalisierten, Nanopartikel-enthaltenden Vesikel von > 1 µm bestätigten einen makropinozytotischen Aufnahmeweg^[44].

Des Weiteren werden insbesondere für neutrophile Granulozyten ein Einschließen von Nanopartikeln in extrazellulären Strukturen (engl. *neutrophil extracellular traps*, NET) diskutiert^[95]. Diese Strukturen bestehen überwiegend aus DNA und antimikrobiellen Proteinen, die der Abwehr von Pathogenen dienen. Vorwiegend Nanopartikel mit positiver Oberflächenladung zeigten eine Lokalisierung in den NET^[92]. NET sind nicht auf neutrophile Granulozyten beschränkt, sondern wurden beispielsweise auch in Mastzellen beschrieben^[96].

2.1.3 Polymere und nanopartikuläre Arzneistoffformulierungen

Die Definition eines Arzneimittels schließt nicht nur den Wirkstoff ein, sondern ebenso alle weiteren zugesetzten Stoffe, die für die Herstellung der geeigneten Applikationsform notwendig sind:

Arzneimittel sind nach der Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel alle „Stoffe oder Stoffzusammensetzungen, die a) zur Heilung oder zur Verhütung von menschlichen Krankheiten, oder b) die am oder im menschlichen Körper verwendet werden

oder einem Menschen verabreicht werden können, um entweder die menschlichen physiologischen Funktionen durch eine pharmakologische, immunologische oder metabolische Wirkung wiederherzustellen, zu korrigieren oder zu beeinflussen oder eine medizinische Diagnose zu erstellen“. Stoffe werden in diesen Richtlinien wiederum definiert als „Stoffe jeglicher Herkunft, und zwar menschlicher (z.B. Immunglobuline aus menschlichem Blut), tierischer (z.B. Mikroorganismen oder Toxine), pflanzlicher (z.B. Pflanzenextrakte) oder chemischer (z.B. synthetisch gewonnene Substanzen) Herkunft“.

Um biotechnologische Produkte wie Proteine oder Antikörper, die von Natur aus eine Größe zwischen 2 – 15 nm haben und ebenfalls therapeutische Anwendung finden, von arzneistoffbeladenen Nanovektoren (engl. *nanomedicines* oder *nanopharmaceuticals*) unterscheiden zu können, hat die European Science Foundation diese als „nanoskalierte Komplexsysteme, bestehend aus mindestens zwei Komponenten, wobei eine davon den aktiven Inhaltsstoff darstellt“, bezeichnet^[97].

2.1.3.1 Diverse Applikationsformen unter dem Aspekt von Biodistribution und -verfügbarkeit

Die Möglichkeiten, Arzneimittel zu applizieren, sind vielfältig; dies kann unter anderem oral, rektal, topisch, sublingual, subkutan oder intravenös erfolgen (Abb. 2.3).

Arzneistoffe werden in verschiedenen Darreichungsformen verabreicht, die beispielsweise eine genaue Dosierung, Dispergierung, Lösung oder retardierte Freisetzung des Arzneistoffes ermöglichen sowie eine stabile Lagerung und Schutz vor Umwelteinflüssen wie Licht oder Oxidation gewährleisten. Die Art und die Häufigkeit der Arzneimittelgabe spielt für die Therapietreue (engl. *compliance*) des Patienten und somit für den Therapieerfolg eine entscheidende Rolle.

Die diversen Applikationsformen müssen mit den entsprechenden Eigenschaften ausgestattet sein, um den Wirkstoff direkt in das Zielgewebe oder über die Blutbahn an den Wirkort zu transportieren. Dies stellt an den Arzneistoffe bzw. die Arzneistoffformulierung hohe Anforderungen. Die Freisetzung des Wirkstoffes aus der Arzneistoffformulierung, die Resorption, die Distribution im Organismus sowie die Metabolisierung und Exkretion des Wirkstoffes sind entscheidende Faktoren, welche die tatsächlich vorliegende Konzentration des Wirkstoffes am Wirkort beeinflussen. Dieses grundlegende Prinzip wird mit LADME bezeichnet und steht für die englische Abkürzung von Liberation „L“ (dt. *Freisetzung*), Absorption (dt. *Aufnahme*) „A“, Distribution (dt. *Verteilung*), „D“, Metabolism (dt. *Metabolisierung*) und Excretion „E“ (dt. *Ausscheidung*)^[98-99].

Strukturelle Modifikationen des Wirkstoffes oder der Zusatz von Hilfsstoffen können der Darreichungsform die hierzu benötigten speziellen Eigenschaften verleihen. Es muss gewährleistet werden, dass eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes vorliegt und die therapeutische Dosis am Wirkort erreicht wird.

Viele physiologische Barrieren sind vorhanden, um den menschlichen Körper vor Krankheitserregern und körperfremden Substanzen zu schützen. Sofern keine lokale Applikation am Wirkort (beispielsweise bei Erkrankungen der oberen Hautschichten, des äußeren Gehörganges oder der Bindehaut) möglich ist, müssen Wirkstoffe bzw. deren Applikationsformen diese Barrieren überwinden (Abb. 2.3).

Muss der Arzneistoff tieferliegende Hautschichten, das Bindegewebe oder innere Organe erreichen und kann nicht in therapeutischen Dosen über die Haut resorbiert werden, muss eine andere Applikationsform gewählt werden. Die äußeren Barrieren bilden Haut und Schleimhäute mit ihren entsprechenden sekretorischen Drüsen sowie ihrem jeweiligen biologischen Milieu mit charakteristischem pH-Werten und Bakterien-Besiedelungen.

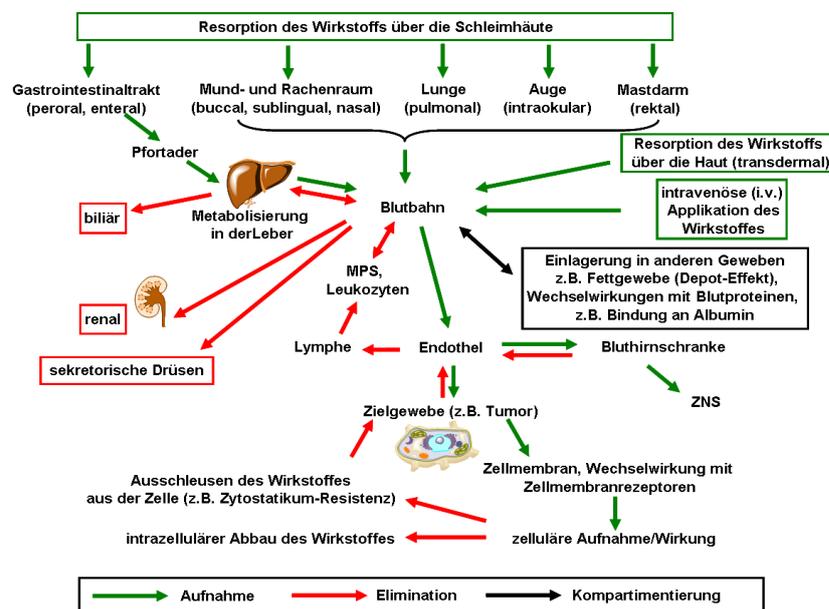


Abb. 2.3: Schematische Darstellung von diversen Aufnahme- und Eliminationswegen eines Arzneistoffs sowie einer möglichen Kompartimentierung.

Die zellulären und humoralen Bestandteile des Immunsystems bilden eine weitere Barriere (siehe 2.1.2.1 b.) und 2.1.4.3). Wird das Arzneimittel oral verabreicht, muss die Arzneistoffformulierung den Wirkstoff bei der Passage des Mund- und Rachenraumes sowie des Magen-Darm-Traktes vor Änderungen des pH-Wertes oder enzymatischem Abbau durch Verdauungsenzyme schützen. Andererseits muss eine Freisetzung des Wirkstoffes im Darmabschnitt,

in dem der Wirkstoff resorbiert werden kann, gewährleistet sein. Anschließend wird der Wirkstoff zuerst über die Pfortader die Leber passieren (First-Pass-Effekt), dabei zu einem Anteil metabolisiert werden und anschließend erst über die Blutbahn im Körper verteilt werden. Durch entsprechende Arzneistoffformulierungen, die die Pfortader umgehen (rektal, i.v.) oder durch strukturelle Modifikation des Arzneistoffs kann der First-Pass-Effekt reduziert werden^[99]. Des Weiteren bestehen Möglichkeiten zur Beeinflussung der Zirkulationsdauer des Wirkstoffes in der Blutbahn (z.B. durch Bindung an Albumin oder PEGylierung (siehe 2.1.3.3). Stoffwechselprodukte werden schließlich auf unterschiedlichen Wegen, vorwiegend renal oder biliär über die Fäces, eliminiert; auch dieser Vorgang kann durch entsprechende Modifikationen verändert werden. Zusätzlich ist es möglich die Freisetzung des Arzneistoffes aus der entsprechenden Applikationsform zu retardieren (siehe 2.1.3.5), um über eine längere Zeit eine gleich bleibende Menge des Wirkstoffes abzugeben^[99].

Die Löslichkeit des Arzneistoffs stellt bestimmte Anforderungen an die Eigenschaften der Arzneistoffformulierung^[100]. Hydrophilie bzw. Lipophilie des Arzneistoffes beeinflussen die Distribution in der Blutbahn sowie die Bindung an Serumalbumin^[101] (Bsp. Warfarin^[102-103]) und die Wechselwirkungen mit weiteren Blutbestandteilen. Lipophile Arzneistoffe werden zu einem hohen Maß im Fettgewebe eingelagert und müssen somit weitaus höher dosiert werden und ein daraus resultierender Depoteffekt muss in Betracht gezogen werden. Die Verteilung des Wirkstoffes in periphere Kompartimente muss entsprechend untersucht werden.

Anhand dieser Einführung zeigt sich, wie anspruchsvoll die Entwicklung geeigneter Applikationsformen ist. Nanopartikel oder Nanokapseln, die als Wirkstofftransportsysteme entwickelt werden, müssen hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen mit diesen physiologischen Barrieren untersucht werden und ihren Benefit gegenüber etablierten Darreichungsformen erweisen.

2.1.3.2 Entwicklungen von Applikationsformen für neue Wirkstoffklassen

Die Entwicklungen von Arzneiformen mit neuen Eigenschaften fokussieren sich stark auf den organspezifischen Wirkstofftransport. Es werden nanopartikuläre Wirkstofftransportsysteme entwickelt, die den Wirkstoff gezielt (siehe 2.1.3.3) in ein bestimmtes Organ, Gewebe, in eine Zellart oder in eine Zellorganelle, wie Zellkern oder Mitochondrien bringen sollen. Im Besonderen ist dies für Arzneistoffe mit starken Nebenwirkungsraten wie beispielsweise Zytostatika erforderlich. Die Natur liefert mit den Antikörpern und dem Komplementsystem ein Vorbild (siehe 2.1.4.3). So können auch Transportsysteme, die Zytostatika enthalten und

beispielsweise mit spezifischen Antikörpern versehen sind, mit Antigenen auf der Zelloberfläche der Zielzellen reagieren^[12].

Durch Fortschritte im Bereich der Molekularbiologie und Gentechnik erlangen gentechnologisch gewonnene Wirkstoffe immer größere Bedeutung, hierzu gehören Nukleinsäuren für eine somatische Gentherapie und vor allem Peptide, Proteine, Antikörper und Impfstoffe. Wirkstoffe wie Proteine und Peptide können leicht metabolisiert werden, sind empfindlich gegenüber Veränderungen des pH-Wertes im Gastrointestinaltrakt und daher für andere Applikationswege außer dem parenteralen Weg problematisch^[2, 104]. Hier gilt es neue Applikationsformen zu entwickeln. Beispiele hierfür sind die gentechnologisch hergestellten Wirkstoffe Pegfilgrastim (Neulasta[®], Amgen Europe B.V.), ein kovalentes Konjugat des rekombinanten humanen Granulozyten-Kolonie stimulierenden-Faktors (G-CSF) mit einem einzelnen 20 kDa PEG-Molekül^[105] und der Gerinnungsfaktor Faktor VIII (KOGENATE Bayer, Bayer Pharma AG)^[106].

Nanopartikel und -kapseln stellen hoffnungsvolle Alternativen als Trägersysteme für neue Wirkstoffklassen wie therapeutische Proteine und Peptide dar. Eine enzymatische Spaltbarkeit oder Bioabbaubarkeit des zur Synthese eingesetzten Materials ist wünschenswert^[107-108].

2.1.3.3 Nanopartikel als Wirkstofftransportsysteme: Eigenschaften, Biodistribution und organspezifischer Wirkstofftransport

Nanopartikel als Wirkstofftransportsysteme können theoretisch auf diversen Applikationswegen eingesetzt werden. Biodistribution und Elimination zeigen Parallelen zu bewährten Darreichungsformen, aber auch vorteilhafte Eigenschaften, die ein enormes Entwicklungspotential von Nanopartikeln und -kapseln erwarten lassen^[53, 109]. Hohe Wirkstoffkonzentrationen können durch Einlagerung in die Matrix von Nanopartikeln oder durch Inkorporation in Nanokapseln in die Zielzellen gebracht werden. Es können bereits durch die zelluläre Aufnahme weniger Nanopartikel oder -kapseln hohe intrazelluläre Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden. Hierdurch können schwach wirksame Arzneistoffe in ausreichenden therapeutischen Dosen im Zielgewebe angereichert werden.

Kritisch zu betrachten sind Aspekte hinsichtlich der Toxizität^[80, 110]. Neben der intrazellulären Aufnahme der nanopartikulären Systeme gilt es auch, inter- und transzelluläre Transportmechanismen durch Epi- und Endothelgewebe^[111] sowie eine mögliche Exozytose^[112] der Nanopartikel zu erforschen. Im Folgenden werden nun die Eigenschaften von Nanopartikeln und -kapseln als Applikationsform für einen Wirkstofftransport diskutiert.

Besondere Eigenschaften von Nanopartikeln

Nanopartikel und Nanokapseln besitzen spezielle physikalische und chemische Eigenschaften. Sie vereinen Eigenschaften von Molekülen wie eine hohe Mobilität durch hohe Diffusionskoeffizienten mit mechanischen und optischen Eigenschaften von Festkörpern^[113]. Sie besitzen eine große spezifische Oberfläche, das heißt eine große Oberfläche bei sehr kleinem Volumen. Der Einfluss von Oberflächenladungen und -funktionalisierungen sowie von Oberflächenkräften (*van der Waals*-Kräfte) ist bei nanopartikulären Systemen bedeutend. Einzelne Nanopartikel können eine große Anzahl an funktionellen Gruppen auf den Molekülen tragen^[20]. Große Oberflächenanteile können für spezifische chemische Reaktionen genutzt werden (beispielsweise Katalyse) oder in biologischen Systemen mit bestimmten Strukturen wechselwirken^[114-115]. Spezifische Liganden auf der Nanopartikeloberfläche können für einen organspezifischen Wirkstofftransport eingesetzt werden (siehe unten). Toxikologische Auswirkungen dieser Wechselwirkungen müssen ebenfalls untersucht werden^[110, 116]. Nanopartikel besitzen durch oben genannte Eigenschaften die Fähigkeit zur Agglomeratbildung. *Limbach et al.*^[117] zeigten, dass der Agglomerationsprozess von CeO₂-Nanopartikeln stark größenabhängig ist. In den für Zellkulturstudien relevanten Konzentrationen ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) agglomerieren Nanopartikel mit einem Durchmesser von 20 nm stärker und schneller als Nanopartikel mit einem Durchmesser von 320 nm. Nanopartikel und Nanokapseln müssen deshalb durch ionische oder sterische Tenside oder durch den Einfluss ihrer Oberflächenladungen ausreichend stabilisiert werden. Das Zeta-Potential einer Nanopartikeldispersion gibt Hinweise auf deren elektrostatische Stabilisation. In physiologischer Umgebung führen Wechselwirkungen der Nanopartikel und -kapseln mit Proteinen auf deren Oberflächen zur Ausbildung einer „Proteinkorona“ (siehe 2.6). Dies kann zu einer Ladungsstabilisierung bzw. sterischen Stabilisation der Nanopartikel im Zellkulturmedium^[118] und zu einer verminderten Agglomerationstendenz beitragen^[119]. Allerdings bleiben auch bei agglomerierten Nanopartikeln charakteristische Eigenschaften bezüglich einer großen reaktiven Oberfläche erhalten. Diffusion von Nanopartikeln und Sedimentation von Nanopartikelagglomeraten innerhalb eines Zellkulturexperiments (*in vitro*) können entscheidende Kriterien in Bezug auf die verzeichnete Zellaufnahme darstellen und müssen hinsichtlich der Expositionszeit und der möglichen Veränderung der hydrodynamischen Radien der Nanopartikel kritisch betrachtet werden.

Biodistribution von Nanopartikeln: Chancen und Restriktionen

Alle oben genannten physiologischen Barrieren (Abb. 2.3) müssen auch von Nanopartikeln oder –kapseln, die als Wirkstofftransportsysteme eingesetzt werden, überwunden werden.

Die erste Barriere stellt die Haut dar. *Lademann* et al. haben TiO₂-Nanopartikel, wie sie in Sonnencreme verwendet werden, untersucht. Für Nanopartikel > 100 nm konnte keine Penetration durch die intakte Haut, für Nanopartikel < 40 nm eine Penetration in dendritische Zellen der Haut festgestellt werden^[120]. Allerdings konnte in den Haarfollikeln eine Verweildauer von verschiedenen großen Nanopartikel von bis zu 10 Tagen beobachtet werden. Hier zeigen Nanopartikel mit einem Durchmesser von 500 – 600 nm, die mit dieser Größe der Breite der schindelartigen Strukturen der Haare entsprechen, die längste Verweildauer in den Haarfollikeln. Für therapeutische Anwendungen beispielsweise zur Behandlung von Akne könnte dies eine vielversprechende Größe darstellen^[121-122].

Eine pulmonale Aufnahme von Nanopartikeln über die Lunge ist ebenfalls möglich^[123]. Um diese Barriere intensiver zu erforschen werden geeignete Modellsysteme entwickelt^[124-125].

Oral verabreichte Nanopartikel sind der schützenden Schleimschicht (*lat.* Mucus) der verschiedenen Epithelgewebe des Mund- und Rachenraumes und des Verdauungstraktes, mit Glykokalyx, Immunglobulin A (IgA), diversen Verdauungsenzymen und unterschiedlichen pH-Werten (pH 2-8) ausgesetzt. *Bade* et al. untersuchen diese äußerst komplexen Einflüsse, welche auf Nanopartikel im Verdauungstrakt wirken^[126]. Der Schwerpunkt dieser Studien liegt auf der Bewertung von toxischen Einflüssen, die von Nanopartikeln aus der Umwelt, wie anorganischen Pigmenten oder Abgasen, ausgehen und Auswirkungen auf den menschlichen Verdauungstrakt haben. Um solche „technischen Anwendungen“ von Nanopartikeln sicherer zu machen, gehen die Entwicklungen hin zu Nanopartikeln mit mukophileren und membranophobischeren Eigenschaften. Hierzu müssen die Interaktionen der Nanopartikel im Verdauungstrakt genauer untersucht werden. *Ucciferri* et al. entwickeln ein geschlossenes Testsystem^[127] mit Caco-2-Zellen (Dickdarm-Karzinom-Zellen), das unter Berücksichtigung von fließendem Medium und auftretenden Scherkräften die *in vivo*-Bedingungen besser imitieren soll^[128]. Eine Entwicklung eines Hepatocyten-Modells wird ebenfalls vorangetrieben. In der Leber und Milz werden ein Großteil der nanopartikulären Substanzen, die aus der Pfortader kommen oder in der Blutbahn zirkulieren von phagozytierenden Zellen des MPS, in der Leber im speziellen von *Kupffer*-Zellen (Abb. 2.7), aufgenommen und abgebaut. Nanopartikel mit einer Größe von < 100 nm gelangen durch das Endothel der Leber und können so einer raschen Elimination in der Leber entgehen^[129].

Intravenös applizierte Partikel sind im Blutstrom unmittelbar mit dem Immunsystem und dem MPS konfrontiert. Die komplexen Wechselwirkungen von Nanopartikeln und –kapseln mit einer Vielzahl von Proteinen im biologischem Milieu werden in Abschnitt 2.6 ausführlich betrachtet. Eine PEGylierung stabilisiert sterisch nanopartikuläre Wirkstoffsysteme und verlängert die Zirkulationsdauer im Blutstrom durch eine Verminderung der Adsorption von opsonisierenden Proteinen, die zu einer Rezeptor-vermittelten zellulären Aufnahme durch Zellen des MPS führt^[84, 130]. PEG ist als wasserlösliches Polymer besonders gut geeignet, da es nicht toxisch und als pharmazeutischer Hilfsstoff zugelassen ist. PEG wird zu einem hohen Maß hydratisiert und schützt so den nanopartikulären Wirkstofftransporter vor Proteinadsorption^[2].

Aufgrund der oben beschriebenen Aspekte ist der bisher favorisierte Weg für medizinische Anwendungen von globulären Nanopartikeln die intravenöse Applikation. Die Metabolisierung und Eliminierung der Nanopartikel erfolgt über das MPS oder renal für Nanopartikel und deren Abbauprodukte $< 10 \text{ nm}$ ^[80].

Passiver Wirkstofftransport von Nanopartikeln

Der passive Mechanismus (engl. *passive targeting*) nutzt die strukturellen Eigenheiten von entzündetem und tumorösen Gewebe oder generell von Geweben mit abnormaler Neovaskularisation, bei denen das Endothel fenestriert und permeabler für größere kolloidale Substanzen ist. Wichtig für eine passive Akkumulation im Zielgewebe ist eine möglichst lange Zirkulationsdauer der Nanopartikel in der Blutbahn (siehe 2.1.3.3). Blutgefäße transportieren Moleküle und Sauerstoff zu allen Geweben und Organen im Körper. Das Endothel kleidet das Gefäßlumen aller Blut- und Lymphgefäße als einzellige Schicht aus. Diese Barriere kontrolliert den Stoffaustausch zwischen Gefäß und Gewebe und ist an der Angiogenese, der Regulation des Blutdrucks sowie an der Entstehung von Entzündungsprozessen beteiligt. Je nach Gefäßart ist es unterschiedlich aufgebaut. Es werden drei Endothelarten unterschieden: das kontinuierliche, das fenestrierte und das diskontinuierliche^[80]. Das kontinuierliche Endothel ist durch „Tight junctions“, die mit 10 nm zu klein sind für den Transport kolloidaler Substanzen^[131], gekennzeichnet; der Stofftransport wird durch hochselektive Transportmechanismen kontrolliert. Das kontinuierliche Endothel ist beispielsweise in Arterien und Venen^[132] in den Lungen sowie in der Blut-Hirnschranke zu finden^[133]. Das fenestrierte Endothel^[134] besitzt eine kontinuierliche Basalmembran und kommt beispielsweise in endokrinen Drüsen, in der Darmmukosa und in den Nierenglomeruli vor. Diese Fenestrierungen besitzen Poren von etwa 60 nm. Das diskontinuierliche Endothel der

Leber^[135] (Fenestrierungen von 50 – 100 nm) und des Knochenmarks ist so durchlässig, dass komplette Zellen passieren können (siehe 2.1.4.1 a.)). Endothelzellen der Venen sind an der Ausbildung von neuen Blutgefäßen beteiligt. Die Angiogenese ist für verschiedene Krebsarten gut beschrieben^[136], genauso wie für Augenerkrankungen und entzündliche Krankheiten, bei denen antiangiogene Wirkstoffe zur Therapie eingesetzt werden^[137]. Die Angiogenese während des Tumorwachstums resultiert in einer fehlerhaften Hypervaskularisation und einer mangelhaften Ausbildung des Lymphsystems. In dieses tumoröse Gewebe ist ein passiver Wirkstofftransport der Nanopartikel aufgrund dieses „Enhanced Permeability and Retention“ (EPR)-Effekts möglich^[9, 138]. Der EPR-Effekt erlaubt es Makromolekülen oder Nanopartikeln mit Größen bis über 400 nm durch das löchrige Endothel zu permeieren und im tumorösen Gewebe zu akkumulieren^[10, 139]. Neben Tumorerkrankungen sind viele Augenerkrankungen durch abnormale Neovaskularisation oder Angiogenese und erhöhte vaskuläre Durchlässigkeit gekennzeichnet. Hierzu gehören die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) oder die diabetische Retinopathie. Für alle diese Krankheiten ist ein therapeutischer Einsatz von Nanopartikeln denkbar. Nanopartikel können also im Sinne eines passiven Wirkstofftransports biologische Barrieren überwinden, extravasieren und so der hepatischen Filtration entkommen.

Aktiver Wirkstofftransport von Nanopartikeln

Eigenschaften von pathologisch veränderten Geweben sind beispielsweise ein veränderter pH-Wert, die (Über-)Expression von diversen Oberflächenrezeptoren und die zunehmende Aktivität spezieller Enzyme^[140]. Solche Charakteristika werden eingesetzt, um das Zielgewebe zu adressieren (engl. *aktive targeting*) und dort eine bevorzugte Akkumulation des nanopartikelären Wirkstofftransportsystems zu erreichen. Solch ein zielgerichteter Transport von Nanopartikeln oder -kapseln erfordert eine Chemi- oder Physisorption von Liganden auf deren Oberfläche, die dann mit den spezifischen Zielstrukturen im Zielgewebe reagieren. Diese Liganden können Antikörper, entwickelte Antikörper-Fragmente, Proteine, Peptide, kleine Moleküle oder Aptamere sein^[141-142]. Aktive Transportmechanismen nutzen hochspezifischen Interaktionen (beispielsweise Ligand-Oberflächenrezeptor oder Antikörper-Antigen) zwischen dem Liganden und dem Zielgewebe oder den Zielzellen, um eine Akkumulation der Nanopartikel zu erreichen^[143-144]. Therapeutisch werden heute Antikörper in der klinischen Praxis zur Behandlung von sehr spezifischen Krankheiten eingesetzt. Dazu gehören beispielsweise Trastuzumab (Herceptin[®])^[145], gerichtet gegen den „Human Epidermal Growth Factor Receptor 2“ (HER-2)-exprimierenden Brustkrebs sowie Bevacizumab gegen

den „Vascular Epidermal Growth Factor“ (VEGF) (Avastin[®])^[146], wodurch die Angiogenese gehemmt wird. Der bisherige Einsatz von therapeutischen Antikörpern erscheint hoffnungsvoll, was zur Entwicklung von Immunkonjugaten geführt hat, welche die Spezifität der Antikörper nutzen, um einen potenten Arzneistoff gezielt in das erkrankte Gewebe zu bringen. Ein Beispiel ist das in den USA zur Radio-Immunotherapie (¹³¹Jod) von non-*Hodgkin* Lymphomen zugelassene Tositumomab, das sich gegen CD20-positive B-Zellen richtet (Baxxer[®]).

Momentan werden nanopartikuläre Wirkstofftransportsysteme entwickelt, die mit Antikörpern, Proteinen oder anderen Liganden funktionalisiert sind, um diese zielgerichtet in das Gewebe zu bringen.

Antikörper haben einen hydrodynamischen Radius von ungefähr 20 nm; werden sie auf der Nanopartikeloberfläche angebunden, verändern sie deren Größe beträchtlich. Es ist wichtig, den Einfluss solcher Liganden auf die Eigenschaften der Nanopartikel zu untersuchen. Studien an nicht-menschlichen Primaten zeigten keine toxikologischen Effekte nach einer Applikation mit Transferrin-ligierten Nanopartikeln über drei Wochen^[147].

Peptide können für einen aktiven Wirkstofftransport genutzt werden. Im Vergleich zu Antikörpern sind sie kleiner, stabiler und wirken weniger immunogenisierend.

Des Weiteren kommen kleine Moleküle wie Folsäure (siehe unten), Dopamin oder Adrenalin sowie verschiedene Zucker, wie z. B. Laktose, Gallaktose und Mannose für den Einsatz als Liganden in Betracht, die mit Rezeptoren bzw. Lektinen im Zielgewebe interagieren können. Für bestimmte Lektine auf den Zellmembranen von Krebszellen konnte nachgewiesen werden, dass sie im Speziellen Zuckermoleküle internalisieren können^[148]. Eine weitere Möglichkeit stellen synthetisch hergestellte DNA- oder RNA- Oligonukleotide, sogenannte Aptamere^[149] dar. Pegaptanib, ein anti-VEGF-Aptamer wurde als erstes Produkt dieser Art im Jahr 2004 von der FDA zugelassen. *Farokhzad* et al. benutzten Aptamere als Liganden für polymere Nanopartikel^[150] und zeigten deren Wirksamkeit gegen Prostatakrebs *in vivo*.

2.1.3.4 Folsäure als Ligand auf Nanopartikeln und -kapseln

Folsäure und Folate, die reduzierten Derivate der Folsäure, sind essentiell für viele verschiedene metabolische Prozesse und unter anderem essentiell für den C1-Stoffwechsel bei der Synthese von Purinen und Pyrimidinen (speziell Thymin) und somit für die DNA-Synthese^[151] und damit verbunden auch für Zellteilung und -wachstum. Die zelluläre Aufnahme der Folsäure und der Folate kann mit Folat-Transportern wie dem „*Reduced-folate carrier*“ (RFC)^[152] und dem „*Proton-coupled folate transporter*“ (PCFT)^[153] erfolgen oder

durch membranständige Folsäure-Rezeptoren (FR α - δ)^[154] vermittelt werden. RFC wird ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert und der Folat-Transport (physiologisch wirksame Tetrahydrofolate, THF) erfolgt vorwiegend über diesen transmembranständigen Transporter.

Folat-Rezeptoren werden hingegen nur in wenigen gesunden Geweben, aber in diversen Krebsarten exprimiert^[152, 154].

- FR α wird von ca. 40% aller Krebsarten exprimiert^[155-156]. FR α kommt in wenigen gesunden Geweben wie den Nieren, der Blase, den Lungen, den Hoden, dem Rektum und der Plazenta^[155] vor.
- FR β wird von aktivierten Makrophagen, die an Entzündungsherden akkumulieren^[157], und von malignen Zellen des hämatopoetischen Systems^[155, 158] exprimiert. Aktivierte Makrophagen kommen vermehrt bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Krankheiten wie der rheumatoide Arthritis oder Morbus Crohn vor. FR β wird auch von neutrophilen Granulozyten exprimiert und ist ein Indikator für deren zunehmende Reifung^[159].
- FR γ wird auf gesunden hämatopoetischen Zellen^[160] und auf malignen leukämischen Zellen^[158] exprimiert.
- FR δ wurde auf regulatorischen T-Zellen entdeckt^[161].

FR α und FR β sind membrangebundene Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine^[162] und werden mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose internalisiert^[163-164]. FR γ mangelt es an einem effizienten Signal für GPI-vermittelte Modifikationen^[165].

Physiologische Regulation und Einfluss von FR α auf die Tumorgenese

Die physiologische Rolle von FR α wird kontrovers diskutiert. Prinzipiell wird die Expression des FR α -Genes (FOLR1) durch eine Senkung des extrazellulären Folsäure-Spiegels, einen steigenden Homocysteinspiegel (invers zum Folsäure-Spiegel), Steroidhormonkonzentrationen, Interaktionen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren und Proteinen im Zytosol und möglichen Genmutationen gefördert^[152].

Auch wenn der Primärtumor ursprünglich nicht FR α -positiv war, sind viele Metastasen FR α -positiv.

- FR α könnten den Tumoren insofern einen Vorteil verschaffen, dass sie die Folsäure-Aufnahme aus der Blutbahn steigern und somit das Zellwachstum und die Zellteilung beschleunigen.

- Weitere Studien weisen darauf hin, dass durch die Expressierung von FR α -Rezeptoren die Zellproliferation durch Stimulierung von Signalwegen innerhalb der Zelle angeregt wird^[166-167]. Es wurde festgestellt, dass der Verlust der Caveolin-Expression, eines potentiellen Tumor-Suppressors, invers in Bezug zu der Anzahl an exprimierten FR α -Rezeptoren steht^[168].
- FR α könnten aber auch in der frühen Phase der Karzinogenese die Folsäure-Aufnahme erhöhen um DNA-Schäden zu reparieren, die zur Synthese von fehlerhaften Transkriptionsfaktoren oder Proteinen führen^[169]. Die Unfähigkeit der betroffenen Zellen, diese Schäden zu reparieren, könnte zu einer weiteren Verstärkung der Expression von FR α führen und damit zu einem zellulären Milieu, das die Tumorphprogression fördert.

Der Zusammenhang zwischen FR α -Tumorexpression und der Überlebensrate der Patienten wurde insbesondere für Ovarialkarzinome untersucht und mit Tumor Progression^[170], Platin-Resistenz und schlechter Gesamtprognose assoziiert^[171]. Dies deutet auf metabolische Defekte hin, die auf eine Hochregulation der FR α Expression in frühen Tumorstadien hinweisen. *Toffoi et al.*^[171] konnten feststellen, dass Patienten mit Epithel-Ovarial-Karzinomen und einer niedrigen FR α -Expression eine bessere Ansprechrate auf die Chemotherapie und eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit haben. Die Autoren erklärten das mit einer Möglichkeit der Reparatur von DNA-Schäden, die durch die Platintherapie verursacht werden, wenn durch die FR α -Expression ausreichend Folsäure in den Zellen vorhanden ist.

FR α für einen organspezifischen Wirkstofftransport

Die Expression von FR α , die auf verschiedene Gewebe beschränkt ist, ermöglicht die Nutzung für einen FR α -selektiven organspezifischen Wirkstofftransport von Zytostatika in Tumorgewebe und damit die Reduktion von Nebenwirkungen in anderen Geweben. Die Basis für die Selektivität ist begründet in der Substratspezifität von Folsäure zu FR α . Die Bindungskapazität von Folsäure an FR α ist ca. 10-mal höher im Vergleich zu reduzierten Folaten^[172-173]. *Leamon et al.* zeigten 1991, dass verschiedene Substanzen wie Meerrettichperoxidase mit Folsäure gekoppelt und via FR α endozytotisch in Zellen transferiert werden können^[174]. Später zeigten sie, dass ein Folsäure-Toxin-Konjugat das Zytoplasma erreichen und seine Wirkung entfalten kann^[175].

FR α steht im Fokus des aktiven, Folsäure-vermittelten nanopartikulären Wirkstofftransports aufgrund seines eingeschränkten Vorkommens in gesundem Gewebe und der Überexpression

in vielen Tumorarten. Die höchste Rezeptoraffinität wird erreicht, wenn die γ -Carboxylgruppe der Folsäure für eine Konjugation mit einem anderen Molekül verwendet wird. Folsäure bzw. Folate werden intrazellulär als Polyglutamate durch Glutamatsubstitution an der γ -ständigen Carboxylgruppe gespeichert und verlieren somit bei Substitution an dieser Stelle nicht ihre physiologische Aktivität^[173, 175].

Die Folsäure-Aufnahme über den FR α erfolgt mit Caveolin-vermittelter Endozytose^[173, 176-179] (siehe 4.4.4.5).

Medizinische Anwendungen von Folsäure-Konjugaten

Eine große Zahl an Folsäure-gekoppelten therapeutischen und diagnostischen Agenzien wurde in den letzten Jahren an FR α -positiven Tumorzellen getestet. Dies sind nicht nur chemotherapeutische Wirkstoffe mit kleinem Molekulargewicht, sondern auch Liposomen mit eingeschlossenem Wirkstoff und immuntherapeutischen Agenzien^[180]. Auch mit Folsäure-gekoppelte Polymere^[181] und Nanopartikel wurden entwickelt^[179, 182-183]. Des Weiteren wurden in den letzten Jahren Folsäure-Konjugate für nonvirale „Gen-Delivery“-Techniken^[181] und Folat-gekoppelte nichtlineare polykationische Dendrimere als Wirkstofftransporter für therapeutische oder diagnostische Zwecke^[184-185] entwickelt.

2.1.3.5 Einsatz von diversen Polymeren für verschiedene Applikationsformen

Die meisten Polymere, die heute in der Medizin eingesetzt werden, stammen ursprünglich nicht aus dem Bereich der medizinischen Forschung, sondern aus der Polymerchemie und den Materialwissenschaften und dementsprechend technischen Anwendungen. Für ihren Einsatz in medizinischen Anwendungen wurden sie in erster Linie aufgrund ihrer Struktureigenschaften ausgewählt und nicht aufgrund ihrer Biokompatibilität oder ihrer Bioabbaubarkeit. Polymerbasierte Applikationsformen werden seit langer Zeit für viele Fertigarzneimittel eingesetzt und sind aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften in der pharmazeutischen Technologie unverzichtbar geworden.

a.) Betrachtungen von Makromolekülen und Polymeren

Makromoleküle mit einer relativen Molekülmasse $> 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und oligomere Hilfsstoffe finden in der pharmazeutischen Technologie sowohl als vollsynthetische (z.B. Polyethylenglykole), halbsynthetische (z.B. Hydroxyethyl- oder Carboxymethylstärke) und natürliche (Polysaccharide und Proteine, z.B. Albumin) seit langem eine breite Anwendung^[99]. Makromolekulare Hilfsstoffe zeichnen sich durch ihre vielfältigen Eigenschaften bezüglich ihrer

Konstitution, Konformation, Konfiguration sowie die Möglichkeit Substituenten einzubringen (z.B. Methylcellulose) und die Makromoleküle zu vernetzen und dadurch deren Eigenschaften zu modifizieren, aus. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, übermolekulare Strukturen auszubilden, wie beispielsweise bei Cyclodextrinen^[186] und Gelatine oder linearen, einfach- oder mehrfachverzweigten Polyethylenen^[99]. Eine Übersicht über diverse polymere Arzneistoffformulierungen ist in Abb. 2.4 gegeben.

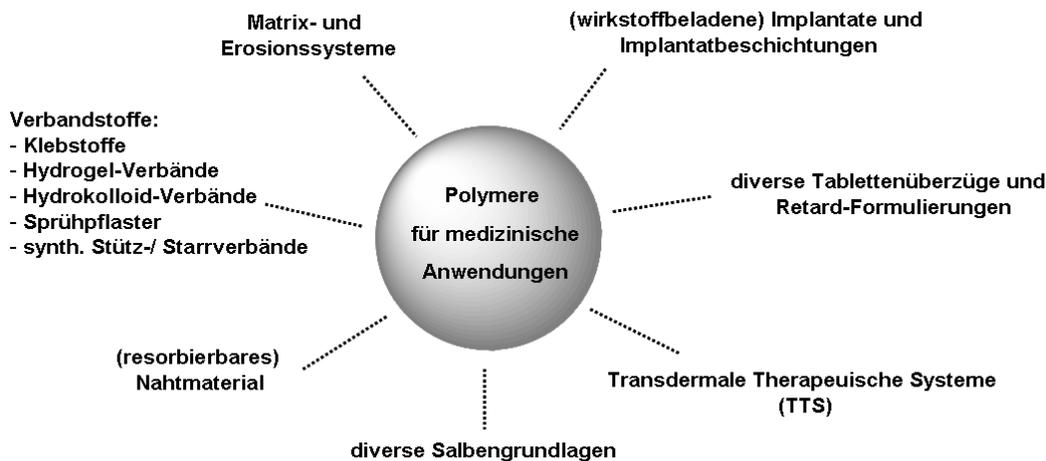


Abb. 2.4: Polymere in diversen medizinischen Anwendungen.

Native Oligo- und Polysaccharide, wie Kartoffel-, Mais-, Reis- und Weizenstärke, werden als Füll- und Sprengmittel für die Tablettierung sowie als Bindemittel und Pudergrundlage verwendet. In neueren Entwicklungen bieten verschiedene Polymere große Fortschritte, beispielsweise bei der Entwicklung von pH-abhängigen Tablettenüberzügen oder bei der Entwicklung von retardierten Arzneiformen. Stärken lassen sich physikalisch modifizieren; hierdurch entstehen kaltlösliche Stärken (vorverkleisterte Stärken Sta-RX[®] 1500). Die freien Hydroxy-Gruppen der Glucose erlauben Hydroxyethylierungen mit Ethylenoxid zu Hydroxyethylstärke (HES), die sowohl als Verdickungsmittel wie auch als Plasmaersatzflüssigkeit verwendet wird^[187] (siehe 4.4.4).

Unmodifizierte Cellulose wird als Füllmittel oder Trockenbindemittel verwendet. Substituierte Cellulosen wie beispielsweise Methylcellulose oder Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) zeichnen sich je nach Substitutionsgrad durch eine bessere Löslichkeit in Wasser oder Wasser/Ethanolgemischen aus und können zusätzlich als Überzugsmaterial, polymerer Emulgator (HPMC) oder Einbettungsmaterial (z. B. Ethylcellulose) verwendet werden. Durch gezielte Veränderungen der verschiedenen Substituenten lassen sich somit Filmbildner herstellen, die bei unterschiedlichen pH-Werten löslich sind. Mit HPMC lassen sich genauso wie mit Cellulosephthalaten (CAP), einem anionischen Celluloseester, bei dem freie OH-Gruppen mit Acetyl-Resten verestert sind, magensaftresistente Überzüge

herstellen. Methacrylsäure-Acrylat-Copolymere (Eudragite[®], Evonik Röhm GmbH) gibt es in vielfältigen Kombinationen. Sie können aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften als Filmbildner-, Überzugs- und Einbettungsmaterialien verwendet werden. Poly(ethylacrylat-methylmethacrylat) (PEMMA), z.B. als Eudragit[®]NE im Handel, ist nicht-ionisch, wasserunlöslich und wird für Diffusionsüberzüge verwendet. Copolymere aus Methacrylsäure und Methylmethacrylat (PMA-co-PMMA) (z.B. 1:1, Eudragit[®]L 100 und 1:2, Eudragit[®]S 100) enthalten Carboxylgruppen und sind anionisch. In wässrigen Lösungen mit einem pH < 6,0 bzw. 7,0 sind sie unlöslich^[99, 188]. Sie werden für magensaftresistente, dünndarmlösliche Überzüge verwendet. Weiteren Einsatz finden Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyacrylsäuren (PA) und Polyethylenglykole (PEG, Macrogole) (vgl. 2.1.3.3). Letztere finden vielfältigen Einsatz als Lösungsmittel, Einbettungsmittel, hydrophile Salben- und Suppositoriengrundlagen, Überzugsmaterial und Gleitmittel. Polyethylenglykole sind Polykondensationsprodukte des Ethylenoxids. Je nach Polymerisationsgrad haben die Macrogole flüssige (Molekülmasse 200-600), vaselineartige (Molekülmassen 800-1500) oder wachsartige Konsistenz (Molekülmasse 2000-6000). Die Wasserlöslichkeit und die Hygroskopizität nehmen mit steigendem Polymerisationsgrad ab^[99].

Des Weiteren zählen Polymere der Marke Resomer[®] (Evonik Röhm GmbH), aus Polylaktid und Poly(laktid-co-glykolid), zu den synthetisch, bioabbaubaren Polyestern und basieren auf den Membranbausteinen Milchsäure und Glykolsäure^[189]. Diese können auch mit weiteren Monomeren, wie z.B. Polyethylenglykol, Trimethylencarbonat oder ϵ -Caprolacton, kombiniert werden^[190]. Im Säugetierorganismus kommt es bei der Polymerdegradation zur Hydrolyse der Esterbindungen, dabei entstehen Oligomere, die bis zu den Monomeren abgebaut werden, die dann zu den Endprodukten Kohlendioxid und Wasser metabolisiert werden. Solche bioabbaubaren Polymere werden zur Herstellung bioresorbierbarer Schrauben und Platten oder koronarer Stents eingesetzt sowie von wirkstoffbeladenen Implantaten oder Depotsysteme, die intramuskuläre oder subkutan appliziert werden^[108, 191-192].

Weitere Wirkstofffreisetzungssysteme für andere Applikationswege wurden entwickelt, beispielsweise für eine topische Langzeitapplikation als Pflaster (transdermale therapeutische Systeme, TTS) zur Applikation von schmerzstillenden Opioiden. Daraus resultieren Vorteile, wie eine kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffes über mehrere Tage und infolgedessen ein konstanter therapeutischer Blutspiegel^[193]. Dadurch wird die Therapietreue des Patienten verbessert sowie der Magen-Darm-Trakt nicht belastet.

Eine breite Verwendung finden Polymere aber auch als Verbandstoffe. Diese bestehen aus Fasern oder Geweben natürlicher oder synthetischer Herkunft, um unterschiedlichste

Anforderungen zu erfüllen, wie steriles Abdecken der Wunden, Blutungen oder Körpersekrete aufzusaugen, Arzneistoffe in Wunden zu applizieren, Körperteile zu verbinden oder zu stützen^[99]. Neben Cellulosefasern (hohe Wasserbindungskapazität) werden viele Fasern aus der Textilindustrie eingesetzt. Polyamide zeichnen sich durch eine hohe Festigkeit aus, diverse Polyester werden als Polyesterwatten oder chirurgisches Nahtmaterial mit einer hohen Dauerzugfestigkeit (Polyethylenterephthalat) eingesetzt. Resorbierbare Fäden werden aus Polymeren und Copolymeren von Polyglykol- und Polymilchsäure hergestellt^[194]. Polyurethan-Fäden werden wegen ihrer Elastizität zur Herstellung von dauerelastischen Binden und Polyurethanschäumen als hydroaktive Wundauflagen verarbeitet. Hydroaktive Verbände, wie Hydrokolloid-Verbände oder Hydrogel-Verbände, lagern Wundsekrete unter Gelbildung ein, schaffen dadurch in der Wunde ein feuchtwarmes Mikroklima und verkleben nicht mit der Wunde.

Bei diversen Implantaten stellen fibröse Einkapslungen des Materials, schlechte Gewebsintegration oder toxikologische Effekte große Probleme dar. Polymere Arzneistoffformulierungen als Beschichtungen von Implantaten (engl. *coatings*) sollen das Einwachsen von Hüftimplantaten verbessern sowie Immunreaktionen reduzieren^[195].

b.) Nanoskalierte polymere Wirkstofftransportsysteme

Mit multifunktionalen und bioabbaubaren Polymeren werden zukünftig neue Strategien für regenerative Therapien auf dem Gebiet der Nanomedizin, insbesondere für den intrazellulären Wirkstofftransport, den Transport in Zellorganellen oder für diagnostische Zwecke entwickelt^[196]. In Abb. 2.5 sind diverse nanopartikuläre Wirkstofftransportsysteme dargestellt.

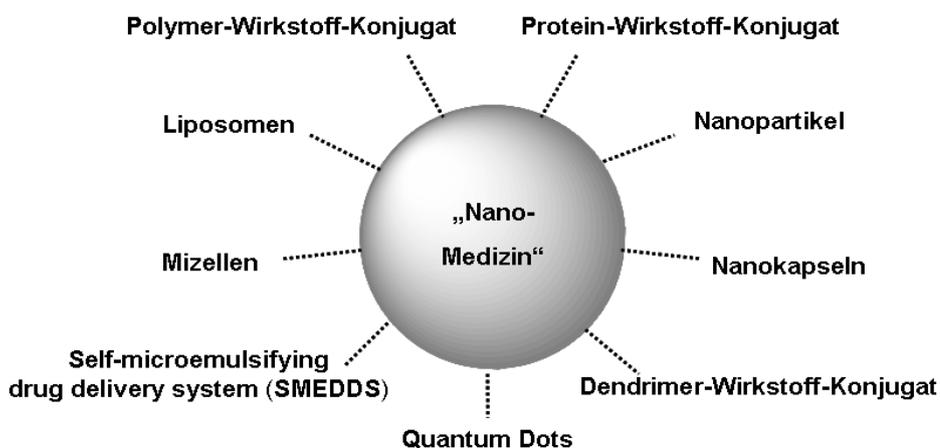


Abb. 2.5: Diverse nanopartikuläre Wirkstofftransportsysteme.

Besonderes Interesse gilt dem Verständnis von biologischen Strukturen und dem biomimetischen Ansatz, diese als Bauplan für neue Materialien zu verwenden^[197]. In der Arbeitsgruppe von *Nolte* (Neijmegen) wurden künstliche Organellen und Multi-Enzym-

Nanoreaktoren nach dem Vorbild von Zellorganellen entwickelt^[198]. *Bruns* et al. inkorporierten Quantum Dots und superparamagnetische Eisenoxid Nanokristalle (engl. *superparamagnetic iron oxide*, SPIO) in sogenannten „Nanosomen“ mit einer durchschnittlichen Größe von 200 nm ein, die in ihrem Aufbau Chylomikronen entsprechen. Stoffwechselwege und Metabolismus können so *in vivo* untersucht werden^[199].

Einsatz von diversen Polymeren für Nanopartikel

Für jede spezielle Anwendung werden Biomaterialien mit besonderen Eigenschaften und Funktionen benötigt und müssen dafür entsprechend entwickelt werden^[197, 200].

Mit dem Miniemulsionspolymerisationsverfahren wurden in unserer Arbeitsgruppe Nanopartikel und –kapseln mit besonderen Eigenschaften hergestellt und deren Interaktionen in Zellkulturexperimenten untersucht. Beispielsweise müssen mechanische und thermische Eigenschaften des Materials sowie eine mögliche Permeabilität oder Impermeabilität für Wasser und Sauerstoff^[201] oder eine entsprechende Oberflächenfunktionalisierung^[3, 16, 91, 202] erreicht werden. Eine Unbedenklichkeit der Materialien in Bezug auf eine toxikologische Wirkung muss ebenso überprüft werden wie Auswirkungen auf Angiogenese oder mögliche Immunreaktionen. Auswirkungen auf die biologische Signalübertragung müssen anhand von (stamm-) zellbiologischen Untersuchungen ausgeschlossen werden bzw. eine Biokompatibilität mit Zellen aus dem entsprechenden Gewebe gewährleistet werden. Beschichtungen von Titan-Implantaten mit Nanopartikeln, die Phosphonatgruppen auf der Oberfläche tragen, fördern das Einwachsen in das Knochengewebe^[203]. Eine Bioabbaubarkeit ist im Speziellen wünschenswert für Nanopartikel, die den Wirkstoff definiert freisetzen sollen^[107, 188]. Beispiele für bioabbaubare, biokompatible Polymere sind Polyglykolsäure (engl. *polyglycolic acid*, PGA) und dessen Copolymere wie PLGA und PLA^[107, 194]. Auch die Abbauprodukte dürfen nicht toxisch sein. Sie sollen idealerweise über den Zellstoffwechsel verstoffwechselbar sein und renal eliminiert werden können. Eine Untersuchung der Bioabbaubarkeit *in vitro* in Zellkulturmedien oder in Pufferlösungen gibt nur bedingt Aufschluss über das Verhalten des Polymers *in vivo*.

In der vorliegenden Arbeit werden Nanopartikel und –kapseln eingesetzt, die aus diversen Monomeren oder Polysacchariden hergestellt wurde, deren Verwendung in der modernen Medizin bereits Eingang gefunden hat. Polystyrol ist biologisch inert und wird beispielsweise für die Herstellung von medizinischen Gefäßen, wie Blutentnahmeröhrchen und Probengefäße eingesetzt. Zusätzlich werden Nanopartikel aus hydrolytisch spaltbarem Poly(5,6-Benzo-2-methylen-1,3-dioxepan) (P(BMDO), Synthese Herr Dr. Jörg Max Siebert) in Bezug

auf ihre Toxizität und Eignung als Wirkstofftransportsysteme in Zellkultur untersucht. Verschiedene mit inverser Miniemulsion hergestellte Nanokapseln (Synthese Frau Dr. Grit Baier) aus biokompatiblen und im Europäischen Arzneibuch verzeichneten Monomeren und Polysacchariden werden in dieser Arbeit in verschiedenen Zellkulturen untersucht.

2.1.4 Humanes Blut und seine Komponenten

In der vorliegenden Arbeit ist eine Methode etabliert worden, um die Nanopartikelaufnahme in ausgewählte Leukozytengruppen durchflusszytometrisch zu untersuchen und anschließend mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie zu bestätigen.

Die Untersuchungen werden *ex vivo* in Vollblutproben durchgeführt und stellen einen wichtigen Schritt zur Untersuchung der Nanopartikelaufnahme in Leukozyten in Zellkultur (*in vitro*) und einer *in vivo*-Applikation dar (Abb. 2.6).

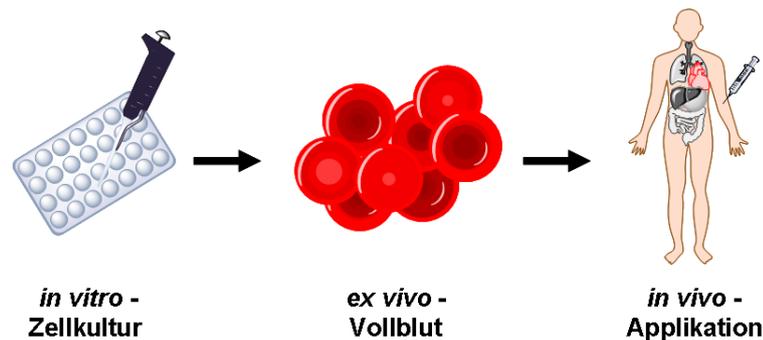


Abb. 2.6: Rahmenbedingungen für biologische Experimente.

Soweit nach bisherigen Literaturrecherchen bekannt ist, wurden Nanopartikelaufnahmestudien in Leukozyten nur entweder aus zuvor isolierten Leukozyten oder Makrophagen durchgeführt^[204-205] oder als biologisch veränderte Zellkulturlinien kultiviert (z.B. murine Makrophagen-Zelllinien RAW264.7^[206-207] und J774A1^[208]) durchgeführt. Das in dieser Arbeit etablierte Analyseverfahren soll die Lücke zwischen Testverfahren in Zellkultur (*in vitro*) und Tierversuchen (*in vivo*) schließen (siehe 4.2) und eine Inkubation der Nanopartikel in peripherem Vollblut in physiologischer Umgebung ermöglichen (*ex vivo*).

Im Vergleich zu Zellkulturexperimenten mit immortalisierten Leukozyten-Zelllinien (z.B. Jurkat-Zellen, immortalisierte T-Lymphozyten^[209]) und in Monozyten-/ Makrophagen-ähnlichen Zelllinien^[210] sind in peripherem Vollblut alle weiteren zellulären und azellulären Bestandteile in physiologischen Konzentrationen, wie z. B. Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten bzw. Plasmaproteine, Peptide, Aminosäuren, Elektrolyte etc., enthalten, mit

denen die Nanopartikel *in vivo* nach einer intravenösen Injektion konfrontiert werden. Es sind im Vergleich zu fötalem Kälberserum (FCS), das in Zellkulturmedien eingesetzt wird, auch Gerinnungsfaktoren und Fibrinogen enthalten. Diesem Testsystem müssen allerdings Antikoagulanzen zugesetzt werden, die in den Blutentnahmeröhrchen vorhanden sein müssen (siehe 2.1.4.2), um ein Gerinnen zu verhindern.

2.1.4.1 Physiologische Funktion des Blutes

Die Blutzusammensetzung ist äußerst komplex und beinhaltet verschiedene Zellsysteme mit unterschiedlichen Funktionen, Proteine, Elektrolyte, verschiedene Stoffwechselmetabolite, Hormone und weitere Signal- und Botenstoffe (z.B. Zytokine), die Bestandteile komplizierter Signalkaskaden sind. Eine permanente Blutzirkulation durch das Blutgefäßsystem aller höheren Organismen sowie die Verbindungen zum Lymphsystem und die Grenzflächen zu den extrazellulären Kompartimenten ist essentiell für die Erhaltung der Funktionsfähigkeit aller Organe und die Ermöglichung von Austauschprozessen zwischen den Geweben.

Die physiologischen Funktionen des Blutes sind vielschichtig und lassen sich mit den folgenden aufgeführten wichtigsten Merkmalen beschreiben^[211].

- **Atmungsfunktion:** Kernlosen Erythrozyten transportieren mit dem Blutstrom Sauerstoff von der Lunge zu den Organen und Kohlenstoffdioxid wieder zurück.
- **Regulationsfunktion:** Durch den Transport von Botenstoffen wie Hormonen und Zytokinen, werden verschiedene Prozesse (z.B. die Hämatopoese) reguliert. Außerdem steuern Puffersysteme die Einhaltung eines physiologischen pH-Wertes von 7,38-7,42. Des Weiteren ist das Blut an der Regulation des Wasserhaushalts und der Körpertemperatur und durch den Transport von Albumin an der Regulation des osmotischen Drucks beteiligt^[211].
- **Stoffwechselfunktionen:** Nährstoffe, die aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden, gelangen über die Pfortader (Ausnahme Rektum, siehe Abschnitt 2.1.3.1, Abb. 2.3) in die Leber und werden dort metabolisiert, gegebenenfalls gespeichert oder über den Blutstrom zur Versorgung der Gewebe weitertransportiert. Abfallprodukte und toxische Substanzen, überschüssige Salze und Wasser werden von den Geweben zu den Ausscheidungsorganen wie Leber und Galle, Niere und Drüsen transportiert.
- **Schutzfunktion:** Das Blut enthält hochspezialisierte Zellen und Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Außerdem transportiert es Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten, die essentiell für die Blutgerinnung sind.

Das Blut (6-8% des Körpergewichts, ca. 5 L bei einem Erwachsenen) kann unterteilt werden in die zellulären Bestandteile (ca. 45 Vol.-%) und das Blutplasma (ca. 55 Vol.-%). Das Blutserum ist das Blutplasma ohne Fibrin, Fibrinogen und weiteren Gerinnungsfaktoren. In einem Milliliter Blut sind bei Erwachsenen durchschnittlich $8 \cdot 10^6$ Leukozyten (weiße Blutzellen) enthalten; davon sind 20-40% Lymphozyten, ca. 2-8% Monozyten und ca. 50-70 % neutrophile Granulozyten, 1-4% eosinophile Granulozyten und 0-1% basophile Granulozyten^[92, 211].

Zum detaillierteren Verständnis werden in den folgenden Abschnitten noch weitere theoretische Betrachtungen zu einzelnen Themengebieten ausgeführt.

a.) Hämatopoese

In Abb. 2.7 ist die Hämatopoese (Bildung der Blutzellen) des Menschen dargestellt. Sie findet im roten Knochenmark in der Substantia spongiosa von Rückenmark, Hüftknochen und Brustbein statt. Lymphatische Zellen werden zusätzlich im Appendix, den Peyer-Plaques oder bei Kindern auch in der Thymusdrüse gebildet.

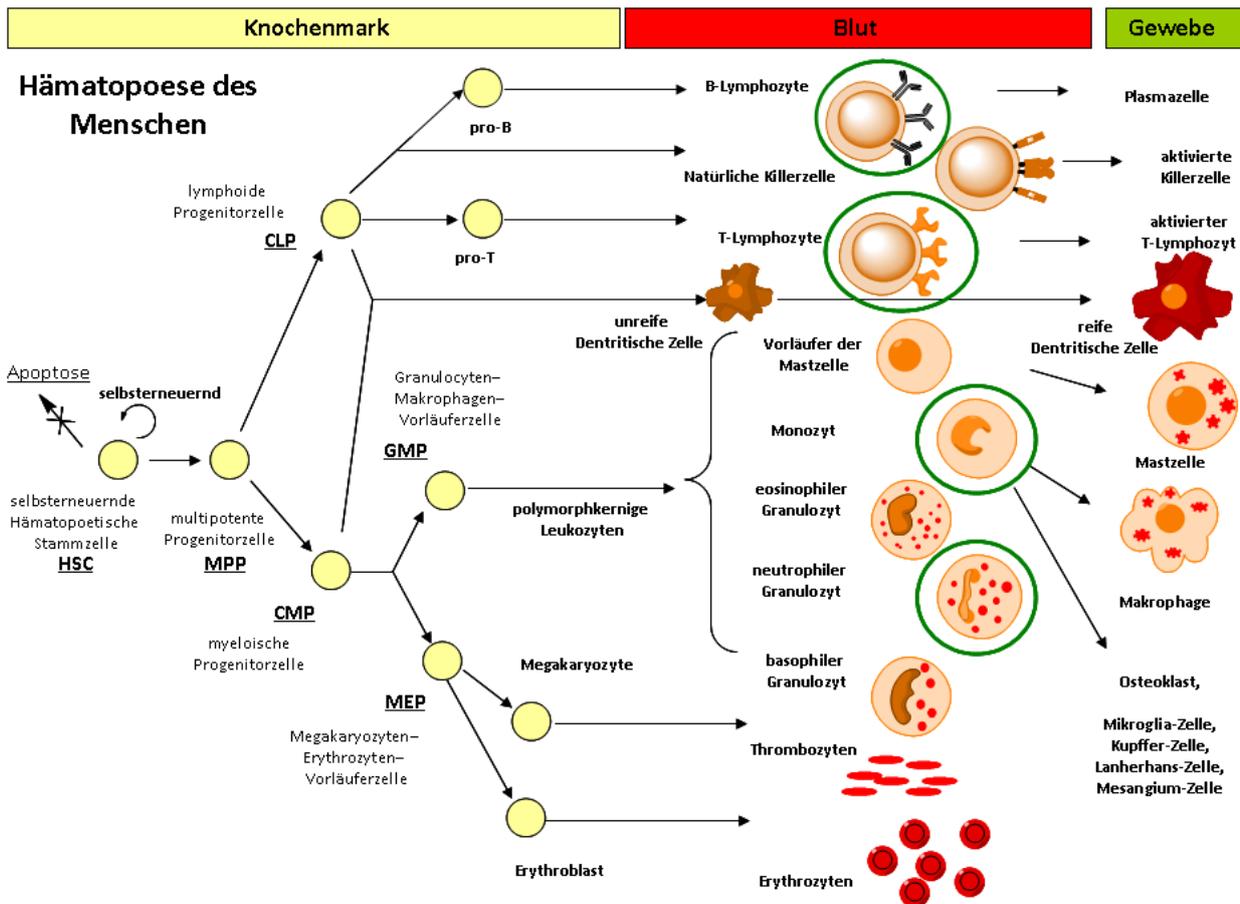


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Hämatopoese.

Bei Erwachsenen nimmt das blutbildende Mark eine Gesamtmasse von 1000 bis 1200 g ein und gehört somit zu den größten Organen. Die Blutzellbildung findet permanent statt, ein Erwachsener produziert täglich schätzungsweise 10^{11} Granulozyten, 2×10^{11} Erythrozyten und ebenso viele Thrombozyten. Die Hämatopoese^[211] ist ein sehr komplexer und hochregulierter Prozess, der sehr anpassungsfähig an die Bedürfnisse des Organismus ist. Die proliferierenden und differenzierenden Knochenmarkszellen können in verschiedene Abstammungslinien, entsprechend ihrer daraus resultierenden reifen Blutzellen, eingeteilt werden.

Die „myeloide“ Abstammungslinie schließt Erythrozyten, Thrombozyten, die verschiedenen Granulozyten (neutrophile, basophile und eosinophile), sowie Monozyten/Makrophagen ein. Aus der „lymphoiden“ Abstammungslinie gehen Lymphozyten sowie die natürlichen Killerzellen hervor. Alle Blutzellen gehen aus einer pluripotenten selbsterneuernden hämatopoetischen Stammzelle (HSC) hervor und produzieren einen dauerhaften Pool von multipotenten Progenitorzellen (MPP) und damit die daraus resultierenden lymphoiden (engl. *common lymphoid progenitor*, CLP) und myeloischen Progenitorzellen, (engl. *common myeloid progenitor*, CMP) (siehe Abb. 2.7). Diese differenzieren sich weiter zu entsprechenden Zellen ihrer Abstammungslinie. Die Proliferation und Differenzierung erfolgt durch eine spezifische Kontrolle von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen^[212]. Erythropoetin, ein Polypeptid, wird von den Nieren ausgeschüttet, wenn der Sauerstoffgehalt zu gering ist und regt damit die Bildung von Erythrozyten an. Verschiedene Kolonie-stimulierende Faktoren (engl. *colony stimulating factors*, CSF), wie z.B. der Granulocysten-CSF (G-CSF), sind ebenso wie verschiedene Interleukine und Hormone, wie beispielsweise die Schilddrüsenhormone und Adrenalin, hämatopoetische Wachstumsfaktoren^[211]. Intensive Forschungsarbeit erweitert das Wissen über dieses Gebiet rapide und es werden immer wieder neue Wachstumsfaktoren entdeckt. Über Sinusoide mit fenestriertem Endothel verlassen die Blutzellen das Knochenmark.

In den folgenden Abschnitten werden für das Verständnis der Arbeit wichtige Blutzelltypen und die Komponenten der Hämostase theoretisch betrachtet.

b.) Erythrozyten und Thrombozyten

Erythrozyten

Die Erythrozyten (roten Blutkörperchen) werden durch Proliferation und Differenzierung aus Progenitorzellen, den Erythroblasten, im Knochenmark gebildet. Die Lebensdauer von

Erythrozyten beträgt ca. 110 Tage, danach werden sie von Makrophagen in der Milz phagozytiert^[211]. Das Eisen und das Protein der Erythrozyten wird recycelt, das Hämoglobin wird verstoffwechselt und metabolisiert zu Bilirubin, das über den Blutstrom in die Leber transportiert wird und dort über die Galle ausgeschieden wird. Gesunde, reife Erythrozyten haben eine charakteristische Form eines bikonkaven Diskus und einen Durchmesser von ungefähr 8 µm. Aufgrund ihrer Form besitzen sie eine große Oberfläche mit 136 µm², die wichtig ist für ihre Funktion als Sauerstofftransporter^[211]. Erythrozyten sind leicht deformierbar, diese Eigenschaft ist wichtig, um auch kleine Blutgefäße zu passieren. Die Erythrozyten sind sehr anfällig für Veränderungen des osmotischen Drucks und platzen bei einer bestimmten kritischen niedrigen Osmolalität (siehe Lyse der Erythrozyten 3.1.8).

Thrombozyten

Die Thrombozyten (Blutplättchen mit einer Größe von 2-3 µm) enthalten wie die Erythrozyten keinen Zellkern aber viele spezialisierte Zellorganellen. Sie werden von Megakaryozyten, die mit Größen von 100 µm zu den größten Zellen des menschlichen Organismus gehören, im Knochenmark gebildet. Thrombozyten sind essentiell für die Abdichtung eines Gefäßwanddefekts und von fundamentaler Bedeutung für die Hämostase^[211]. Die jeweiligen Inhaltsstoffe der Granula sind in Abb. 2.8 dargestellt.

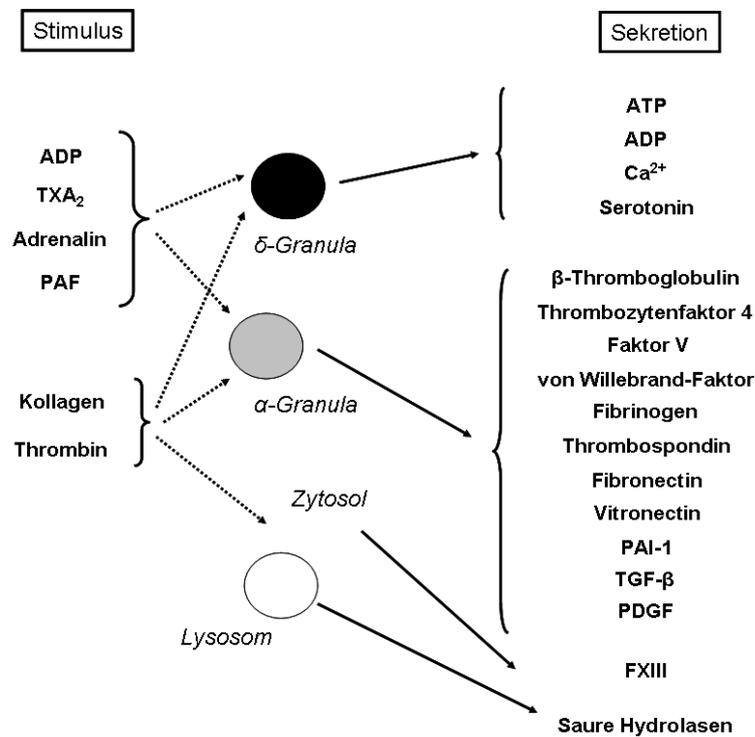


Abb. 2.8: Thrombozytenspeichergranula mit Agenzien und externen Stimuli (nach Labor und Diagnose 17.1-4^[213]). Abkürzungen: ADP = Adenosindiphosphat, TXA₂ = Thromboxan A₂, PAF = Plättchenaktivierender Faktor (engl. *platelet activating factor*), ATP = Adenosintriphosphat, PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, TGF-β = Transforming Growth Faktor, PDGF= Platelet-Derived-Growth-Faktor.

Diese Granula enthalten wichtige Agenzien, die die Thrombozyten nach Aktivierung durch diverse Stimuli über ihr kanalikuläres System, ein spezielles Kanalsystem des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER), das einen schnellen Transport von Komponenten zum Zelläußeren gewährleistet, ausschütten (Abb. 2.8). Thrombozyten werden u.a. aktiviert durch Kollagen, *von Willebrand*-Faktor (vWF), Thromboplastin (engl. *tissue Faktor*, TF) und Thrombin. Die Generation von Signalen aus der Blutbahn oder Gefäßendothel, die auf spezifischen Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten binden, lösen in den Thrombozyten eine intrazelluläre Signalübertragung zu den sekretorischen Granula, zum Zytoskelett und zu den Integrinrezeptoren aus^[213-214]. Im Laufe dieses Prozesses werden negativ geladene Phospholipide auf der Membranoberfläche exponiert, an die Calcium-vermittelt negativ geladene Gerinnungsfaktoren anlagern. Zentrales Ereignis der Thrombozytenaggregation ist die Bindung von Fibrinogen an Glykoprotein (GP) IIb/IIIa, die wiederum weitere Thrombozyten aktivieren^[213-214]. Calcium-Ionen sind essentiell für die Bindung von diesen Gerinnungsfaktoren. Negativ geladene Oberflächen wie Glas können Thrombozyten ebenso aktivieren.

c.) Hämostase

Die Blutgerinnung wird im folgenden Abschnitt genauer betrachtet, da für die Versuche in peripherem Vollblut (siehe 4.2.) mit Lithium-Heparin (Li-Heparin), Kalium-Ethylen-diamintetraessigsäure (K₃EDTA) und Natrium-Citrat (Na₃Citrat) antikoagulierte Blutentnahmeröhrchen verwendet werden. Eine Inhibierung der Blutgerinnung durch Antikoagulanzen ist für extrakorporale Experimente unerlässlich. Zuerst wird die Hämostase beschrieben, darauffolgend werden die einzelnen Antikoagulanzen beschrieben.

Die Aufrechterhaltung des hämostatischen Gleichgewichts, also der Aufrechterhaltung der Fließfähigkeit des Blutes, sowie der Fähigkeit der Gerinnungsbildung bei Gefäßverletzungen, wird prinzipiell durch das Zusammenwirken von vier verschiedenen Systemen gewährleistet^[215].

Vaskuläre Komponente: Blutgefäße mit Endothel und Subendothel

Die Endothelzellen kleiden als einschichtige Lage alle Gefäße aus (insgesamt beim Menschen ca. 10¹¹ Zellen). Diese Endothelschicht steht in Wechselwirkung mit dem zirkulierenden Blutstrom und subendothelialen Komponenten und entfaltet über Freisetzung von Mediatoren anti- und prokoagulatorische Eigenschaften. Die Endothelschicht trägt zur zellulären und plasmatischen Hämostase der Blutgerinnung und Fibrinolyse bei. Darüber hinaus beeinflussen

die Endothelzellen die Fluidität des Blutes über die Regelung der Vasomotorik und der Blutviskosität sowie die Leukozytenmigration und die Gefäßpermeabilität.

Thrombozytäre Komponente

Die thrombozytäre Komponente wurde bereits im Abschnitt a.) Hämatopoese beschrieben.

Plasmatische Komponente: Gerinnungsfaktoren und ihre Inhibitoren

Die Gerinnelbildung erfolgt mit der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin und der Bildung von unlöslichen Fibrin-Polymeren. Fibrinogen wird in der Leber synthetisiert und besteht aus drei unterschiedlichen Polypeptidketten. Durch eine Endothelläsion wird der Gerinnungsprozess aktiviert (Abb. 2.9).

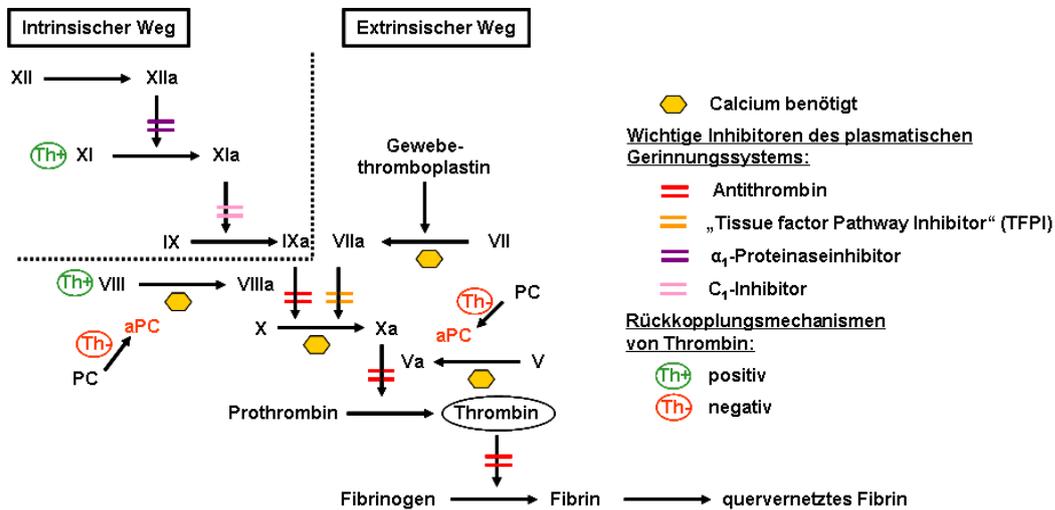


Abb. 2.9: Kaskade der plasmatischen Gerinnungsaktivierung mit benötigtem Calcium als Kofaktor, wichtigen Inhibitoren und positive und negative Rückkopplungsmechanismen durch Thrombin.

Anionische Phospholipide aus subendothelialen Schichten oder aus Thrombozyten, lokalisieren den Gerinnungsprozess und bilden die Matrix für ebenfalls negativ geladene Gerinnungsfaktoren. Freie Calcium-Ionen sind im Plasma im Überschuss vorhanden und sind für den Ablauf der Blutgerinnung unerlässlich (Abb. 2.9), da sie die Brücke zwischen negativ geladenen Gerinnungsfaktoren (insbesondere der Vitamin K-abhängigen Faktoren) und negativ geladenen Phospholipiden bilden und somit die lokale Anreicherung und Wirkung der Gerinnungsfaktoren ermöglichen.

Plasmatische Gerinnungsfaktoren sind Glykoproteine (GP). Die aktivierten Formen der Faktoren II (= Prothrombin), VII, IX, X, XI und XII sind Serinproteasen. Die Faktoren V und VIII sind keine Enzyme, sondern Kofaktoren. Die Faktoren II, VII, IX und X, die zusammen den Prothrombinkomplex bilden, werden Vitamin K-abhängig in den Hepatozyten synthetisiert. Die dabei erfolgende postribosomale Carboxylierung von Glutaminsäure zu

γ -Carboxyglutaminsäureresten, welche negative Ladungen tragen und folglich für die Anbindung an anionische Phospholipide Calcium als Bindeglied erforderlich machen, unterbleibt in der Gegenwart von Coumarin-Derivaten. Der vWF wird in Megakaryozyten und Endothelzellen synthetisiert und zirkuliert im Blutstrom in Komplexen mit Faktor VIII. Faktor XIII ist eine Transaminase und wird zu den prokoagulatorischen Gerinnungsfaktoren gerechnet.

Die klassische Blutgerinnungskaskade ist aus didaktischen Gründen in ein intrinsisches System, bei dem die Gerinnungsfaktoren XII und XI durch einen Kontakt mit subendothelialen Strukturen aktiviert werden (z.B. durch bestimmte Oberflächenstrukturen als *in vitro*-Phänomen) und ein extrinsisches System, bei dem die Aktivierung der Blutgerinnung durch den Faktor VII mit dem „Tissue factor“ (TF) als Kofaktor beginnt (ausgelöst durch Gewebeschädigungen), eingeteilt (Abb. 2.9). TF bildet zusammen mit Phospholipiden das Gewebethromboplastin. Die Expression von Gewebethromboplastin auf Endothelzellen oder Monozyten beschleunigt die Gerinnung.

Physiologische Inhibitoren verhindern eine überschießende Gerinnungsaktivierung. Die verschiedenen Inhibitoren zirkulieren im Plasma bzw. sind in den Thrombozyten enthalten. Durch Komplexbildung der Inhibitoren mit den Proteasen werden diese inaktiviert. Alle Inhibitoren des plasmatischen Gerinnungssystems sind Serinprotease-Inhibitoren (Serapine). Wichtigster Inhibitor ist das Antithrombin (AT = AT III = Heparin-Kofaktor-I = HC-I), das alle Serinproteasen, bevorzugt Faktor IXa, Xa und Thrombin hemmt^[213]. In Anwesenheit von Heparin wird die Inhibierungsgeschwindigkeit erheblich gesteigert^[216]. Heparin beschleunigt die Hemmung der Serinproteasen ebenfalls durch Bindung an den Heparin-Kofaktor-II (HC-II), dieser hemmt aber nicht den Kofaktor Xa. Wenn Thrombin an Fibrin gebunden ist, kann es weder von AT noch von einem AT/Heparin-Komplex inhibiert werden. Dermatansulfat steigert die Hemmwirkung von HC-II, nicht aber von AT. Des Weiteren wird der extrinsische Weg der plasmatischen Gerinnung von dem Tissue factor Pathway Inhibitor (TFPI), synthetisiert von den Endothelzellen, herunterreguliert. Heparin steigert die Freisetzung von TFPI aus den Endothelzellen und verstärkt somit dessen Wirkung um das 5-fache. Thrombozyten enthalten ebenfalls TFPI und setzen dieses unter Thrombin-Stimulierung frei^[213]. Ein wichtiger negativer Rückkopplungsmechanismus ist das Protein C-System. Thrombin bindet an den Endothelzellmembranrezeptor Thrombomodulin und wird so zum aktivierten Protein C (aPC), das zusammen mit Protein S die aktivierten Kofaktoren V und VIII spaltet. Thrombin aktiviert aber auch in einem positiven Rückkopplungsmechanismus die Faktoren V, VIII und XI.

Fibrinolytische System: Fibrinolyse und ihre Inhibitoren

Die proteolytische Spaltung von Fibrin wird als Fibrinolyse bezeichnet. Die hydrolytische Spaltung von Fibrin in Fibrinospaltprodukte erfolgt unter Einwirkung des Enzyms Plasmin, das im Blutstrom als inaktive Vorstufe Plasminogen zirkuliert. Plasmin spaltet auch Fibrinogen, Faktor V und Faktor XII^[213]. Bei der Aktivierung des fibrinolytischen Systems lassen sich ebenso ein intrinsischer und ein extrinsischer Weg unterscheiden. Am intrinsischen Weg sind die Faktoren XIIa, Präkallikrein und ein hochmolekulares Kinninogen (HK) beteiligt. Beim extrinsischen Aktivierungsweg wird der Gewebsplasminogenaktivator (engl. *tissue Plasminogen Activator*, t-PA) und der Urokinase-Plasminogen-Aktivator (u-PA), der in der inaktiven Form Pro-Urokinase im Blut vorliegt, aktiviert. Der u-PA-Rezeptor ist auf Endothelzellen und Monozyten nachgewiesen worden. Durch Bindung von Urokinase auf diesen Rezeptoren wird die Aktivität der Urokinase deutlich gesteigert^[213]. Die im Plasma zirkulierenden Inhibitoren α_2 -Antiplastin und die Plasminogenaktivator-Inhibitoren Typ 1 und 2 induzieren eine Hemmung der Fibrinolyse. Außerdem entfernt das MPS die Fibrinolyseaktivatoren aus dem Blutstrom.

2.1.4.2 Beschreibung der eingesetzten Antikoagulanzen

In diesem Abschnitt werden die Wirkmechanismen von Antikoagulanzen, die für Experimente in Abschnitt 4.2 eingesetzt werden, näher betrachtet.

Li-Heparin (unfraktioniert)

Heparin ist ein körpereigenes polyanionisches Glykosaminoglykan mit einer Molmasse von 6000 – 30000 g·mol⁻¹, das in basophilen Granulozyten und Mastzellen vorkommt. Die physiologische Wirkung ist noch nicht vollkommen geklärt; die Auswirkungen von Heparin auf die plasmatische Blutgerinnung ist Abschnitt 2.1.4.1 c.) beschrieben^[216]. Parenteral zugeführtes unfraktioniertes Heparin (mittlere Molmasse ca. 15000 g·mol⁻¹) blockiert an verschiedenen Stellen der Gerinnungskaskade (Abb. 2.9) die Blutgerinnung durch die Aktivierung von Antithrombin, das Thrombin und die Serin-Proteasen IXa und Xa hemmt. Antithrombin wird durch die Bindung einer Pentasaccharidstruktur des Heparins aktiviert (Abb. 2.10). Thrombin wird durch die Bildung eines ternären Komplexes von unfraktioniertem Heparin, Antithrombin und Thrombin gehemmt. Nur ca. 30% des unfraktionierten Heparins tragen die für diese Wirkung verantwortliche Pentasaccharidstruktur.

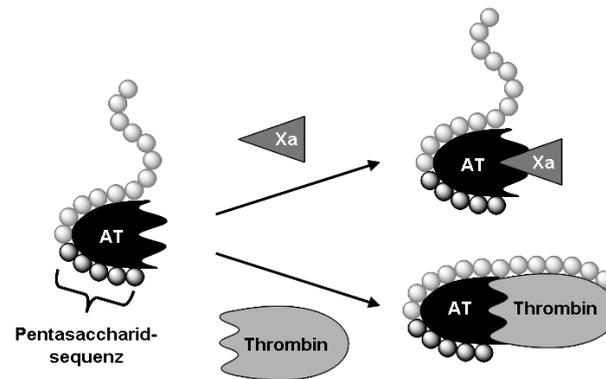


Abb. 2.10: Wirkungsweise von unfractioniertem Heparin (nach Mutschler^[216]).
AT = Antithrombin, Xa = Faktor Xa.

Nachfolgend werden die beiden Calcium-Komplexbildner EDTA und Citrat betrachtet. Calcium-Ionen sind im Plasma im Überschuss vorhanden (Serumkonzentration ionisiertes Calcium $1,15\text{--}1,35\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) und für den Ablauf der Gerinnung unerlässlich, da sie als Kofaktoren zwischen negativ geladenen Gerinnungsfaktoren (insbesondere den Vitamin-K-abhängigen Faktoren II, VII, IX und X) und negativ geladenen Phospholipiden dienen und somit zur Anreicherung der Faktoren am Ort der Gewebeläsion beitragen^[215].

K₃EDTA

EDTA bildet als 6-zähliger Ligand Chelatkomplexe (1:1) mit 2- und 3-wertigen Kationen. Die blutgerinnungshemmende Wirkung ist auf die Komplexierung von Ca^{2+} zurückzuführen. Calcium ist an vielen Stellen der zellulären und plasmatischen Blutgerinnung als Kofaktor beteiligt. In Abb. 2.9 ist Ca^{2+} separat aufgeführt.

Na₃Citrat

Citrat komplexiert als Chelatbildner 2-wertige Kationen und bildet mit Ca^{2+} -Chelatkomplexe im Verhältnis 2:1. Die Auswirkungen der Calcium-Komplexierung auf die Nanopartikelaufnahme in peripherem Vollblut werden in Abschnitt 4.2.2 ausführlich betrachtet.

2.1.4.3 Funktion des Immunsystems

Im folgenden Kapitel werden die Komponenten des Immunsystems beschrieben. Zuerst wird das Immunsystem allgemein, in 2.1.4.4 werden die zur Analyse ausgewählten Leukozyten (weiße Blutkörperchen) vertiefend betrachtet. Das Immunsystem ermöglicht es dem menschlichen Organismus sich von Fremdstoffen frei zu halten (*lat.* immunitas = frei sein). Es besteht aus zwei in der Funktionsweise unterschiedlichen Systemen, der

angeborenen Immunität und der adaptiven Immunität mit Antigen-spezifischen Erkennungsmechanismen^[213, 217].

Gliederung des Immunsystems

Die angeborene Immunität dient zur primären Abwehr von Fremdstoffen mit evolutionär primitiven Abwehrmechanismen wie dem Komplementsystem, phagozytierenden Zellen wie Granulozyten, Blutmonozyten und sessilen Makrophagen in den Geweben. Die Antigen-erkennung ist dabei unspezifisch. Zum adaptiven Immunsystem gehören T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen) und von diesen gebildete spezifische Antikörper^[213].

Sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem ist abhängig von der Aktivität der Leukozyten (= weiße Blutkörperchen). Sie reifen im Knochenmark und gehen aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen hervor (siehe Abb. 2.7), bevor sie in der Blutbahn oder im Lymphsystem zirkulieren und in den verschiedenen Geweben ihre Funktionen übernehmen. Bei der Blutzellendifferenzierung werden die lymphoide und die myeloide Abstammungslinie, in die auch die Leukozyten eingeteilt werden können^[218], unterschieden.

Das Immunsystem schützt prinzipiell vor vier verschiedenen Pathogengruppen: Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze. Außerdem entfernt es Zelldebris wie alte Erythrozyten, Fibrin-Spaltprodukte und alle weitere als körperfremd angesehenen Substanzen, wie auch Nanokapseln und Nanopartikel^[219-220].

Das Immunsystem besteht aus zellulären und humoralen Komponenten (Abb. 2.11).

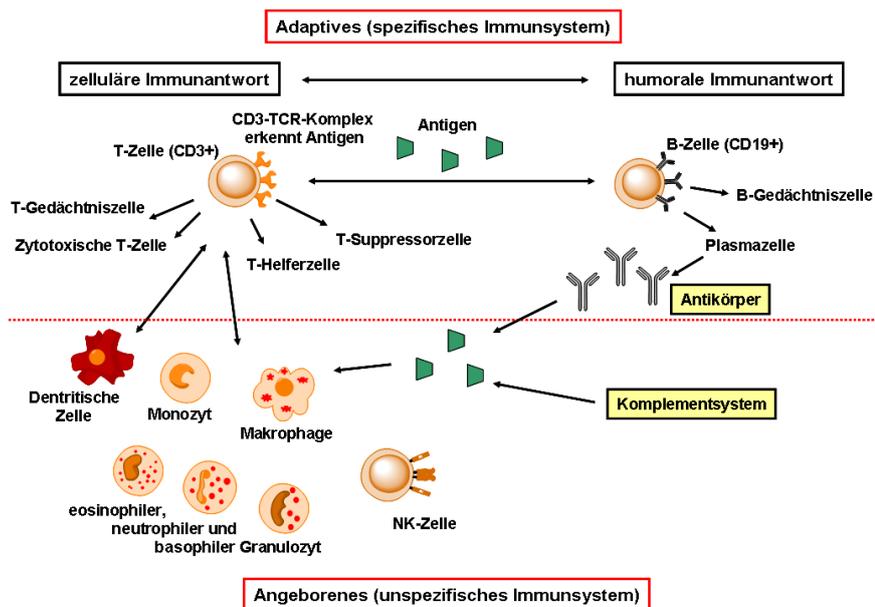


Abb. 2.11: Schematische Darstellung des Immunsystems.

In Abb. 2.11 ist das Zusammenwirken von Leukozyten als zelluläre Komponenten und Plasmaproteinen wie spezifischen Antikörpern (gebildet von Plasmazellen) und Komplementfaktoren als humorale Komponenten schematisch dargestellt.

Das Komplementsystem^[221] ist der humorale Teil des angeborenen Immunsystems und besteht aus einer Vielzahl an Plasmaproteinen, die durch den Kontakt mit entzündetem Gewebe, bestimmten Oberflächenstrukturen von Pathogenen oder körpereigenen toten und apoptotischen Zellen aktiviert werden. Weitere Komplementfaktoren werden über Signalkaskaden aktiviert. Dies führt dazu, dass

- Pathogene mit Komplementfaktoren opsoniert werden und von phagozytierenden Zellen (siehe 2.1.2.1 b.)), die Komplementrezeptoren exprimieren, erkannt und phagozytiert werden können.
- weitere Phagozyten von bestimmten Komplementfaktoren bzw. deren Spaltprodukten chemotaktisch angelockt werden.
- bestimmte Komplementfaktoren in Membranen bestimmter Bakterien Poren ausbilden. Dies führt dann zur Lyse der Bakterien.

Das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS) umfasst alle sich aus den Promonozyten ableitende phagozytoseaktive Zellen^[218]. Hierzu gehören neben den Blut-Monozyten Gewebemakrophagen wie Histiozyten, Sinusendothelzellen der Milz, Lymphknotenmakrophagen, *Kupffer*-Sternzellen der Leber, Alveolarmakrophagen der Lunge, peritonealen Makrophagen und Osteoklasten. Die Bezeichnung MPS begründet sich auf einer morphologischen und funktionellen Einheit und ist im Gegensatz zu dem veralteten Begriff des retikuloendothelialen Systems (RES) genau abgegrenzt. Zu diesem gehören noch Endothelzellen, Retikulumzellen und Fibrozyten. Weder zum MPS noch zum RES werden dendritischen Zellen (DC) und Granulozyten gerechnet.

Sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster^[218, 221] (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) werden von spezialisierten Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritischen Zellen (DC) durch Muster-Erkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) erkannt. Diese Rezeptoren richten sich gegen körperfremde Strukturen wie beispielsweise Mannose-reiche Oligosaccharide und Peptidoglykane in der bakteriellen Zellwand und werden von Makrophagen erkannt. Der Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS), der in der bakteriellen Zellwand von gram-negativen Bakterien zu finden ist, bindet an Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4). Das LPS-bindende Protein (LBP) spielt eine wichtige Rolle als Opsonin, das den

Abbau LPS-haltiger bakterieller Moleküle beschleunigt. Der Komplex aus LBP und LPS interagiert mit dem immunphänotypischen Oberflächenmerkmal CD14 auf Monozyten. Bei unphysiologischen hohen LPS-Konzentrationen kann LPS auch über Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen aufgenommen werden. Nanopartikel oder spezifisch funktionalisierte Nanopartikel, die mit PRR auf den Zellen wechselwirken, können somit potentiell ihre Phagozytose einleiten.

Antigenpräsentierende Zellen^[221] wie Makrophagen, native B-Zellen und DC exprimieren Antigene von aufgenommenen Pathogenen auf ihrer Zelloberfläche und bieten sie zusammen mit MHC-Molekülen (siehe unten) den nativen T-Zellen an. Diese Präsentation ist die Voraussetzung für eine effektive Immunantwort.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)^[221] sind weitere wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen entartete Zellen (z.B. Tumorzellen) mit veränderten Oberflächenmolekülen oder Zellen, die mit Pathogenen infiziert sind (z.B. mit Viren) und vernichten diese. Sie gehen aus der lymphoiden Progenitorzelle hervor, besitzen aber keine Antigen-spezifischen Rezeptoren wie B- und T-Lymphozyten.

2.1.5 Zur Analyse ausgewählte Leukozyten

2.1.5.1 Beschreibung der zur Analyse ausgewählten Leukozyten

Im Folgenden werden die in den *ex vivo*-Experimenten in peripherem Vollblut analysierten Leukozyten (=weiße Blutkörperchen) theoretisch betrachtet und die Gründe für deren Auswahl dargelegt (Abb. 2.12).

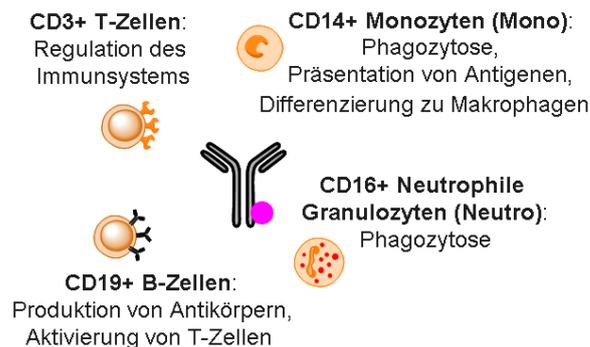


Abb. 2.12: Leukozyten mit charakteristischen immunphänotypischen Eigenschaften für die Antikörper-Markierung.

Die betrachteten Leukozyten werden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern, die sich gegen die ausgewählten immunphänotypischen Oberflächenmerkmale CD3, 14, 16 und 19 (Abb. 2.12) richten, detektiert und nach Größe und Granularität im Auswertefenster bei den

durchflusszytometrischen Untersuchungen selektiert. So können CD14-positive Monozyten und CD16-positive neutrophile Granulozyten von weiteren Leukozyten, die dieselben Oberflächenmerkmale exprimieren (Tabelle 2.1), unterschieden werden. Die Beschreibung des durchflusszytometrischen Analyseverfahrens erfolgt in Abschnitt 4.2.1.

Tabelle 2.1: Immunphänotypische Oberflächenmerkmale der analysierten Leukozyten^[213, 218, 221-222].

CD	M_w (kDa)	Zellexpression	Funktion	Anderer Name
CD3	TCR α 40-60, TCR β 40-60, TCR γ 40-60, TCR δ 40-60, CD3 γ 25, CD3 δ 20, CD3 ϵ 20, CD3 ζ 16, CD3 η 22,	reifende Thymozyten, T-Lymphozyten	Transmembran Glykoproteine (γ , δ , ϵ , ζ , η) assoziiert mit dem T-Zellrezeptor (TCR), Signaltransduktion nach MHC-TCR-Kontakt	T3, CD3-Komplex
CD14	55	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen	Glykoproteinrezeptor für Komplexe aus LPS und LPB	LPS-/LPB-Rezeptor, gp55, Endotoxinrezeptor
CD16	50-80	Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen; bei neutrophilen Granulozyten durch GPI in Membran verankert (Isoform CD16b = Fc γ IIIb)	Fc-IgG-Rezeptor niedriger Affinität, vermittelt Phagozytose und Antikörper-abhängige Zytotoxizität	Fc γ RIIIa/b
CD19	95	alle B-Lymphozyten, inklusive Progenitor	formiert mit CD21 (CR2), CD81 (TAPA-1) und Leu-13, einen Komplex, welcher die Signalübertragung durch den B-Zell-Rezeptor-Komplex (BCR) moduliert, bindet Tyrosin-Kinase und PI 3-Kinase	B4

TCR = T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*)

Monozyten (CD14+):

Bei der myeloischen Abstammungslinie gehen Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und dendritische Zellen aus der myeloischen Progenitorzelle (CMP) hervor (Abb. 2.7). Makrophagen sind ausgereifte, auf ihre Aufgaben in den unterschiedlichen Geweben spezialisierte Monozyten. Monozyten mit einer Größe von ca. 20 μm ^[54] und einem Anteil von ca. 6% der Leukozyten zirkulieren im Blutstrom für 1-3 Tage und wandern wie neutrophile

Granulozyten (siehe unten), die von Monozyten angelockt werden, bei Entzündungen in das betroffene Gewebe ein und differenzieren dann zu gewebespezifischen Makrophagen (ca. 40 µm). Diese haben eine Lebensdauer von mehreren Wochen. Monozyten und Makrophagen sind beide phagozytoseaktiv^[211] (siehe 4.2.1.3). Sie formieren als Zellen des angeborenen Immunsystems die primäre Abwehr. Sie koordinieren, durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, TNF-α und IL-6) lokale Entzündungsreaktionen im Gewebe und durch Präsentation von Antigenstrukturen auf ihren Zelloberflächen, die aus dem Verdau von Pathogenen stammen, die weitere Immunantwort des Körpers. Diese Zytokine wirken im Hypothalamus und induzieren Fieber, mobilisieren neutrophile Granulozyten, verbessern die Gefäßpermeabilität, so dass Zellen besser ins Gewebe auswandern können und induzieren in der Leber die Synthese von „Akut-Phase-Proteinen“ wie C-reaktives Protein und Mannanbindendes Lektin. Diese opsonieren Pathogene und erleichtern ihre Elimination. Das Auswandern der Zellen wird synergistisch durch die Sezernierung von IL-8 unterstützt^[211].

Neutrophile Granulozyten (CD16+):

Die neutrophilen Granulozyten^[221-222] phagozytieren Mikroorganismen und zerstören sie in intrazellulären Vesikeln. Neutrophile Granulozyten mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 6-7 h^[223] verlassen die Blutgefäße, um in entzündetes Gewebe zu gelangen. Dort tragen sie zur Regeneration des entzündeten Gewebes bei^[224]. Neutrophile Granulozyten generieren chemotaktische Signale, die Monozyten und DC anlocken und Makrophagen aktivieren^[225]. Des Weiteren sekretieren sie den „TNF-related ligand B-lymphocyte stimulator“ (BLyS)^[226], der die Proliferation und Reifung von B-Zellen stimuliert und γ-Interferon, das T-Zellen und Makrophagen aktiviert^[227].

T-Lymphozyten (CD3+) und B-Lymphozyten (CD19+):

T- und B-Lymphozyten gehen aus der lymphoiden Progenitorzelle (engl. *common lymphoid progenitor*, CLP) hervor (Abb. 2.7) und haben je nach Differenzierungsart eine Lebensdauer von einigen Stunden bis zu mehreren Jahren (Gedächtniszellen).

CD19^[218] ist auf den Membranen aller B-Lymphozyten (auch auf Plasma- und B-Gedächtniszellen) exprimiert und gleicht strukturell einem Ionenkanal. Die CD3^[213, 218]-Molekülgruppe ist eng mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiert und kommt ubiquitär auf allen T-Lymphozyten vor. Der CD3-TCR-Komplex leitet bei Kontakt mit dem antigenbeladenen MHC-Molekül (engl. *major histocompatibility complex*, dt. *Haupthistokompatibilitätskomplex*) eine Signaltransduktion ein und führt zu einer Aktivierung der T-

Zelle. Es gibt zwei Klassen von Haupthistokompatibilitätsantigenen (MHC I und II), die sich strukturell (unterschiedlicher Aufbau der beiden Polypeptidketten) und in der Expression in den unterschiedlichen Geweben unterscheiden. Die MHC-Moleküle präsentieren Antigene, weshalb sie auf Immunzellen besonders stark exprimiert sind. Die MHC I-Moleküle präsentieren vorwiegend Peptide von Pathogenen CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, die darauf spezialisiert sind, von Viren befallene Zellen zu töten. CD4-positive T-Zellen erkennen MHC II-Moleküle, die wiederum weitere Effektorzellen des Immunsystems (z.B. B-Zellen) aktivieren. T-Zellen^[213] erkennen Antigene nach deren Prozessierung durch antigen-präsentierende Zellen und regulieren die Immunantwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems. T-Helferzellen aktivieren Abwehrmechanismen durch Stimulation der phagozytierenden Zellen und stimulieren die Proliferation der B-Zellen. Zytotoxische T-Zellen zerstören körpereigene Zellen, die Proteine sich intrazellulär vermehrender Pathogene auf der Zelloberfläche exprimieren. T-Zellen bilden genauso wie B-Zellen Gedächtniszellen. B-Zellen differenzieren nach Stimulation durch T-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen, die spezifische Antikörper produzieren und aktivieren über die Antikörper phagozytierende Zellen und das Komplementsystem.

2.1.5.2 Spezifischer Wirkstofftransport in die ausgewählten Leukozyten

Die für die Analysen ausgewählten Leukozyten eignen sich einerseits als Zielzellen für einen Wirkstofftransport; andererseits sollen diese Leukozyten möglichst wenige Nanopartikel, die als Wirkstofftransportsysteme für bestimmte Gewebe dienen, aus dem Blutstrom entfernen. In dieser Hinsicht ist ein Einsatz der Nanopartikel, die keine bzw. eine sehr schwache Aufnahmezeit zeigen, zu bevorzugen.

Im Folgenden sind mögliche Anwendungen für einen gezielten Wirkstofftransport in die analysierten Leukozyten dargelegt.

Monozyten (CD14+):

In Zellen des MPS persistieren bestimmte Pathogene wie Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*) und Parasiten (Erreger der Leishmaniose), die ihrem Verdau in den Phagosomen entkommen können und sich so den weiteren Angriffen des Immunsystems entziehen.

Generell erweist es sich als schwierig Bakterien vollständig zu eliminieren, wenn diese in Zellen des MPS lokalisiert sind. Des Weiteren lassen sich *in vitro*-Untersuchungen schwer auf *in vivo*-Bedingungen im Menschen übertragen^[83]. Antibakterielle Wirkstoffe werden in nano-

technologischen Formulierungen eingebettet, um die Therapien von Morbus tuberculosis, *M. avium* und *M. intracellulare* zu verbessern. Diesen Krankheiten kommt gesteigertes Interesse zu, da sie häufig in Zusammenhang mit AIDS (engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) stehen. Verschiedene Wirkstoffe wurden in Liposomen eingebettet und erfolgreich *in vitro* an Makrophagen und in tierischen Modellen getestet^[228].

Auch Viren nutzen Immunzellen um sich zu replizieren oder zu persistieren, z.B. das Dengue-Virus, u.a. in Monozyten und das HI-Virus u.a. in Monozyten und Makrophagen. *Bender et al.* entwickelten mit Poly(hexylcyanoacrylat)-Nanopartikeln erfolgreich ein Wirkstofftransportsystem für den Protease-Inhibitor Saquinavir in Monozyten/Makrophagen *in vitro*^[229]. Weitere antivirale Wirkstoffe, wie der reverse Transkriptase-Inhibitor Azidothymidin, wurden erfolgreich in nanopartikuläre Systeme eingebettet. In *in vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass sich der Wirkstoff in Makrophagen aufkonzentriert^[230]. Neuere Studien zeigten, dass Poly(isobutylcyanoacrylat)-Nanokapseln die aktive Triphosphatform von Azidothymidin (antiretroviraler Wirkstoff), die selbst zu hydrophil ist, um überhaupt die Zellmembranen zu passieren, in Makrophagen anreichern^[231]. *Nowacek et al.* untersuchten den Einfluss von Größe, Tensidbedeckung, Oberflächenladung und Form der mit diversen antiretroviralen Substanzen beladenen Nanopartikel im Hinblick auf das zelluläre Aufnahmevermögen und die Wirkung in isolierten humanen Monozyten; die Form der Nanopartikel stellte sich dabei als wesentlicher Faktor für eine gute zelluläre Aufnahme dar^[232].

Neutrophile Granulozyten (CD16+):

Neutrophile Granulozyten eröffnen Möglichkeiten für eine gezielte pharmakologische Intervention^[92], sowohl um Entzündungsprozesse zu induzieren, als auch zu unterdrücken^[224]. Eine Rekrutierung von Neutrophilen, wie auch von Monozyten und Makrophagen, konnte in Tumorgewebe, das sich im Rahmen einer Entzündungsreaktion bildet oder metastasiert, nachgewiesen werden^[233]. Eine Unterdrückung der Entzündungsreaktion soll bei Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, Osteoarthritis oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung erreicht werden. Antikörper oder Chemokin-Antagonisten, welche die Extravasation der neutrophilen Granulozyten verhindern sollen, zeigten bisher hohe Nebenwirkungen durch eine starke Schwächung des Immunsystems^[224, 234-235]. In weiteren Versuchen wurden spezifische Enzyme der neutrophilen Granulozyten blockiert^[236].

T-Lymphozyten (CD3+):

In CD3+ T-Lymphozyten persistieren und replizieren sich HI-Viren und stellen deshalb ein potentielles Ziel für einen zielgerichteten Wirkstofftransport mit antiretroviralen Wirkstoffen dar.

B-Lymphozyten (CD19+):

Da das CD19 selektiv auf den B-Lymphozyten ausgeprägt ist, können beispielsweise B-Zell-non-Hodgkin-Lymphome, zu dem auch das folliculäre Lymphom zählt, für einen gezielten Wirkstofftransport verwendet werden.

Sapra et al. ist es gelungen, B-Lymphom Zellen selektiv mit CD19-markierten Liposomen zu erreichen^[237]. Des Weiteren können B-Zellen als Antikörper-produzierende Zellen von Interesse für immunstimulatorische Effekte sein, beispielsweise zur Verbesserung der Ansprechrate bei Impfungen.

2.1.6 Proteinadsorption auf Nanopartikeln

Wenn Nanopartikel in Kontakt mit biologischen Medien treten (Blut, Lymphe, Speichel, Verdauungssäfte), kommen sie unmittelbar in Kontakt mit den darin enthaltenen Proteinen. Adsorbierte Proteine bilden eine neue Nanopartikeloberfläche und beeinflussen die Interaktionen der Nanopartikel mit den Geweben und Zellmembranen sowie die toxikologischen Eigenschaften der Nanopartikel^[79]. Das Blutplasma enthält über 3700 bekannte Proteine^[118]. Die Zusammensetzung der Proteinkorona der Nanopartikel ist in solch einem vielschichtigen Milieu sehr variabel. Proteine mit hohen Konzentrationen und mit großen Assoziationsraten, die initial die Partikeloberfläche besetzen, werden von Proteinen ersetzt, die in geringeren Konzentrationen vorkommen, aber eine deutlich höhere Bindungsaffinität zur Partikeloberfläche besitzen. Dieser gesamte Prozess der kompetitiven Adsorption von Proteinen auf Oberflächen ist bekannt als *Vroman-Effekt*^[67, 238]. Die diversen Konzentrationen der (Plasma-)Proteine, sowie deren Gleichgewichtskonstanten, Assoziations- bzw. Dissoziationsraten, Bindungsaffinitäten und die Partikelinkubationszeiten in biologischem Medium beeinflussen die Zusammensetzung der Partikelkorona^[79, 239-240]. Mögliche Änderungen der Konformation bzw. der Quartär-, Tertiär- bzw. Sekundärstruktur der Proteine nach Adsorption auf der gekrümmten Nanopartikeloberfläche können die physiologischen Eigenschaften der Proteine verändern^[241] und die biologischen Wirkungen bzw. die Toxizität der Nanopartikel be-

einflussen^[207]. Die Art und die Eigenschaften des Polymers sind bedeutend für die Wechselwirkungen der Partikel mit den Proteinen; Größe und Form haben hingegen einen geringeren Einfluss^[118]. Göppert et al. konnten bei Adsorptionsstudien von Plasmaproteinen auf festen Lipid-Nanopartikeln (engl. *solid lipid nanoparticles*) zeigen, dass initial vorwiegend Albumin adsorbiert wird, welches dann mit fortschreitender Inkubationszeit von Fibrinogen ersetzt wird. Bevorzugt auf hydrophoben Oberflächen wird dann Fibrinogen gegen Apolipoproteine ausgetauscht, die dann eine dauerhafte Korona ausbilden^[67]. Röcker et al. untersuchen die Wechselwirkungen von humanem Serumalbumin (HSA) und der Nanopartikeloberfläche auf molekularer Ebene. Hierbei wird HSA strukturell als Tetraeder betrachtet^[242]. Gessner et al. analysierten die Adsorption von diversen Plasmaproteinen auf Nanopartikeln mit unterschiedlicher Hydrophobizität^[78] und von Polystyrol-Partikeln mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen^[243]. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinadsorption mit steigender Hydrophobizität der Partikel zunimmt^[78]. Unterschiedliche saure und basische Gruppen von Nanopartikeln beeinflussen die Art der adsorbierten Proteine auf der Oberfläche^[243]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hydrophobizität der Partikeloberfläche sowohl die Menge als auch die Identität der adsorbierten Proteine beeinflusst.^[53, 79, 118] Die Größe, sowie die Oberflächenladung und Morphologie der Partikel beeinflussen ebenfalls die Proteinadsorption; diese Einflüsse werden aufgrund der unterschiedlichen Partikel, mit denen die verschiedenen Studien durchgeführt wurden, unterschiedlich bewertet^[53, 79, 118]. Die adsorbierten Proteine bilden eine dynamische Korona aus und geben dem Partikel eine neue biologische Identität^[8, 77, 239]. In den Isothermen Titrationskalorimetrie-Experimenten (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC) von Frau Dr. Grit Baier wurde BSA als Modelprotein für Proteinadsorptionsprozesse auf diversen funktionalisierten Nanopartikeln ausgewählt. Diese Nanopartikel wurden nach ihrer vollständigen Bedeckung mit BSA einer Zellkultur von HeLa-Zellen zugegeben und der Einfluss der mit BSA-bedeckten und -unbedeckten Nanopartikel auf die Zellaufnahme verglichen (siehe 4.3). Eine Variation der Oberflächenladung kann zu Veränderungen der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nanopartikeln führen und somit letztendlich zu einer unterschiedlichen Adsorption der diversen Proteinen^[244].

Walczyk et al. postulierten, dass Nanopartikel von einer „harten“ Proteinkorona, mit Proteinen hoher Affinität und geringer Austauschrate, umgeben sind und einer äußeren Korona mit Proteinen einer geringeren Bindungsaffinität und einer höheren Austauschrate.^[77, 240] Diese „harte“ bzw. dauerhafte Proteinkorona bleibt sowohl bei einem Wechsel des Nanopartikel umgebenden Solvens zu niedrigeren Protein-Konzentrationen^[245] (Nachweis von Maffre et al.

für HSA-Adsorption auf FePt-Nanopartikeln), als auch nach intrazellulärer Aufnahme erhalten, wie es *Salvati et al.* für aminofunktionalisierte Nanopartikel mit Fluoreszenzmarkierten Plasmaproteinen belegen konnten^[246]. Proteine reduzieren die Interaktionen mit den Plasmamembranen ebenso wie in der Regel die Zellaufnahmerate in HeLa-Zellen^[247-248]. Die adsorbierten Proteine haben direkten Einfluss auf die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln (vgl. 2.1.2.1 b.)).

2.2 Theorie der Messmethoden

2.2.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es mit Lasern bestimmte Eigenschaften von einzelnen Partikeln wie Größe und Granularität zu bestimmen sowie deren Fluoreszenzeigenschaften zu detektieren. Voraussetzung dafür ist, dass sich in einer Probe die zu analysierenden Partikel im dreidimensionalen Raum des Probenstroms während der Passage durch einen oder mehrere Laserstrahlen einzeln anordnen. Diese vereinzelte Anordnung der Partikel wird durch eine hydrodynamische Fokussierung hergestellt. Dabei wird ein Zentralstrom, durch den die Probe eingebracht wird, von einem schneller fließenden Hüllstrom umgeben. Der Hüllstrom verursacht einen Sog-Effekt in der sich verengenden Messzelle. Dies verändert die Geschwindigkeit des Zentralstroms, dessen Fließfront parabolisch wird, mit größter Geschwindigkeit im Zentrum und einer Geschwindigkeit $v = 0$ an der Grenzfläche zum Hüllstrom. Bei optimalen Bedingungen (laminarer Fluss) mischt sich der Zentralstrom nicht mit dem Hüllstrom. Die Eigenschaften des Zentralstroms können mit der *Reynolds-Zahl* abgeschätzt werden:

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\eta} \quad (\text{Gl. 1})$$

ρ = Dichte ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), v = durchschnittliche Strömungsgeschwindigkeit ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), d = Durchmesser der Messzelle (m), η = dynamische Viskosität ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

Wenn $Re < 2300$ ist, liegt eine laminare Strömung vor. Ist $Re > 2300$, liegt eine turbulente Strömung vor, welche die Diffusion beschleunigt und so zur Durchmischung der beiden Ströme führt^[249].

Lichtstreuung oder Fluoreszenzemission (bedingt durch Autofluoreszenz oder Fluoreszenzfarbstoff) geben Aufschluss über die Eigenschaften des Partikels. In Abb. 2.13 ist der schematische Aufbau des Durchflusszytometers dargestellt, welches in dieser Arbeit verwendet wurde.

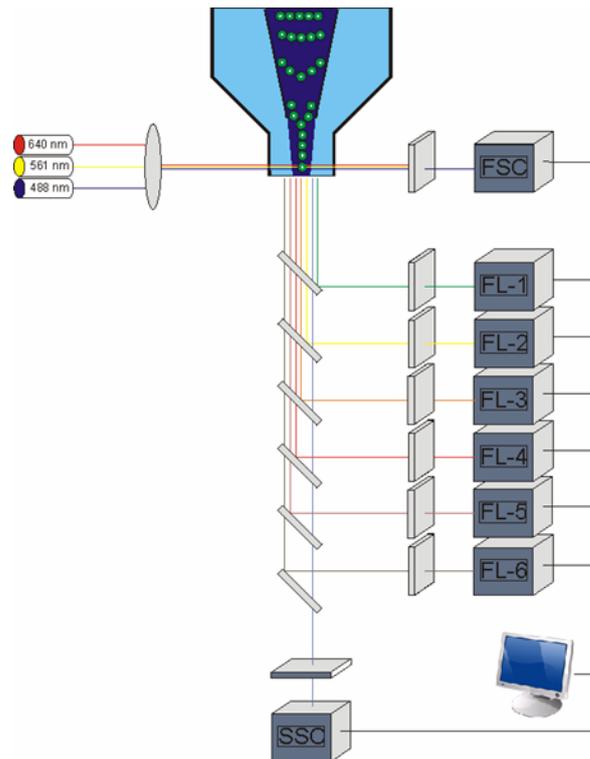


Abb. 2.13: Schematische Darstellung (abgewandelte Darstellung nach M. Rhaman^[249]) des verwendeten Durchflusszytometers mit den Anregungswellenlängen der verwendeten Laser (CyFlow ML, Partec).

Licht, das in Vorwärtsrichtung gestreut wird (typischerweise bis zu einem Winkel von 20° zur Achse des Laserstrahls), wird im „Forward Scatter Channel“ (FSC) detektiert. Die Intensität des FSC entspricht ungefähr der Partikelgröße und kann daher auch dazu benutzt werden, um zwischen Zelldebris und lebenden Zellen zu unterscheiden. Streulicht, ungefähr in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl gemessen, wird im „Sideward Scatter Channel“ (SSC) detektiert und gibt Informationen über die Granularität der Partikel. Zusammen geben FSC und SSC Aufschluss über besondere Eigenschaften der Partikel und erlauben es beispielsweise verschiedene Zellarten (z.B. Leukozytengruppen) in einer heterogenen Probe zu differenzieren.

Fluoreszenzmessungen erlauben quantitative und qualitative Analysen z.B. über die Bindung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern an die Antigene auf der Zelloberfläche bestimmter Zellen oder die zelluläre Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Partikeln. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird in speziellen Fluoreszenzkanälen (FL) detektiert (Abb. 2.13). Normalerweise werden sensitive „Photomultiplier tubes“ (PMT) für Streulicht und Fluoreszenzdetektion verwendet. Die Spezifität der Detektion wird von optischen Filtern kontrolliert, die bestimmte Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlichtes blockieren, während sie andere durchlassen. Es gibt drei Haupttypen: „Long Pass“-Filter, die nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge zum Detektor passieren lassen, „Short-Pass“-Filter,

die nur Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge detektieren und „Band-Pass“-Filter, die nur Licht innerhalb eines kleinen Wellenlängenbereichs detektieren. Dichroitische Filter (platziert im 45°-Winkel) erlauben das Passieren von Licht spezifischer Wellenlängen und Ablenken von Licht (im 90°-Winkel), um multiple Signale simultan zu detektieren. Eine präzise Positionierung der optischen Filter ist damit unerlässlich für eine gute Detektion. Mehrere Fluoreszenzsignale können hierbei zeitgleich detektiert werden. Wenn Photonen auf den Photodetektor treffen, fließt ein Strom mit der Stärke einiger Mikroampere. Die Amplitude der auftretenden Spannung ist proportional zur Anzahl der Photonen die detektiert werden. Diese Spannung wird dann von einer Serie von linearen oder logarithmischen Verstärkern amplifiziert und von analogen zu digitalen Umwandlern (ADCs) in ein elektrisches Signal von 5-10 Volt umgewandelt, das stark genug ist, um graphisch dargestellt zu werden. Jeder einzelne akquirierte Datenpunkt wird als ein Ereignis bezeichnet. Problemlos können je nach Gerätetyp 2000 Ereignisse pro Sekunde detektiert werden.

Mit modernen Durchflusszytometern, wie dem in dieser Arbeit verwendeten Partec CyFlowML, lassen sich durch sorgfältige Auswahl der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe mehrere Parameter gleichzeitig detektieren. Dies stellt ein herausragendes analytisches Potential dar.

In dieser Arbeit wird der Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) verwendet^[250], um lebende von apoptotischen und toten Zellen zu unterscheiden^[251-252]. Bei apoptotischen Zellen passiert 7-AAD die defekte Zellmembran und ist im Zytoplasma lokalisiert. Es findet noch keine Anfärbung der DNA im Zellkern statt, wie es bei toten Zellen der Fall ist. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran werden nicht angefärbt. Der Komplex von 7-AAD und DNA hat ein Absorptionsmaximum bei 550 nm und ein Emissionsmaximum bei 660 nm. Dies erlaubt beispielsweise eine Kombination mit Fluorescein- und Phycoerythrin-markierten Antikörpern (Detektion in FL-1 bzw. FL-2) bei einer Detektion von 7-AAD in FL-3 bei Anregung der Probe ausschließlich mit einem 488 nm-Laser^[253].

Eine weitere Applikation der Durchflusszytometrie ist es, Zellen nach bestimmten Eigenschaften (z.B. Subtyp mit spezieller Epitop-Expression) aufzutrennen. Dieser Prozess wird als „Sortieren“ (engl. *sort*) bezeichnet und steht für das „S“ in der Abkürzung FACS (engl. *Fluorescence-activated cell sorting* (Bezeichnung für das Analyseverfahren) oder engl. *Fluorescence-activated cell sorter* (Bezeichnung für das analytische Gerät)). Im Allgemeinen wird dieser Begriff aber ebenso für Durchflusszytometer mit oder ohne „Sorter-Funktion“ verwendet. Bei Geräten, die eine Sortierfunktion besitzen, basiert dieses „Sortieren“ auf einer elektrischen Aufladung der Objekte, die die gewünschten Eigenschaften besitzen, im Moment

des Abscheidens eines Tropfens an der hochfrequent vibrierenden Messkapillare. In einem nachfolgend angelegten elektrischen Feld werden die Objekte entsprechend aufgetrennt. Eine Messkapillare hat einen Durchmesser von 50-70 μm . Abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit können zuverlässig ungefähr 30000-100000 Tropfen pro Sekunde sortiert werden. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer besitzt keine Sorter-Funktion. Die Durchflusszytometrie ist für die klinische Diagnostik von Blutproben sehr bedeutsam. Es ist möglich viele hämatologische, immunologische und onkologische Krankheiten durch verschiedenen Zellcharakteristika^[253], wie strukturelle Parameter, Größe, Granularität oder Hämoglobingehalt der Erythrozyten, sowie Glykosamingehalt, Anfärbbarkeit mit basischen oder sauren Farbstoffen, Lipase- oder Peroxidaseaktivität zu analysieren^[253]. Routinemäßig werden Untersuchungen auf spezielle Krankheiten mit verschiedenen Fluoreszenz-markierten Antikörper-Tests durchgeführt. Der Reifegrad der Blutzellen kann unterschieden werden durch Ausprägungen verschiedener Antigene oder Genprodukte^[253-254]. Die Markierung von ausgewählten Leukozyten in peripherem Vollblut mit fluoreszierenden Antikörpern wird in dieser Arbeit durchgeführt.

Fluorochrome sind die Molekülteile eines Fluoreszenzfarbstoffes, welche die Lichtenergie einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und wieder bei einer bestimmten längeren Wellenlänge in Form von Fluoreszenzlicht emittieren. Diese Verschiebung zwischen Absorptions- und Emissionswellenlänge wird als *Stokes-Shift* bezeichnet. Je größer die Absorption ist, desto höher ist die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes. Der Prozess der Emission erfolgt extrem schnell im Nanosekundenbereich und wird als Fluoreszenz bezeichnet. Licht ist eine Form von elektromagnetischer Energie, die sich als Welle mit bestimmter Frequenz und Wellenlänge durch den Raum bewegt. Diese Wellenlänge bestimmt die Farbe. Das Sonnenlicht umfasst den Bereich des sichtbaren Lichts (380-740 nm) sowie UV- und IR-Licht.

In Abb. 2.14 sind alle in dieser Arbeit für durchflusszytometrische Experimente verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit den entsprechenden Wellenlängen der maximalen Absorption und maximalen Emission dargestellt. Zusätzlich dazu werden die zur Anregung zur Verfügung stehenden Laser in dem verwendeten Durchflusszytometer dargestellt.

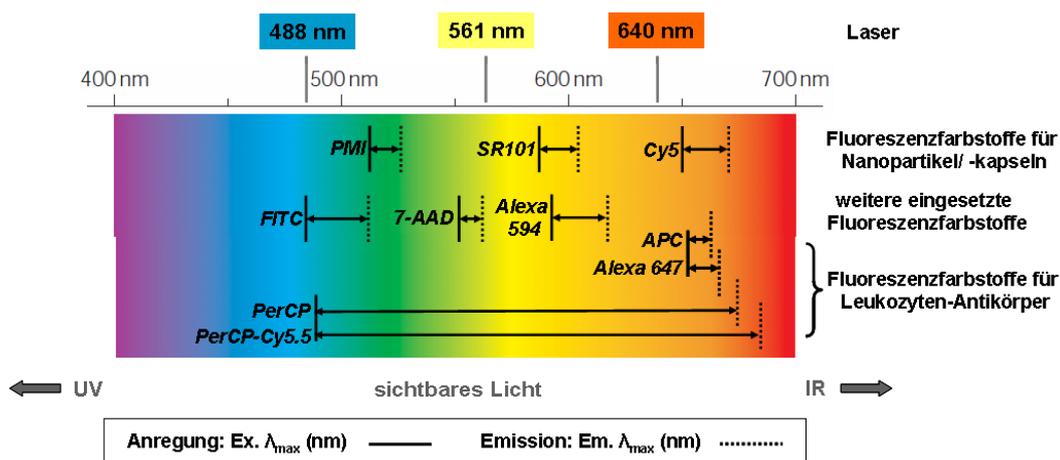


Abb. 2.14: Teil des elektromagnetischen Spektrums (sichtbares Licht) mit den für die durchflusszytometrischen Analysen verwendeten Lasern und Fluoreszenzfarbstoffen.

PerCP-Cy5.5 ist ein sogenannter „Tandem Farbstoff“ (engl. *tandem dye*) welcher aus zwei benachbarten Fluorochromen besteht. Wird der erste Farbstoff angeregt (PerCP bei 490 nm), überträgt dieser seine Energie strahlungsfrei an Cy5.5, welcher dann Fluoreszenzlicht emittiert. Dieser Prozess vergrößert den *Stokes-Shift* und erweitert somit das Farbenspektrum eines einzelnen Lasers und wird als Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet.

2.2.2 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Das konfokale Laser-Raster-Mikroskop (engl. *confocal laser scanning microscope*, CLSM) ermöglicht die genaue Betrachtung von optischen Ebenen in einer Fluoreszenz-markierten Probe. Laserlicht wird auf die gewünschte Bildebene des Objektes fokussiert und rastert diese dabei Punkt für Punkt ab^[255]. Das Emissionslicht passiert eine Lochblende, die ausschließlich für Licht aus der Fokusebene durchlässig ist. Emissionslicht, das nicht aus der Fokusebene stammt, wird nicht detektiert. In Abb. 2.15 ist die Funktionsweise des CLSM schematisch dargestellt. Werden mehrere Ebenen dieser virtuellen Schnitte zusammengefügt, entsteht ein dreidimensionales Abbild des Fluoreszenz-markierten Objektes. Im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie, bei der die gesamte Fluoreszenz eines betrachteten Volumens abgebildet wird, lassen sich mit dem CLSM Fluoreszenz-markierte Objekte, wie beispielsweise Nanopartikel, genau intrazellulär lokalisieren und gegebenenfalls deren Lage durch Kolokalisationsstudien bestimmter, zuvor Fluoreszenz-markierter Zellkompartimente, wie beispielsweise Lysosomen oder das endoplasmatischen Retikulum, genauer bestimmen^[256].

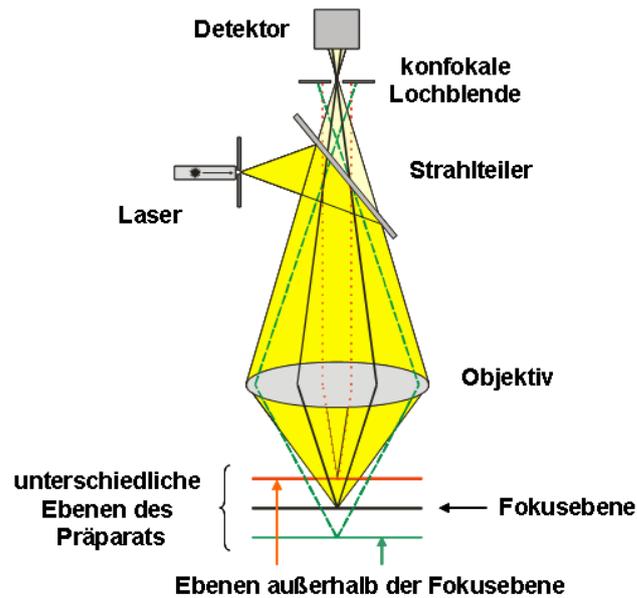


Abb. 2.15: Schematischer Aufbau eines CLSM.

Bei der Betrachtung von Zellen werden die Zellmembranen angefärbt, dadurch kann korrespondierend zu den quantitativen FACS-Untersuchungen eine qualitative Aussage über die tatsächliche intrazelluläre Lokalisation getroffen werden und eine Anhaftung der Partikel beispielsweise auf der Zellmembran ausgeschlossen werden. CLSM-Aufnahmen können ebenso an lebenden Zellen durchgeführt werden. Über einen längeren Zeitraum können dynamische Studien, wie beispielsweise Partikelahmen in Zellen, analysiert werden. Dies stellt gemeinsam mit der Fluoreszenzmarkierung von Zellkompartimenten einen Vorteil gegenüber elektronenmikroskopischen Verfahren dar. Allerdings liegt die Auflösung bei konfokalen Mikroskopieverfahren bei ungefähr 200 nm in xy-Richtung und bei 400 nm in z-Richtung und liegt damit weit über der von hochauflösenden elektronenmikroskopischen Verfahren.

3. Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Synthesen und Analysen von fluoreszierenden Poly(Styrol-*co*-Acrylsäure) und Poly(Styrol-*co*-AEMH)-Nanopartikeln

Nanopartikelsynthese

Die carboxylfunktionalisierten Nanopartikel (DB-PS-AA) wurden mit 1, 2, 3, 5 und 10 Gew.-% Acrylsäure (AA) (bezogen auf Styrol) und die aminofunktionalisierten Nanopartikel (DB-PS-AEMH) mit 1, 3, 5 und 10 Gew.-% 2-Aminoethylmethacrylat-Hydrochlorid (AEMH) hergestellt. Die Synthese der DB-PS-AA-Nanopartikel erfolgte mit dem Tensid SDS, die der DB-PS-AEMH-Nanopartikel mit CTMA-Cl. Die Synthesen dieser funktionalisierten Nanopartikel wie auch der unfunktionalisierten Nanopartikel ohne Comonomer erfolgte mit dem Miniemulsionspolymerisationsverfahren^[18, 20, 34]. Bei der Synthese der carboxylfunktionalisierten Nanopartikel wurde eine Mischung aus Styrol, Acrylsäure, Initiator (V59), hydrophobem Hexadecan und PMI zu der wässrigen Phase aus SDS und demineralisiertem Wasser gegeben. Bei der Synthese der aminofunktionalisierten Nanopartikel wurde AEMH in der wässrigen Phase gelöst. Nach einer Voremulgierung von 1h unter starken Rühren (1000 rpm) mit dem Magnetrührer wurde der Ansatz unter Eiskühlung mittels Ultraschall (Branson sonifier W450 digital, 1/2'' tip, Branson, USA) für 120s bei einer Amplitude von 90% behandelt und anschließend für 15 h bei 72 °C im Ölbad unter Rühren (500 rpm) polymerisiert. Die Zusammensetzung der Syntheseansätze ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Miniemulsionspolymerisation: Syntheseansätze für (copolymerisierte) Polystyrol-Nanopartikel (vgl. Tabellen 3.2 und 3.3).

Substanz	Einwaage (g)
Styrol	6,0-5,7
V59 (Initiator)	0,1
Hexadecan (Hydrophob)	0,25
PMI	0,003
AA	0,0-0,3
AEMH	0,0-0,3
SDS ¹⁾	0,072
CTMA-Cl ²⁾	0,125
demineralisiertes Wasser	24,0

- 1) verwendet zur Synthese der carboxylfunktionalisierten Nanopartikel DB-PS-AAa-d und der unfunktionalisierten Nanopartikel DB-PS-(AA)g.
- 2) verwendet zur Synthese der aminofunktionalisierten Nanopartikel DB-PS-AEMHa-c und des unfunktionalisierten Nanopartikels DB-PS-(AEMH)f.

Partikelaufreinigung

Die Nanopartikeldispersionen wurden nach der Synthese von wasserlöslichen Oligomeren und überschüssigem Tensid mittels einer Schlauchdialyse (Visking 27/32, Roth, molecular weight cutoff: 14 kD) aufgereinigt und das Ergebnis mittels Leitfähigkeitsmessung des Dialysewassers überprüft.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Größen der Nanopartikel wurden an einem Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Nicomp Particle Sizing Systems, USA) bei einem Streuwinkel von 90° bei einer Temperatur von 20 °C bestimmt.

ζ-Potentialmessung

Die ζ-Potentiale der Nanopartikel wurden in einer 10⁻³ M Kaliumchlorid-Lösung an einem Nicomp Zeta Sizer (Nicomp Particle Sizing Systems, USA) bei 20 °C bestimmt.

Partikelladungsdetektion (PCD)

Für die Messungen wurden 10 mL der gereinigten Nanopartikeldispersion mit einem Feststoffgehalt von 1 g·L⁻¹ eingesetzt. Ein Partikelladungsdetektor der Firma Müttek GmbH wurde in Verbindung mit einem automatischen Titrator (Metrohm AG, Schweiz) verwendet. Carboxylgruppen wurden mit dem kationischen Poly(diallyldimethyl-ammoniumchlorid) (PDADMAC) bei pH 10 (alle anionischen Gruppen sind deprotoniert) und bei pH 2 (Carboxylgruppen sind protoniert, die vorhandene negative Ladung wird von den Sulfatgruppen des SDS verursacht) titriert. Aus der Differenz des Verbrauchs an PDADMAC kann die Anzahl an funktionellen Gruppen·nm⁻² berechnet werden. Die Aminogruppen werden bei pH 2 mit dem anionischen Natrium-Polyethylensulfat (PES-Na) titriert. Bei dieser Titration wird zur Berechnung der funktionellen Gruppen·nm⁻² der Verbrauch von PES-Na des unfunctionalisierten Nanopartikels (DB-PS-(AEMH)f) abgezogen, um die kationischen Gruppen von CTMA-Cl nicht mit einzuberechnen. Die Berechnungen der funktionellen Gruppen·Nanopartikel⁻¹ und funktionellen Gruppen·nm⁻² erfolgen wie folgt^[20, 34]:

$$\left[\text{Gruppen} \cdot \text{g}_{\text{Polymer}}^{-1} \right] = \frac{V \cdot M \cdot N_A}{\text{FSG}} \quad (\text{Gl. 2})$$

Mit V = Verbrauch an Polyelektrolyt (L), M = molare Konzentration an Polyelektrolyt (mol·L⁻¹), N_A = Avogadro-Konstante (6,022·10²³·mol⁻¹) und FSG = Feststoffgehalt der Dispersion (g).

$$\left[\text{Gruppen} \cdot \text{Nanopartikel}^{-1} \right] = \left[\text{Gruppen} \cdot g_{\text{Polymer}}^{-1} \right] \cdot \frac{\rho \cdot D_n^3 \cdot \pi}{6} \quad \dots \text{(Gl. 3)}$$

$$\left[\text{Gruppen} \cdot \text{nm}^{-2} \right] = \left[\text{Gruppe} \cdot g_{\text{Polymer}}^{-1} \right] \cdot \frac{\rho \cdot D_n \cdot 10^{-18}}{6} \quad \dots \text{(Gl. 4)}$$

Mit ρ = Dichte des Polymers (Styrol = 1,045 (g·cm⁻³)) und D_n = mittlerer Partikeldurchmesser.

UV/Vis-Spektroskopie

Das UV/Vis-Absorptionsspektrum, zur Bestimmung des Fluoreszenzstoffgehaltes (PMI) der Nanopartikel, wurde mit dem UV/Vis-Spektrometer Lambda 25 (Perkin Elmer) aufgenommen. 7,8 mg der gefriergetrockneten Probe wurde in 2,5 g Tetrahydrofuran (THF) gelöst und die Absorption am Peak-Maximum des Spektrums bei einer Wellenlänge von 480 nm analysiert.

3.1.2 Kultivierung der Zellkulturen

HeLa- und A549-Zellen werden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, welches mit 10 Vol.-% fötalem Kälberserum (FCS), sowie 100 Einheiten·mL⁻¹ Penicillin und 100 µg·mL⁻¹ Streptomycin supplementiert ist. Diesem DMEM wird für die Kultivierung von MCF-7-Zellen noch 10 µg·mL⁻¹ Insulin, sowie 1mM Pyruvat zugesetzt. Jurkat- und PC3-Zellen werden in „Roswell Park Memorial Institute Medium“ (RPMI) kultiviert, das mit 10 Vol.-% FCS, 100 Einheiten·mL⁻¹ Penicillin, 100 µg·mL⁻¹ Streptomycin, 1mM Na-Pyruvat und 2mM GlutaMAX supplementiert ist. HepG2-Zellen werden in DMEM/F-12 kultiviert, welches mit 10 Vol.-% FCS, 100 Einheiten·mL⁻¹ Penicillin und 100 µg·mL⁻¹ Streptomycin ergänzt ist. MSC werden in α -MEM („Minium essential medium“) mit 20 Vol.-% FCS, 100 Einheiten·mL⁻¹ Penicillin, 100 µg·mL⁻¹ Streptomycin, 2 mg·mL⁻¹ Ciprofloxacin und 1mM Na-Pyruvat kultiviert. Die Zellen werden nach dem Aussäen in Zellkulturflaschen in einem Inkubator bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂ kultiviert. T-150-Einboden-Flaschen werden für HeLa-, A549-, MCF-7, HepG2- und PC3-Zellen, T-75-Einboden-Flaschen für Jurkat-Zellen und T-150-Dreiboden-Flaschen für MSC verwendet.

3.1.3 Partikelaufnahmeexperimente in Zellkulturen

Bei allen Zellversuchen werden, wenn nicht gesondert beschrieben, die Vorbereitungen zu den Zellkulturexperimenten wie folgt durchgeführt: Am Tag vor Experimentbeginn durch Nanopartikel-/Nanokapselzugabe werden die adhärennten Zellen durch eine 0,5%ige

Trypsinlösung abgelöst (Ausnahme: HepG2-Zellen, hierfür wird eine 0,25%ige Trypsin-Lösung verwendet). Bei HeLa-Zellen wird eine Trypsinmenge von 5 mL in die Zellkulturflasche (T-150) gegeben, anschließend die Flasche geschwenkt und danach ausgegossen, so dass der Zellkulturflaschenboden nur leicht benetzt bleibt. Bei MSC verbleiben 10 mL Trypsinlösung direkt in der T-150-Dreiboden-Zellkulturflasche. Die Zellkulturflaschen werden im Anschluss für 5-7 min in den Brutschrank gebracht, damit bei 37 °C das Trypsin aktiviert wird und die Zellen vom Flaschenboden abgelöst werden.

Danach wird die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 10 mL DMEM in HeLa-Zellkulturflaschen (T-150), sowie von 20 mL α -MEM (T-150, 3-Boden) in MSC-Zellkulturflaschen inhibiert. Das trypsinhaltige Medium wird abzentrifugiert (4 min bei 1500 rpm (= 453 g)) und das Zellpellet in einem definierten Volumen wieder aufgenommen.

Mit einer *Neubauer*-Zählkammer (durch Auszählung in vier Feldern) wird die Anzahl der Zellen pro mL bestimmt.

Für FACS-Experiment werden in 6-Well-Platten 50000 Zellen·cm⁻² (entspricht einer Gesamtzahl von 200000 Zellen pro 6-Well mit je 3 mL Zellkulturmedium) im entsprechenden Medium ausgesät.

Für die CLSM-Experimente werden 10000 – 15000 Zellen (10000 Zellen·cm⁻²) in ibiTreat μ -slides ausgesät in einem Volumen von 1 mL Zellkulturmedium. Experimente mit adhären Zellen werden am Folgetag weitergeführt, da diese Zellen eine gewisse Zeit benötigen, um wieder auf dem Zellkulturgefäß zu adhären.

Die Zugabemenge der Nanopartikel/ -kapseln erfolgt routinemäßig in einer Konzentration von 75 μ g·mL⁻¹ in das Zellkulturmedium mit 10% FCS (wenn nicht ausdrücklich auf eine Verwendung ohne zusätzliches FCS im Medium hingewiesen wird) ohne Verwendung eines Transfektionsagenses. Für MTS-Assays werden entsprechend 10000 Zellen pro 96-well in einem Volumen von 0,1 mL Zellkulturmedium ausgesät.

Die Normierung erfolgte für alle Nanopartikel, die den Fluoreszenzfarbstoff PMI enthalten auf 1000 μ g Fluoreszenzfarbstoff /g Polymer, um die Effizienz der Nanopartikelaufnahme zu vergleichen, wenn nicht anders erwähnt:

$$n \text{ MFIFL} - 1 (\text{a.u.}) = \frac{\text{MFIFL} - 1 (\text{a.u.}) \cdot \frac{1000 \mu\text{g Fluoreszenzfarbstoff}}{m_{\text{Polymer}}(\text{g})}}{\frac{m_{\text{Fluoreszenzfarbstoff}}(\mu\text{g})}{m_{\text{Polymer}}(\text{g})}} \dots \quad (\text{Gl.5})$$

$n \text{ MFI FL} - 1 (\text{a.u.})$ = normierter Median der Fluoreszenzintensität, gemessen im FL-1 Detektionskanal in willkürlichen Einheiten (engl. *arbitrary units*, a.u.)

Die Normierung des Fluoreszenzfarbstoffgehaltes (SR 101) für Heparin- und HES-Nanokapseln (Abschnitte 4.4.2 und 4.4.4.4) erfolgte auf die Anzahl der Nanokapseln·mL⁻¹ (Nanokapseldispersion); ebenso für die mit Styrol copolymerisierten P(BMDO/S)-Nanopartikel (Abschnitt 4.5.4).

3.1.4 Zellprobenpräparation für die Durchflusszytometrie

Das Zellkulturmedium wird abgezogen und jedes Well mit 1 mL PBS⁻ gewaschen. Anschließend werden die Wells mit je 0,5 mL Trypsinlösung für 5 min im Brutschrank abgelöst und danach die Trypsinwirkung mit 0,5 mL DMEM pro Well inhibiert.

Im Falle einer parallelen Durchführung eines Viabilitätsassays mit 7-AAD werden Inkubationsmedium sowie Wasch-PBS⁻, Trypsin und Inhibitionsmedium ebenfalls gesammelt. Die Zellen werden für 3 min mit 950 g in 1,5 mL Eppendorfröhrchen abzentrifugiert bzw. im Falle der Durchführung des Viabilitätsassays in 15 mL Falcons für 4 min bei 450 g. 7-AAD wird für 15 min in einer Konzentration von 16,7 µg·mL⁻¹ bei RT inkubiert. Nach der Färbung werden 650 µL PBS⁻ in die Eppendorf-Röhrchen gegeben und bei 950 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird in 1000 µL PBS⁻ resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. In der Literatur wird auf eine Konzentration von 28 µg·mL⁻¹ 7-AAD verwiesen^[257]. Die oben eingesetzte Konzentration von 16,7 µg·mL⁻¹ erwies sich aber in diversen Zellexperimenten als ausreichend. Die 7-AAD-Färbung ermöglicht eine Unterscheidung von lebenden (keine Färbung), apoptotischen (Zellfärbung ohne Zellkern) und toten Zellen (Zellfärbung inkl. Zellkern).

Durchflusszytometrische Analysen wurden mit den Fluoreszenz-markierten Antikörpern CD44-FITC und Anti-human FOLR-1-APC (FR α) durchgeführt. Die eingesetzten Volumina sind in Tabelle 3.10 aufgeführt. Die spezifische Antikörperfärbung mit Anti-human FOLR-1-APC wurde mit der Isotypenkontrolle IgG1 APC überprüft und negativ getestet.

Die Quantifizierung der zellulären Aufnahme wird durchflusszytometrisch untersucht mit dem CyFlow ML unter Verwendung der Software FlowMax 2.57 und 3.0. Die Anregung erfolgt für mit PMI Fluoreszenz-markierte Nanopartikel mit dem 488 nm-Laser, die Detektion erfolgt im FL-1. Nanokapseln, die Sulforhodamin 101 enthalten, werden mit einem 561 nm-Laser angeregt und im FL-5 detektiert; Nanokapseln die CyTM5 Mono-NHS-Ester enthalten werden mit dem 633 nm-Laser angeregt und im FL-6 detektiert (Tabelle 3.10). Zur Analyse wurden die Zellen anhand eines FSC/SSC-Dot Plots ausgewählt („gategatet“) unter Ausschluss

von Zelldebris. Zur weiteren Analyse wurden diese ausgewählten Ereignisse des entsprechenden Fluoreszenz-Detektionskanals (FL) mit der FCS Express 3-Software (De Novo Software, USA) analysiert. Wenn nicht anders im Text erwähnt handelt es sich immer um den Median der entsprechenden Fluoreszenz im 1D-Histogramm, der mit der entsprechenden Menge von Nanopartikeln korrespondiert, die in die Zellen aufgenommen wurde oder an den Zellmembranen lokalisiert ist. Alle Werte wurden aus Dreifachmessungen aus unabhängigen Proben generiert (sofern nicht anderweitig erwähnt) und deren Standardabweichungen angegeben.

3.1.5 Zellprobenpräparation für die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Zellen in ibiTreat μ -Slides werden zweimal mit 1 mL PBS⁻ zur vollständigen Entfernung von Nanopartikeln und -nanokapseln sowie von Serumproteinen des FCS gewaschen. Danach wird 1 mL PBS⁻ zugegeben. Anschließend werden die Fluoreszenz-markierten Antikörper, Membran- oder Kompartimentfarbstoffe in den entsprechenden Volumina bzw. Konzentrationen, die in Tabelle 3.10 angegeben sind, zugegeben.

Die Aufnahmen wurden durchgeführt, um eine intrazelluläre Lokalisation der Nanopartikel/-kapseln zu bestätigen. Die Aufnahmen wurden mit einem kommerziellen Mikroskop (CLSM SP5 STED Leica Laser Scanning Confocal Microscope, Leica, Germany) aufgenommen, bestehend aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop DMI 6000 CS, ausgestattet mit einer Multi-Laser-Kombination und fünf Detektoren, die eine Detektion im Bereich von 400-800 nm ermöglichen. Ein HCX PL APO CS 63x/1,4-0,6 Öl-Objektiv wurde für diese Experimente verwendet. Folgende Laser wurden eingesetzt: Ar-Laser (~20 mW, $\lambda = 488$ nm), DPSS (~20 mW, $\lambda = 561$ nm) und HeNe-Laser ($\lambda = 633$ nm ~10 mW). Die Zellanalysen, sowie die 3D-Bildbearbeitungen wurden mit dem LAS AF-Programm (Leica, Germany) durchgeführt.

3.1.6 Probenpräparation für Inkubationsexperimente mit BSA-bedeckten Polystyrol-Nanopartikeln

Bedeckung der Nanopartikel mit BSA

Der pH-Wert der verwendeten Nanopartikeldispersionen ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) wurde mittels Pufferlösung auf 6.0 eingestellt. Die BSA-Lösung ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) wurde in 50 Aliquoten mit jeweils 5 μL im Abstand von 300 s im Verlauf der ITC-Experimente zutitriert^[21]. BSA-Lösungen mit Konzentrationen $> 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ führen dazu, dass BSA als Dimer oder Polymer vorliegt und sind

deshalb nicht geeignet^[21, 258]. Nach der Titration liegen die Nanopartikel komplett mit BSA-bedeckt in der Dispersion vor.

Zellexperimente mit BSA-bedeckten Nanopartikeln

Im Falle der mit BSA-bedeckten Nanopartikel wurde die Dispersion immer 12 h nach der BSA-Beladung via ITC den Zellansätzen zugegeben. Alle Nanopartikel wurden mit einer Konzentration von $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ eingesetzt. HeLa-Zellen wurden nach Standardverfahren kultiviert. Für die Ansätzen mit einer Nanopartikelinkubation ohne FCS im Medium wurden die 6-well-Platten zuvor zweimal mit je einem Milliliter calcium- und phosphatfreiem PBS (PBS⁻) gespült und danach in das FCS-freie Medium gegeben, um eine proteinfreie Partikelinkubation in diesen Wells zu garantieren. Um den Verlauf der Zellaufnahme über den Zeitraum von 2, 4, 8 und 24 h zu untersuchen, wurden die Nanopartikel mit den Zellen im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Die Probenpräparation für durchflusszytometrische Analysen erfolgte ebenso wie die 7-AAD-Färbungen zur Unterscheidung der lebenden von toten und apoptotischen Zellen standardmäßig wie in 3.1.4 beschrieben. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden die Fluoreszenzintensitätswerte der Nanopartikel enthaltenden Proben mit den Negativ-Kontrollen verglichen. Die Nanopartikel wurden auf den Gehalt an Fluoreszenzfarbstoff PMI im erhaltenen Polymer normiert (siehe Gl. 5). Alle Proben werden standardmäßig als Dreifachansätze angesetzt, ausgewertet mit den Standard-Abweichungen und bestätigt durch mindestens ein unabhängiges Wiederholungsexperiment.

3.1.7 Probenpräparation für den Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Leser

Der MTS-Assay (CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA) zur Durchführung zusätzlicher Viabilitätsuntersuchungen wird gemäß Anleitung in 96-Well-Platten (Corning Incorporated costar[®] 3603, Corning, Germany) durchgeführt und im Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Leser (engl. *microplate reader*) die Absorption bei 490 nm gemessen.

3.1.8 Partikelaufnahmeexperimente in peripherem Vollblut

Frisch entnommenes peripheres Vollblut von gesunden Freiwilligen wurde aus einer Vene in der Armbeuge entnommen. Danach würden die Proben innerhalb von wenigen Minuten ge-

rinnen, deshalb werden kommerziell erhältliche Blutentnahmeröhrchen verwendet, die routinemäßig für aseptische hämatologische Untersuchungen verwendet werden. Vollständiges Füllen der Röhrchen bis zur Markierung gewährleistet gleichbleibende Konzentrationen der darin enthaltenen Antikoagulanzen. Das erste Röhrchen lässt sich nie komplett füllen (aufgrund des Schlauchvolumens), darum wird es gesondert markiert und nicht für die Versuche verwendet. Verwendet werden S-Monovetten[®] (Sarstedt, Germany) mit Lithium-Heparin (Li-Heparin, 10-30 I.U.·mL⁻¹), Kalium-EDTA (K₃EDTA, 1,2-2 mg EDTA·mL⁻¹) and Natrium-Citrat (0,106 molare Lösung von Na₃Citrat bei einer Verdünnung von 1:10 in Blut). Nach der Blutentnahme werden die Röhrchen sofort kurz invertiert und anschließend für 10 min auf dem Blutröhrchenroller (SRTP, Stuart, UK) zur vollständigen Durchmischung gelegt, so dass sichergestellt werden kann, dass das Antikoagulans seine Wirkung vollständig entfalten kann. Anschließend wird das Volumen jedes Blutröhrchens auf 1 mL reduziert und anschließend wieder kurz auf den Blutröhrchenroller zur weiteren Durchmischung gelegt. Danach erfolgt die Zugabe der Nanopartikel in unterschiedlichen Konzentrationen (Standardkonzentration von 300 µg·mL⁻¹ wurde aufgrund verschiedener Konzentrations-Testreihen festgelegt, siehe Abschnitt 4.2.2). Die Partikelinkubation erfolgte die gesamte Zeit ebenfalls auf dem Blutröhrchenroller bei RT für unterschiedlichen Inkubationszeiten bis maximal 8 h. Längere Inkubationszeiten haben sich als nicht sinnvoll erwiesen, weil sich das Zellbild im FSC/SSC verschlechtert, dies gilt insbesondere für Monozyten in Heparin-Röhrchen. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 100 µL des partikelinkubierten Vollblutes in 1,5 mL-Eppendorfröhrchen überführt und mit den entsprechenden Standardmengen der Fluoreszenz-markierten monoklonalen anti-humanen Antikörpern (murine) nach Herstellerempfehlung (alle Becton Dickinson) bei RT für 25 min im Dunkeln angefärbt: CD3 APC, CD14 APC, CD16 AlexaFluor647, CD19 APC (siehe Tabelle 3.10). Das Lysieren der Erythrozyten erfolgte im Anschluss mit Lyse-Puffer der Firma BD. Der Lysepuffer wird 1: 10 mit demineralisiertem Wasser verdünnt. 1,25 mL dieses Lysepuffers werden zu jeder Probe in das Eppendorfröhrchen gegeben. Die Proben werden mit dem Vortexer durchmischt. Danach erfolgt die Lyse im Dunkeln bei RT für 12 min. Anschließend werden die Proben noch einmal kurz auf dem Vortexer durchmischt und dann bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Proben werden zweimal mit 1 mL PBS⁻ gewaschen, jeweils mit 500 g für 5 min zentrifugiert, dabei wird das Zellpellet zwischen den einzelnen Waschschritten nicht resuspendiert. Anschließend wird das Zellpellet in 1000 µL PBS⁻ aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgt in gleicher Weise wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben. Wenn nicht anders im Text erwähnt, handelt es sich immer um den Median der Fluoreszenzintensität im 1D-Histogramm, welcher mit der entsprechenden Menge von fluoreszierenden Nanopartikeln korrespondiert, die von den Antikörper-positiven Zellen aufgenommen wurden oder die an deren Zellmembranen lokalisiert sind. Alle Werte wurden aus Einfachmachmessungen generiert. Alle Experimente wurden unabhängig voneinander mehrfach wiederholt. Die Auswahl- („Gating-“) Strategie ist in Abschnitt 4.2.1 ausführlich beschrieben.

Die Aufarbeitung der Proben für die CLSM-Versuche erfolgt in gleicher Weise. Die Nanopartikelkonzentration beträgt entsprechend $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Um eine ausreichende Zellkonzentration in der Probe zu erhalten wird die doppelte Menge an inkubiertem Vollblut verwendet ($200 \mu\text{L}$) und entsprechend auch mit der doppelten Menge Antikörper inkubiert. Dazu werden $2,0 \text{ mL}$ -Eppendorfröhrchen verwendet und $1,75 \text{ mL}$ Lyse-Puffer zugegeben. Nach dem Waschen mit PBS^- (analog der beschriebenen Proben-Aufarbeitung oben) wird das Zellpellet in $50 \mu\text{L}$ PBS^- aufgenommen und davon $30 \mu\text{L}$ in eine Slide-Chamber gegeben ($1 \mu\text{-Slide VI flat coated (Poly-L-Lysine) microscopy chamber}$).

3.2 Material

3.2.1 Zelllinien, Primärzellen und Leukozyten aus humanem peripherem Vollblut

HeLa-Zellen

Eine der meist verwendeten immortalisierten menschlichen Zelllinien, die leicht zu kultivieren sind und eine hohe Proliferationsrate besitzen. Es handelt sich um Gebärmutterhalskrebszellen eines Tumors, die Henrietta Lacks (HeLa) im Februar 1951 entnommen worden sind. Diese Zelllinie wurde von George Otto Gey 1951 etabliert^[259]. HeLa-Zellen sind in Zellkulturlaboratorien verbreitet für die Erforschung unterschiedlichster Fragestellungen. Die verwendeten Zellen stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

Mesenchymale Stammzellen

Humane Mesenchymale Stammzellen (engl. *mesenchymal stem cells*, MSC)^[260] wurden aus explantierten Hüftknochen mit dem Einverständnis der Patienten gewonnen und Studien mit diesen Zellen vom Ethikrat der Universität Ulm genehmigt. MSCs sind multipotent und

können sich unter anderem *in vivo* und *in vitro* in Adipozyten (Fettzellen), Chondrozyten (Knorpelzellen) und Osteoblasten (Knochenzellen) differenzieren. Die verwendeten MSCs wurden positiv auf CD29, CD73, CD44, CD90, CD105, CD146, CD166 und MHC Klasse I getestet sowie negativ auf CD1a, CD3, CD14, CD16, CD19, CD34, CD45, CD133, MHC Klasse II und SSEA2.

Jurkat-Zellen

Bei Jurkat-Zellen handelt es sich um immortalisierte T-Lymphozyten mit einer hohen Proliferationsrate, die Ende der 1970er Jahre aus Zellen eines an T-Zell-Leukämie erkrankten Jungen etabliert wurde^[261]. Die Zellen verwendeten Zellen stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

A549-Zellen

Diese immortalisierte Zelllinie stammt aus einem Adenokarzinom von humanen alveolaren Epithelzellen. Sie exprimiert keine Folsäure-Rezeptoren und wurde aufgrund dieser Eigenschaft für Experimente eingesetzt, die in Abschnitt 4.4.4.4 beschrieben werden^[262].

MCF-7

Die Östrogen-Rezeptor positiven, immortalisierten MCF-7-Zellen wurden 1970 aus einem Brustkrebs-Tumor isoliert (engl. *Michigan Cancer Foundation-7*)^[263].

HepG2

Immortalisierte HepG2-Zellen wurden aus einem Leberzellkarzinom isoliert.^[264] Sie werden neben der Krebsforschung auch in vielen Studien eingesetzt, die diverse Stoffwechselerkrankungen der Leber untersuchen.

PC3

Diese immortalisierte Prostata-Krebs Zelllinie wurde aus Knochenmetastasen isoliert^[265-266].

Leukozyten aus peripherem Vollblut

Die Eigenschaften und Funktionen dieser Immunzellen werden im Abschnitt 2.1.5 beschrieben. Die Gewinnung des peripheren Vollblutes, sowie die Versuchsdurchführung und die Antikörpermarkierung der Zellen ist in Abschnitt 3.1.8 beschrieben.

3.2.2 Nanopartikel und Nanokapseln

Tabelle 3.2: Polystyrol-Nanopartikel, Synthese Daniela Baumann (siehe 4.1 und 4.2.1).

Probenbezeichnung	Comonomer (Gew.-% von Styrol)	Tensid (Gew.-% von Styrol)	mittlerer Durchmes- ser (nm), ¹⁾	Standard- abweichung (nm)	Oberflächenfunktio- nalisierung, (Anzahl funktionelle Gruppen·nm ⁻²), ²⁾	Oberflächenfunktio- nalisierung, (Anzahl funktionelle Gruppen·Nanopartikel ⁻¹), ₃₎	ζ-Potential (mV), ⁴⁾	PMI-Gehalt (μg·g _{polymer} ⁻¹), ₅₎
DB-PS-AAa	Acrylsäure (1)	SDS (1,2)	115	8,4	0,06	2750	-55,7	352,7
DB-PS-AAb	Acrylsäure (2)	SDS (1,2)	115	11,4	0,25	10490	-52,6	424
DB-PS-AAc	Acrylsäure (3)	SDS (1,2)	116	13,9	0,28	11990	-52,9	406,5
DB-PS-AAd	Acrylsäure (5)	SDS (1,2)	115	10,6	0,45	18590	-51,5	368,3
DB-PS-(AA)g, ⁶⁾	-	SDS (1,2)	110	12,8	0,05	1760	-52,1	200,2
DB-PS-AEMHa	2-Aminoethylmeth- acrylat-Hydrochlorid (1)	CTMA-Cl (2,1)	117	16,5	0,01	810	+45,8	501,3
DB-PS-AEMHb	2-Aminoethylmeth- acrylat-Hydrochlorid (3)	CTMA-Cl (2,1)	141	26,9	0,23	15300	+47,5	275,8
DB-PS-AEMHc	2-Aminoethylmeth- acrylat-Hydrochlorid (5)	CTMA-Cl (2,1)	144	37,8	0,58	38600	+45,3	272,2
DB-PS-(AEMH)f, ₆₎	-	CTMA-Cl (2,1)	107	12,2	0,04	1500	+50,0	201,4

1) Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers erfolgte mittels DLS; 2) die Anzahl der funktionellen Gruppen·nm⁻² bzw. 3) die Anzahl der funktionellen Gruppen·Nanopartikel⁻¹ wurden mittels PCD berechnet; 4) die ζ-Potentialmessung erfolgte mittels Nicomp Zeta Sizer (Nicomp Particle Sizing Systems, USA); 5) Die Bestimmung des Fluoreszenzstoffgehalts (PMI) der Nanopartikel erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie. 6) Bei der Bezeichnung der beiden unfunktionierten Nanopartikel DB-PS-(AA)g und DB-PS-(AEMH)f ist das Comonomer in Klammern gesetzt, dadurch wird aber die Zugehörigkeit zur entsprechenden Partikelreihe hervorgehoben und veranschaulicht die Verwendung der jeweiligen Tenside SDS bzw. CTMA-Cl bei der Synthese.

Tabelle 3.3: Polystyrol-Nanopartikel, Synthese Frau Dr. Anna Musyanovych (siehe 4.2.2).

Proben- bezeichnung	Synthese- bezeichnung	Comonomer (Gew.-% von Monomer)	Tensid (Gew.-% von Styrol)	mittlerer Durchmesser (nm), ¹⁾	Standard- abweichung (nm)	Oberflächenfunktionali- sierung, (Anzahl funktionelle Gruppen·nm ⁻²), ²⁾	ζ-Potential (mV), ³⁾	PMI-Gehalt (μg·g _{polymer} ⁻¹), ₄₎
ASS5	AM-ASS5-PM	Acrylsäure (5)	SDS (1,2)	121	+/-6	0,5	-46	276
SS	AM-SS-PM	-	SDS (1,2)	115	+/-3	-	-45	468
NSC5	AM-NSC5-2PM	2-Aminoethylmeth- acrylat-Hydrochlorid (5)	CTMA-Cl (2,1)	124	+/-5	0,13	+53	501
SC	AM-SC-PM	-	CTMA-Cl (2,1)	100	+/-3	-	+49	504

Tabelle 3.4: Polystyrol-Nanopartikel, Synthese Frau Dr. Grit Baier (siehe 4.3).

Proben- bezeichnung	Synthese- bezeichnung	Comonomer (Gew.-% von Monomer)	Tensid (Gew.-% von Styrol)	mittlerer Durchmesser (nm), ¹⁾	Standard- abweichung (nm)	Oberflächenfunktionali- sierung, (Anzahl funktionelle Gruppen·nm ⁻²), ²⁾	ζ-Potential (mV), ³⁾	PMI-Gehalt (μg·g _{polymer} ⁻¹), ₄₎
PS	GB-PS-32	-	Lutensol [®] AT50	200	36	-	-8	370
PS-AA	GB-PS-24	Acrylsäure (2)	Lutensol [®] AT50	190	25	0,63	-21	400
PS-AEMH	GB-PS-26	2-Aminoethylmeth- acrylat-Hydrochlorid (2)	Lutensol [®] AT50	170	20	0,14	+7	430

1) Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers erfolgte mittels DLS; 2) die Anzahl der funktionellen Gruppen·nm⁻² wurden mittels PCD berechnet; 3) die ζ-Potentialmessung erfolgte mittels Nicomp Zeta Sizer (Nicomp Particle Sizing Systems, USA); 4) Die Bestimmung des Fluoreszenzstoffgehalts (PMI) der Nanopartikel erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie.

Tabelle 3.5: Nanokapseln, Synthese Frau Dr. Grit Baier (siehe 4.4).

Art des Polymers	Probenbezeichnung	Monomer/Makromolekül	Tensid zur Redispersierung (0,1 Gew.-%)	mittlerer Durchmesser (nm), ¹⁾	Fluoreszenzfarbstoff		
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-57-1	Hyaluronsäure (HS)	CTMA-Cl	330	Cy TM 5 Mono NHS-Ester		
	GB-M-57-2		SDS	350			
	GB-M-57-3		Lutensol [®] AT50	470			
	Polyurethan/-harnstoff	GB-M-59-2	Hyaluronsäure (HS)	SDS	350	Cy TM 5 Mono NHS-Ester	
		GB-M-59-3		Lutensol [®] AT50	420		
		GB-M-72-2		SDS	350		
	Polyurethan/-harnstoff	GB-M-72-3	Hyaluronsäure (HS)	Lutensol [®] AT50	440	Cy TM 5 Mono NHS-Ester	
GB-M-77 R		Triethylentetramin (TET)		Lutensol [®] AT50	205		SR 101
Polyharnstoff	GB-M-77 C					265	
	Polyharnstoff	GB-M-78 R	Diethylentriamin (DET)	Lutensol [®] AT50	220	SR 101	
GB-M-78 C							260
Polyharnstoff	GB-M-80 R	Diaminohexan (DH)	Lutensol [®] AT50	210	SR 101		
	GB-M-80 C						285
Polyharnstoff	GB-M-92 R	Diethylentriamin (DET)	Lutensol [®] AT50	230	SR 101		
	GB-M-92 C						285
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-85 R	Milchsäure (MS)	SDS	280	SR 101		
	GB-M-85 CM						n.b.
	GB-M-85 C						320
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-86 R	Mannitol (MA)	SDS	250	SR 101		
	GB-M-86 CM						n.b.
	GB-M-86 C						305
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-87 R	Hyaluronsäure (HS)	SDS	350	SR 101		
	GB-M-87 CM						n.b.
	GB-M-87 C						420
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-88 R	Kartoffelstärke (KS)	SDS	250	SR 101		
	GB-M-88 CM						n.b.
	GB-M-88 C						310
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-90 R	Hydroxyethylstärke 200 (HES 200)	SDS	230	SR 101		
	GB-M-90 CM						n.b.
	GB-M-90 C						330
Polyurethan/-harnstoff	GB-Sacch-30	Hydroxyethylstärke 200 (HES 200)	SDS	290	SR 101		
	GB-Sacch-30 CM						290
	GB-Sacch-30 C						307
Polyurethan/-harnstoff	GB-S6	Heparin	SDS	210	SR 101		
	GB-S14						225

Abkürzungen: R = redispersiert nach Synthese, CM = carboxymethylierte Zwischenstufe, C = nach Folsäure-Kopplung, n.b. = nicht bestimmt; 1) Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers erfolgte mittels DLS.

Tabelle 3.6: P(BMDO)-Nanopartikelsynthese Herr Dr. Jörg Max Siebert (siehe 4.5).

Nanopartikel	Tensid, Konz. (Gew.-%) in Bezug zur kontinuierlichen Phase	BMDO, Konz. (Gew.-%) in Bezug zur Monomerphase	BMDO, Konz. (Gew.-%) im erhaltenen Polymer	Styrol, Konz. (Gew.-%) in Bezug zur Monomerphase	Styrol, Konz. (Gew.-%) im erhaltenen Polymer	mittlerer Durch- messer, (nm), ¹⁾	Molekular- gewicht, (g [*] mol ⁻¹), ²⁾
P(BMDO)-CTMA-Cl	CTMA-CL, 0,4	100	100	-	-	96	18400
P(BMDO)-SDS	SDS, 0,3	100	100	-	-	200	42700
P(BMDO)-Tween 20	Tween [®] 20, 1,6	100	100	-	-	220	2500
P(BMDO)-Tween 40	Tween [®] 40, 1,6	100	100	-	-	210	2200
P(BMDO)-Tween 80	Tween [®] 80, 1,6	100	100	-	-	213	2200
P(BMDO/S)-0/100-Tw80	Tween [®] 80 1,6	0	-	100	100	157	253000
P(BMDO/S)-50/50-Tw80	Tween [®] 80 1,6	50	39	50	61	340	40000
P(BMDO/S)-90/10-Tw80	Tween [®] 80 1,6	90	78	10	22	51	2500
P(BMDO/S)-100/0-Tw80 = P(BMDO)-Tween 80 (siehe oben)	Tween [®] 80 1,6	100	100	0	-	213	2200
Pac-P(BMDO)-Tw80	Tween [®] 80 1,6	100	100	-	-	287	6000
P(BMDO)-Tw80	Tween [®] 80 1,6	100	100	-	-	304	6000

1) Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers erfolgte mittels DLS; 2) Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mittels Gel-Permeations-Chromatographie.

3.2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.7: Eingesetzte Geräte.

Gerät	Hersteller
Analytische Geräte	
Dynamische Lichtstreuung (DLS): Nicomp 380 Submicron Particle Sizer	Nicomp Particle Sizing Systems
Feststoffgehalt: Feststoffwaage	Kern
Partikelladungsdetektion (PCD): Partikelladungsdetektor mit automatischem Titrator	Mütek GmbH und Metrohm AG
Zeta-Potential: Nicomp Zeta Sizer	Nicomp Particle Sizing Systems
UV-Vis-Spektrometrie: Lambda 16 UV/VIS-Spektrometer	Perkin Elmer
Durchflusszytometer:	
CyFlowML mit Messprogramm FlowMax 2.57 und 3.0	Partec
Mikroskope:	
Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie: CLSM Leica SP5 II mit CW-STED mit Messprogramm LASAF lite	Leica
Invertiertes Mikroskop CKX41 (4x/0.10, 10x/0.25 Php, 20x/0.40 Php Objektive)	Olympus
Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) Zeiss Leo Gemini	Zeiss
Mikroplatten-Leser:	
Infinite M1000 mit Messprogramm i-control1 6.19.0	Tecan
Sterilwerkbänke:	
Flow S@vermate 1.2	Bioair
Flow c-[MaxPro] ³ -130	Berner
Zellkultur:	
Absaugpumpe Vacusafe comfort	IBS Integra Bioscience
Brutschränke	Heraeus Instruments
Gefrierschrank -80°C Hera Freeze Top	Thermo Scientific
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Inkubator C200	Labotect
Kühlschränke 2-8°C	Liebherr
Pipetten: Mikroliterpipetten Research, Mehrkanalpipette Research plus	Eppendorf
Accu-jet pro pipette controller	Brand
Stickstoff-Zelltank LS6000	Taylor-Wharton
Wasserbad	Memmert
Vortex Mixer Reax Control	Heidolph
Zählkammer Neubauer	Hirschmann EM Techcolor
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5810R	Eppendorf
Mikrozentrifuge 5430	Eppendorf

Tabelle 3.8: Eingesetzte Verbrauchsartikel.

Verbrauchsartikel	Hersteller
Costar 96-well Assay Plate	Corning Incorporated
μ-dish 35mm, high, ibiTreat, tissue culture treated (Mikroskopiekammer)	IBIDI
μ-dish 35mm, low hydrophobic, uncoated (Mikroskopiekammer)	IBIDI
μ-Slides VI –flat, coated (poly-L-Lysine) (Mikroskopiekammer)	IBIDI
Eppendorf Reaktionsgefäße (1.5 und 2.0 mL)	Eppendorf
Röhren 3,5mL (FACS-Röhrchen)	Sarstedt
Serologische Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 und 50 mL)	Greiner Bio-one
Spitzbodenröhrchen (15 und 50 mL)	Greiner bio-one
Waage XS205 Dual Range	Mettler-Toledo
Zellkulturflaschen Tissue culture Cellstar (25, 75 und 175 cm ²)	Greiner Bio-one
Zellkulturflasche (3-Boden)	Nunc
Zellkulturplatten (6-,12-,24-,96-well) Cellstar	Greiner Bio-one

3.2.4 Chemikalien und nicht-fluoreszierende Reagenzien

Tabelle 3.9: Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien (nicht fluoreszierend).

Chemikalien zur Synthese	Hersteller
Acrylsäure (AA)	Sigma Aldrich
2-Aminoethylmethacrylat Hydrochlorid >95% (AEMH)	Sigma Aldrich
Cetyltrimethylammonium Hydrochlorid, 95% in wässriger Lösung (CTMA-Cl)	Fluka
Hexadecan (HD), 99%	Sigma Aldrich
N-(2,6-diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarbonacidimid (PMI)	BASF
Natriumdodecylsulfat, 96% (SDS)	Fluka
Styrol	Merck
2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril) (V59)	Wako Chemicals
Reagenzien (nicht fluoreszierend)	Hersteller
α-MEM (minimum essential medium)	Lonza
DMEM (Dulbecco`s modified eagle medium)	Invitrogen
DMEM ohne Folsäure (Sonderanfertigung)	Invitrogen
DMEM/F-12	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
DPBS (Dulbecco`s phosphate buffered saline) mit (PBS ⁻) und ohne (PBS ⁺) Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen
HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen
RPMI (Roswell Powell Memorial Institute)	Invitrogen

Reagenzien (nicht fluoreszierend)	Hersteller
Ciprofloxacin	Fluka
FCS (fötale Kälberserum)	Invitrogen
GlutaMAX	Invitrogen
Insulin, Human Recombinant	Gibco
Pen Strep (Penicillin/Streptomycin)	Invitrogen
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich
Trypanblau (0,4%ige Lösung)	Sigma-Aldrich
Trypsin 0,25%	Invitrogen
Trypsin 2,5%	Invitrogen
Ampuwa	Fresenius Kabi
BD FACS Lysing Solution (Lyselösung) 10fach konzentriert	Becton Dickinson (BD)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fluka
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS-Assay)	Promega
Dynasore [®]	Sigma-Aldrich
Ethanol abs.	Sigma-Aldrich
Immersionsöl n = 1,518	Leica
Paclitaxel, > 97%	Sigma-Aldrich
Paclitaxel Hospira (6mg/mL) Konzentrat	Hospira
Abraxane [®] (5mg/mL)	Abraxis BioScience Limited
Sterillium	Bode Chemie

3.2.5 Fluoreszierende Reagenzien

Tabelle 3.10: eingesetzte fluoreszierende Reagenzien

Reagenz (Konzentration)	Abkürzung	Hersteller	Anregung Ex. λ_{\max} (nm)	Emission Em. λ_{\max} (nm)	FACS eingesetztes Volumen (μL)	FACS Anregung, λ (nm)	FACS Detektion, FL, Filter, λ (nm)	CLSM eingesetztes Volumen (μL)	CLSM Anregung , λ (nm)	CLSM Detektion, λ (nm)
<u>Farbstoffe für Zellmembranen und Zellkompartimente</u>										
7-Aminoactinomycin-D (0,2mg·mL ⁻¹)	7-AAD	Sigma	550	660	25 (=16,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) für $2\cdot 10^5$ Zellen	488	FL-3, IBP 682 FL-6, IBP 675	-	-	-
CellMask™ Deep Red plasma membrane stain (5mg·mL ⁻¹)	CMDR	Invitrogen	554	567	-	-	-	0,25 (= 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) für $1,5\cdot 10^4$ Zellen	633	650-750
CellMask™ Orange plasma membrane stain (5mg·mL ⁻¹)	CMO	Invitrogen	649	666	-	-	-	0,25 (= 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) für $1,5\cdot 10^4$ Zellen	561	570-620
DRAQ5™ (Zellkernfarbstoff) (5mM)	DRAQ5	Biostatus Limited	646	681, 697 interka- liert mit dsDNA	-	-	-	0,25 (=12,5 μM) für $1,5\cdot 10^4$ Zellen	633	650-750
ER-Tracker™ Green dye (Endoplasmatisches Retikulum) (1mM)	ER-Tracker	Invitrogen	504	511	-	-	-	=300 nM für $1,5\cdot 10^4$ Zellen, 20 min	488	500-550
LysoTracker® Green DND-26 (Lysosomenfärbung) (1mM)	Lyso- Tracker	Invitrogen	504	511	-	-	-	= 100 nM für $1,5\cdot 10^4$ Zellen, 1 h	488	500-550

Reagenz (Konzentration)	Abkürzung	Hersteller	Anregung Ex. λ_{\max} (nm)	Emission Em. λ_{\max} (nm)	FACS eingesetztes Volumen (μL)	FACS Anregung, λ (nm)	FACS Detektion, FL, Filter, λ (nm)	CLSM eingesetztes Volumen (μL)	CLSM Anregung , λ (nm)	CLSM Detektion, λ (nm)
<u>Farbstoffe Nanopartikel</u>										
N-(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4-dicarbonacidimid	PMI	BASF	515	530		488	FL-1, IBP 527		488	500-550
<u>Farbstoffe für Nanokapseln</u>										
Cy TM 5 Mono NHS-Ester	Cy5	GE healthcare	650	670		640	FL-6 IBP 675		561	580-620
Sulforhodamin 101	SR 101		586	605		561	FL-5 IBP 610		633	660-720
<u>Proteine</u>										
BSA Alexa Fluor 594		Invitrogen	590	622		561			561	590 - 630
<u>Antikörper-Zellkultur</u>										
CD44 (HI44a) Antibody, Mouse, FITC-conjugated (gegen einen Hyaluronsäure-Rezeptor, markiert mit Fluoresceinisothiocyanat)		Abbcam (251024)	485 (pH9)	514 (pH9)	20 μL	488	FL-1, IBP 527	40 μL in 200 μL PBS ⁻	488	500 - 550
Monoclonal Anti-human FOLR1-APC (gegen FR α , markiert mit Allophycocyanin)		R&D Systems (FAB5646 A)	650	660	10 μL	640	FL-6, IBP 675			

Reagenz (Konzentration)	Abkürzung	Hersteller	Anregung Ex. λ_{\max} (nm)	Emission Em. λ_{\max} (nm)	FACS eingesetztes Volumen (μL)	FACS Anregung, λ (nm)	FACS Detektion, FL, Filter, λ (nm)	CLSM eingesetztes Volumen (μL)	CLSM Anregung , λ (nm)	CLSM Detektion, λ (nm)
<u>Antikörper-Leukozyten (monoklonale Antikörper, Maus, anti-human)</u>										
eingesetzte Fluorophore										
Allophycocyanin	APC		650	660		640	FL-6, IBP 675		633	640 - 750
Alexa Fluor 647	Alexa 647		650	665		640	FL-6, IBP 675		633	640 - 750
PerCp	PerCp		490	675		488	FL-3, IBP 682		488	
PerCp-Cy5.5 (tandem dye)	PerCp- Cy5.5		490,675	695		488	FL-3, IBP 682		488	
CD3 APC, IgG1 κ		BD	650	660	5 $\mu\text{L} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ Blut	640	FL-6, IBP 675	5 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	633	640 - 750
CD3 PerCP, IgG1 κ		BD (345766)	650	660	20 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	488	FL-3, IBP 682	20 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	488	500 - 550
CD14 APC, IgG2a κ		BD	650	660	20 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	640	FL-6, IBP 675	20 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	633	640 - 750
CD14 PerCP, IgG2b κ		BD (345796)	490	675	20 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	488	FL-3, IBP 682	20 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	488	500 - 550
CD16 Alexa Fluor647, IgG1 κ		BD	650	665	5 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	640	FL-6, IBP 675	5 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	633	640 - 750
CD16 PerCP-Cy5.5, IgG1 κ		BD (5607171)	490,675	695	5 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	488	FL-3, IBP 682	5 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	488	500 - 550
CD19 APC, IgG1 κ		BD (345778)	650	660	5 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	640	FL-6, IBP 675	5 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	633	640 - 750
CD19 PerCP, IgG1 κ		BD (345778)	490	675	20 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	488	FL-3, IBP 682	20 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	488	500 - 550

Reagenz (Konzentration)	Abkürzung	Hersteller	Anregung Ex. λ_{\max} (nm)	Emission Em. λ_{\max} (nm)	FACS Eingesetztes Volumen (μL)	FACS Anregung, λ (nm)	FACS Detektion, FL, Filter, λ (nm)	CLSM eingesetztes Volumen (μL)	CLSM Anregung , λ (nm)	CLSM Detektion, λ (nm)
<u>Isotypenkontrollen</u>										
APC, IgG1 κ		Beckman coulter (IM24Z5)	650	660	5 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	640	FL-6, IBP 675	5 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	633	640 - 750
APC, IgG2a		BD (555576)	650	660	20 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	640	FL-6, IBP 675	20 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	633	640 - 750
Alexa Fluor 647, IgG1 κ		BD (557714)	650	665	5 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	640	FL-6, IBP 675	5 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	633	640 - 750
PerCP, IgG1 κ		BD (347221)	650	660	20 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	488	FL-3, IBP 682	20 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	488	500 - 550
PerCP-Cy5.5, IgG1 κ		BD (347221)	490,675	695	5 $\mu\text{L} \cdot 100^{-1} \mu\text{L}$ Blut	488	FL-3, IBP 682	5 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ Blut	488	500 - 550

IBP = Bandpassfilter

4. Resultate und Diskussion

4.1 Synthese und zelluläre Aufnahme von Poly(Styrol-co-Acrylsäure) und Poly(Styrol-co-2-Aminoethylmethacrylat)-Nanopartikeln

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme von Nanopartikeln mit einheitlichen Oberflächenladungen wurde eine Reihe von Polystyrol-Nanopartikeln mit dem direkten Miniemulsionsverfahren hergestellt^[20]. Wie von *Lorenz et al.*^[16] und *Dausend et al.*^[50] bereits beschrieben, zeigen sich durch die unterschiedlichen Funktionalisierungen Unterschiede in der zellulären Aufnahme. Durch die Funktionalisierung wird auch eine unterschiedliche Proteinadsorption auf der Nanopartikeloberfläche bei Inkubation in FCS-haltigem Zellkulturmedium erhalten. Durch folgende Zellkulturexperimente sollte deren intrazelluläres Aufnahmeverhalten in Abhängigkeit der positiven bzw. negativen Oberflächenladung der Nanopartikel, bedingt durch die Anzahl an funktionellen Gruppen, die durch das Comonomer eingeführt werden und des verwendeten Tensids, untersucht werden. Als Comonomere wurden Acrylsäure (AA) und 2-Aminoethylmethacrylat-HCl (AEMH) eingesetzt (Abb. 4.1).

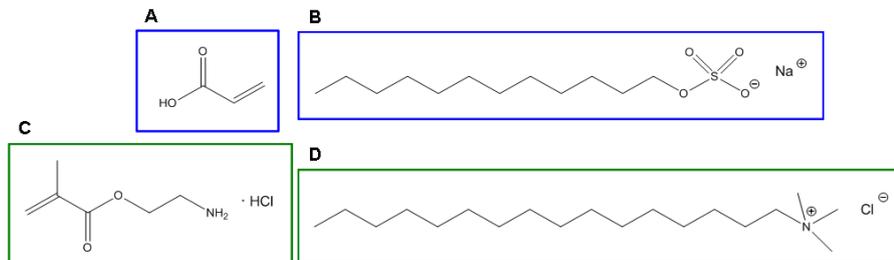


Abb. 4.1: Strukturformeln von Acrylsäure (A), Natriumdodecylsulfat (B), 2-Aminoethylmethacrylat-HCl (C) und Hexadecyltrimethylammoniumchlorid (D).

Die Comonomere wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zum Monomer eingesetzt (Gew.-%). Zur Synthese der carboxylfunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikel wurde SDS als anionisches Tensid verwendet, somit werden Nanopartikel mit einheitlich negativer Oberflächenladung hergestellt (Abb. 4.2).

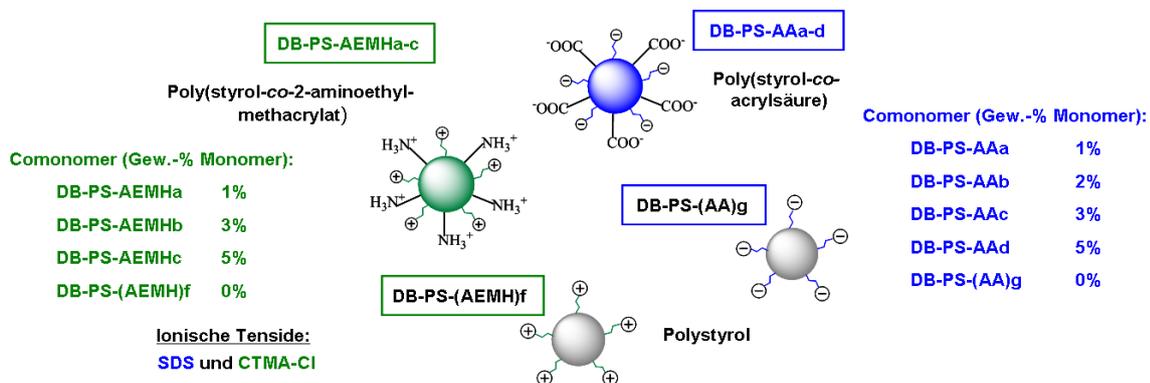


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der synthetisierten und in Zellkultur getesteten Polystyrol-Nanopartikel.

Zur Synthese der Polystyrol-Nanopartikel mit positiver Oberflächenladung wurde das kationische Tensid CTMA-Cl eingesetzt. Für weitere Details zur Synthese und den Eigenschaften der Nanopartikel der DB-PS-AA- und DB-PS-AEMH-Reihe siehe Abschnitt 3.1.1 und Tabelle 3.2.

4.1.1 Aufnahmen in HeLa- und Jurkat-Zellen

Die Nanopartikel (DB-PS-AA/-AEMH) wurden nach deren Dialyse für zelluläre Aufnahmeexperimente mit den erprobten Standardkonzentrationen von $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in FCS-haltigem DMEM für Inkubationszeiträume zwischen 1 und 24 h in HeLa-Zellen und in FCS-haltigem RPMI-Medium für Jurkat-Zellen durchgeführt^[16].

Alle getesteten funktionalisierten und unfunktionalisierten Nanopartikel erwiesen sich als nicht zytotoxisch bei durchflusszytometrischen Analysen nach 7-AAD-Färbung der Proben.

Über 85% der Zellen (sowohl HeLa, als auch Jurkat) sind nach 24 h noch lebend und maximal 10% apoptotisch. Eine Inkubationsdauer von 24 h gibt ausreichend Aufschluss über das zytotoxische Potential sowie das zelluläre Aufnahmeverhalten der Nanopartikel. Die zelluläre Aufnahme nimmt mit zunehmender Anzahl der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Nanopartikel zu, wie schon in vorausgehenden Experimenten gezeigt werden konnte^[16]. Die aminofunktionalisierten Nanopartikel (DB-PS-AEMHa-c) zeigen eine deutlich höhere relative Fluoreszenzintensität bei der durchflusszytometrischen Analyse, d.h. eine stärkere zelluläre Aufnahme als die carboxylfunktionalisierten Nanopartikel (DB-PS-AAa-d). Die unfunktionalisierten Nanopartikel (DB-PS-(AEMH)f und DB-PS-(AA)g), die als Vergleichsnanopartikel zu den funktionalisierten dienen, wurden mit dem entsprechenden ionischen Tensid gleicher Ladung synthetisiert (CTMA-Cl bzw. SDS). In Abb. 4.3 ist die zelluläre Aufnahme in HeLa- und Jurkat-Zellen der carboxylfunktionalisierten Nanopartikel DB-PS-AAa und DB-PS-AAc, sowie der aminofunktionalisierten Nanopartikel DB-PS-AEMHa und DB-PS-AEMHb, mit jeweils 1 bzw. 3 Gew.-% Comonomer (bezogen auf das Monomer), dargestellt. Die unfunktionalisierten Nanopartikel sind ebenfalls gezeigt.

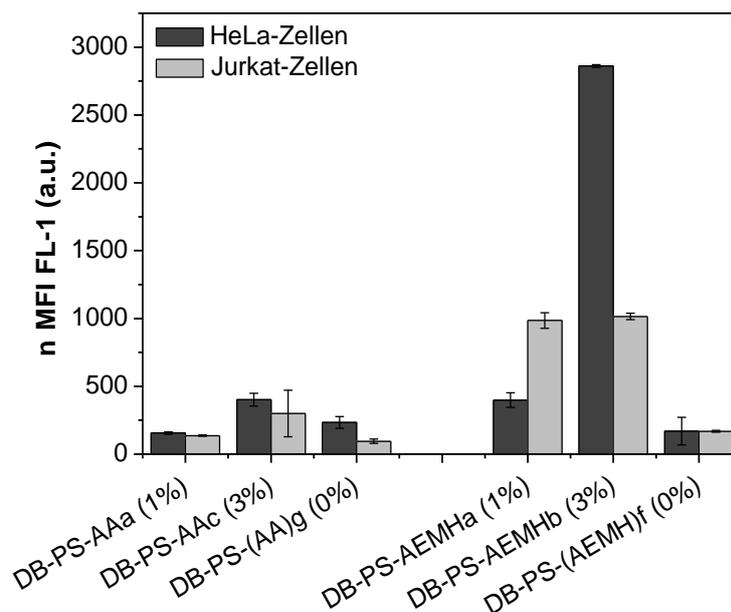


Abb. 4.3: Zelluläre Aufnahme der carboxyl- und aminofunktionalisierten, sowie der unfunktionalisierten Nanopartikel in HeLa-Zellen (dunkelgrau) und Jurkat-Zellen (hellgrau) nach 24-stündiger Inkubation. Der jeweilige Comonomergehalt (bezogen auf das Monomer) ist in Gew.-% in Klammern angegeben. Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ist normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachansätzen sind gezeigt.

Durch den Vergleich des zellulären Aufnahmeverhaltens der funktionalisierten und unfunktionalisierten Nanopartikel kann somit direkt auf den Einfluss der funktionellen Gruppen geschlossen werden. Jurkat-Zellen zeigten generell ein gutes Aufnahmeverhalten für diese Nanopartikel, aber insgesamt ein Schwächeres im Vergleich zu HeLa-Zellen; diese Beobachtungen wurden auch schon von Lorenz et al. beschrieben^[16]. Die intrazelluläre Lokalisation der Nanopartikel wurde durch CLSM-Aufnahmen bestätigt (Abb. 4.4).

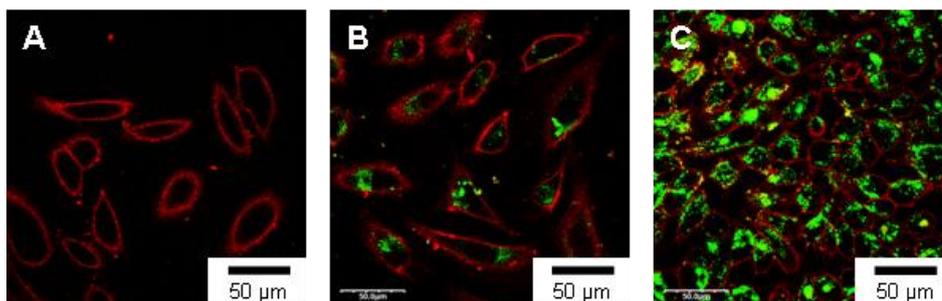


Abb. 4.4: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen ohne Nanopartikel (A), nach 24-stündiger Inkubation mit DB-PS-AAc (3 Gew.-% Comonomer) (B) und DB-PS-AEMHb (3 Gew.-% Comonomer) (C). Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask Orange), die Nanopartikel grün (PMI).

Aufgrund der starken zellulären Aufnahme und des geringen zytotoxischen Potentials wurden die Nanopartikel der DB-PS-AA- und DB-PS-AEMH-Reihe zur Etablierung des Analyseverfahrens von Leukozyten nach Nanopartikelinkubation (*ex vivo*) (siehe 4.2.1), sowie von Herrn Oliver Zupke zur Markierung von dendritischen Zellen (siehe 4.1.3), eingesetzt.

4.1.2 Einfluss von fötalem Kälberserum im Zellkulturmedium auf die zelluläre Aufnahme

Standardmäßig wird FCS meist in Konzentrationen von 5-20 Vol.-% den Zellkulturmedien zugesetzt (entspricht einem Gesamtproteingehalt von ca. $2-8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, vgl. 4.2). Durch die verschiedenen Funktionalisierungen der Nanopartikel und die dadurch bedingten Wechselwirkungen mit den Serumkomponenten, kann es zur Ausbildung einer Adsorptionsschicht von Plasmaproteinen kommen^[79].

In den in diesem Abschnitt beschriebenen Zellexperimenten wurde der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen an FCS im Zellkulturmedium auf die zelluläre Aufnahme der synthetisierten Nanopartikel in HeLa-Zellen untersucht. In Abb. 4.5 ist der Effekt von additivem FCS in Konzentrationen von 0, 2, 5, 10 und 20 Vol.-% in DMEM, bei einer 24-stündigen Inkubation von HeLa-Zellen mit DB-PS-AAAd und DB-PS-AEMHc (Comonomergehalt jeweils 5 Gew.-%, bezogen auf das Monomer) gezeigt.

Die Anzahl der funktionellen Gruppen beträgt für DB-PS-AAAd $0,45 \text{ nm}^{-2}$ und für DB-PS-AEMHc $0,58 \text{ nm}^{-2}$. Die funktionellen Gruppen sind somit in ähnlicher Anzahl auf diesen Nanopartikeln ähnlicher Größe vorhanden (Abb. 4.2). Die zellulären Aufnahmeraten in HeLa-Zellen sind in Abhängigkeit von unterschiedlichen FCS-Konzentrationen in Abb. 4.5 dargestellt.

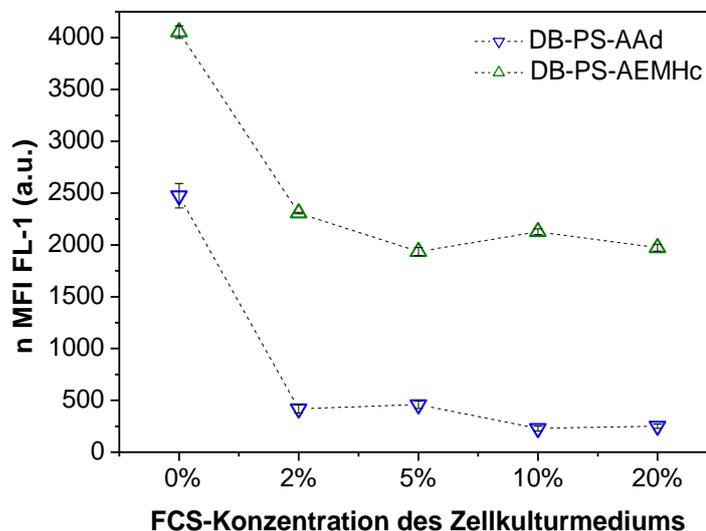


Abb. 4.5: Zelluläre Aufnahme von carboxylfunktionalisiertem (DB-PS-AAAd) und aminofunktionalisiertem Nanopartikel (DB-PS-AEMHc) in HeLa-Zellen nach 24 h in Abhängigkeit von unterschiedlichen FCS-Konzentrationen (Vol.-%) im Zellkulturmedium (DMEM). Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ist normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachansätzen sind gezeigt.

Der Verlauf der beiden Kurven in Abb. 4.5 ist annähernd parallel. Bei FCS-Konzentrationen von 5 bis 20 Vol.-% sind keine Unterschiede zu beobachten; die Relationen der beiden zu analysierenden Nanopartikel bleiben gleich. Erst bei Konzentrationen von 2 Vol.-% FCS (entspricht einem Gesamtproteingehalt von ca. $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) wird der Einfluss der im Medium enthaltenen Serumproteine erkennbar geringer und die zelluläre Nanopartikelaufnahme steigt deutlich an. Die Zunahme der gemessenen Fluoreszenzintensität bei einer Abnahme der FCS-Konzentration von 2 auf 0% im Medium beträgt für den carboxylfunktionalisierten Nanopartikel rund das Vierfache, für den aminofunktionalisierten Nanopartikel in etwa das Doppelte. Hier wird der Einfluss der entsprechenden Funktionalisierung deutlich. Durch CLSM-Aufnahmen wurde die intrazelluläre Lokalisation der Nanopartikel bestätigt. Hier sei noch erwähnt, dass eine Kultivierung der Zellen mit reduzierten FCS-Konzentrationen zu einer Veränderung des Zellstoffwechsels führt und dies letztendlich zu einer Beeinflussung der Nanopartikelaufnahme führen kann. HeLa-Zellen wiesen bei diesen Experimenten nach einer 24-stündigen Inkubation ohne FCS keine lichtmikroskopisch sichtbaren Beeinträchtigungen auf und zeigten keine gravierenden Zellvitalitätseinbußen (über 80% lebende Zellen nach 7-AAD-Färbung).

Weitere Zellaufnahmeexperimente mit Nanopartikeln unterschiedlicher Funktionalisierung und deren Wechselwirkungen mit BSA bei Inkubation in FCS-freien und FCS-haltigen Zellkulturmedium werden in Abschnitt 4.3 beschrieben.

4.1.3 Markierung von dendritischen Zellen

In folgendem Abschnitt wird auf die Experimente zur Markierung von dendritischen Zellen (DC) hingewiesen, die Herr Oliver Zupke (Universitätsmedizin Mainz III., Hämatologie, Onkologie und Pneumologie) mit den im Verlaufe dieser Dissertation synthetisierten Nanopartikeln durchgeführt hat.

Fluoreszierende Nanopartikel haben das Potential Zellen zu markieren, die zur gezielten Immuntherapie verabreicht werden und diese dann im Körper (*in vivo*) detektierbar zu machen. Eine solche Markierung darf weder die Zellen in ihrer Viabilität noch in ihrer Stoffwechselfunktion beeinträchtigen. Tumore können schwerwiegende Dysfunktionen der DC verursachen^[267]. Für einen therapeutischen Einsatz von immunstimulatorischen DCs oder Immun-Effektor-Zellen wie CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten, als „Zellimpfung“ müssen noch weitere Erkenntnisse zu deren Migrationsverhalten und Interaktionen mit anderen

Immunzellen gewonnen werden^[268]. Polystyrol ist gut geeignet, weil es intrazellulär nicht abgebaut wird, nicht mit anderen Molekülen reagiert und nicht toxisch ist.

Für die gezielte Markierung von aus Monozyten generierten, unreifen dendritischen Zellen (iDC) wurden von Herrn Oliver Zupke der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel DB-PS-AA_d und der aminofunktionalisierte Nanopartikel DB-PS-AEMH_c, sowie die unfunktionalisierten Referenznanopartikel DB-PS-(AA)_g und DB-PS-(AEMH)_f wegen ihrer sehr geringen Zytotoxizität und guter zellulärer Aufnahme (vgl. Experimente mit HeLa-Zellen 4.1.1) ausgewählt. Als Ziel dieses Projektes sollte eine möglichst gute Markierung der DCs mit diesen Nanopartikeln erreicht werden, ohne die Viabilität der markierten Zellen zu beeinflussen und ohne deren Funktion als professionelle antigenpräsentierende Zellen negativ zu beeinflussen.

Die Quantifizierung der zellulären Aufnahme wurde durchflusszytometrisch zuerst nach einer Inkubationszeit von 16 h ermittelt. Die Verwendung von DB-PS-AA_d führte im Vergleich zu dem unfunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikel DB-PS-(AA)_g zu keiner Steigerung der zellulären Aufnahme bzw. Markierung der iDC, wohingegen der aminofunktionalisierte Nanopartikel DB-PS-AEMH_c im Vergleich zu dessen unfunktionalisiertem Styrol-Nanopartikel (DB-PS-(AA)_f) eine Steigerung der zellulären Aufnahme um das Vierfache zeigte. Für alle weiterführenden Markierungs-Experimente wurde deshalb DB-PS-AEMH_c verwendet. In den folgenden Experimenten wurde die Konzentration und der Einfluss von unterschiedlichen Inkubationszeiten in Zusammenhang mit der Markierung von iDC untersucht und optimiert. Auf diese Weise konnte die maximale zelluläre Aufnahme bei gleichzeitig möglichst geringen zytotoxischen Effekten bestimmt werden. Die Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden mit einer 7-AAD-Färbung durchgeführt. Die intrazelluläre Lokalisation der Nanopartikel wurde mit CLSM-Aufnahmen bestätigt (Abb. 4.6).

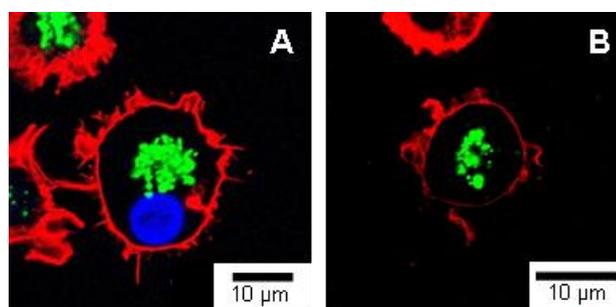


Abb. 4.6: CLSM-Aufnahmen (Oliver Zupke) einer reifen dendritischen Zelle (mDC) mit intrazellulären aminofunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln (DB-PS-AEMH_c) nach einer Inkubationszeit von 16 h. Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask Orange), die Nanopartikel in grün (PMI). Der Zellkern ist in (A) mit Hoechst angefärbt und blau dargestellt.

Ein Verbleib oder Anhaften der Nanopartikel auf der Zelloberfläche war nicht zu beobachten (Abb. 4.6). Zelluläre Aufnahmekinetiken belegten, dass mDC auch nach 8 Tagen immer noch ausreichend durch DB-PS-AEMHc markiert sind. Dies stellt für mögliche *in vivo*-Experimente eine weitere wichtige Eigenschaft dar.

Des Weiteren wurde der Einfluss der zellulären Nanopartikelaufnahme auf die phänotypische Erscheinung und die Zellfunktionen der reifen dendritischen Zellen (mDC) untersucht. Durchflusszytometrische Analysen zur Expression von unterschiedlichen Reife-, Homing- und Costimulatorischen-Molekülen wurden ebenfalls durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Einflüsse durch dieses Markierungsprotokoll auf den Phänotyp der DCs beobachtet werden. Ein möglicher negativer Einfluss des Nanopartikels auf immunstimulatorische Funktionen sowie auf die Antigenprozessierung und -präsentation der mDCs konnte auf Basis von allogenen gemischten Lymphozytenreaktionen (engl. *allogeneic mixed lymphocyte reaction*, allo-MLR) und Interferon- γ -ELISPOT-Assays ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es Herrn Oliver Zupke gelungen ist, ein Protokoll zur Markierung von iDC mit dem in dieser Arbeit synthetisierten aminofunktionalisierten Nanopartikel DB-PS-AEMHc zu entwickeln, das keinen signifikant negativen Einfluss auf die phänotypischen Eigenschaften und die Funktion der mDC als antigenpräsentierende Zellen hat^[19]. Durch die Aminofunktionalisierung der Nanopartikel ist eine, für diesen Einsatz notwendige, starke zelluläre Aufnahme gegeben, die eine Detektion der markierten Zellen in *in vivo*-Experimenten ermöglicht. Des Weiteren ist die sehr geringe Langzeittoxizität des Nanopartikels für eine erfolgreiche Verwendung ausschlaggebend.

4.2 Zelluläre Aufnahme von ionisch stabilisierten, funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln in Leukozyten in peripherem Vollblut

Der Blutstrom dient als physiologisches Transportsystem für Nähr- und Botenstoffe. Alle bisher zugelassenen nanopartikulären Wirkstofftransportsysteme (z.B. Abraxane[®]^[269]) werden intravenös appliziert, da dies die effektivste Darreichungsform darstellt und dabei weitere physiologische Barrieren beispielsweise von Schleimhäuten umgangen werden können (siehe 2.1.3.3). Nach intravenöser Applikation der Nanopartikel interagieren diese mit einem komplexen System aus Plasmaproteinen (siehe 2.1.6), diversen Blutzellen und organische Substanzen, wie beispielsweise Aminosäuren und Fettsäuren. Die Ausbildung einer Proteinkorona kann zur Stabilisierung der Nanopartikel führen^[113], aber auch zu Agglomeratbildungen, wie es für superparamagnetische Eisen-Nanopartikel (engl. *super*

paramagnetic iron oxide, SPIO) in FCS-haltigem Zellkulturmedium beobachtet wurde^[270]. Die Nanopartikel erhalten somit ein neues „Erscheinungsbild“, mit dem Blut- und Endothelzellen^[271], welche die Blutgefäße auskleiden, konfrontiert werden^[8]. Die Nanopartikel interagieren mit diesen diversen Zelltypen; unter anderem werden die Nanopartikel auf den Zellen adhären^[271] oder intrazellulär aufgenommen.

Eine große Anzahl an Studien beschäftigten sich mit der Interaktion von Serum-^[271-272] oder Plasmaproteinen^[273-274] und Nanopartikeln. Im Blutplasma sind im Gegensatz zum Serum noch Fibrinogen und alle weiteren Gerinnungsfaktoren enthalten. Somit sind Adsorptionsexperimente mit Blutplasma näher an *in vivo*-Situationen, allerdings ist hierbei der Einsatz von Antikoagulanzen notwendig. Meist wird Citrat-Plasma für diese Versuchsreihen eingesetzt^[273-275]. Weiterführende Studien sind in diesem Bereich notwendig, um die Proteine der dynamischen Adsorptionsschichten auf den diversen Oberflächen besser zu quanti- und qualifizieren.

Es gibt eine große Anzahl von Veröffentlichungen, die sich mit der zellulären Aufnahme von Nanopartikeln in diverse immortalisierte, malignen Blut-Zelllinien beschäftigen (*in vitro*), wie beispielsweise RAW 264.7 (eine Makrophagen-ähnliche Zelllinie der leukämischen Maus)^[207] oder THP-1 Zellen (aus humanen leukämischen Monozyten)^[210]. Solche Zellen können von primären Zellen hinsichtlich ihres zellulären Aufnahmeverhaltens oder der Expression von Rezeptoren abweichen^[210].

Des Weiteren werden Leukozyten und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) durch Leukapherese^[205, 232] bzw. durch Dichtegradientenzentrifugation von Vollblutproben oder Buffy-Coats^[210] isoliert und anschließend kultiviert und mit Nanopartikeln inkubiert. Zur Isolation der Leukozyten wird beispielsweise mit Heparin antikoaguliertes Blut verwendet^[54].

Es gibt, soweit bekannt, keine Veröffentlichungen, die sich mit der zellulären Aufnahme von Nanopartikeln in Leukozyten in peripherem Vollblut in einer Art *ex vivo*-Assay beschäftigen. Das Verhalten von Nanopartikeln in *in vitro* Experimenten mit einzelnen Zelllinien kann nicht verglichen werden mit einer *in vivo*-Situation, bei der alle biologischen Komponenten gegenwärtig sind. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Analysemethode entwickelt (*ex vivo*), um möglichst realistische Inkubationsbedingungen von Nanopartikeln mit allen zellulären und azellulären Komponenten des peripheren Vollblutes zu schaffen und deren zelluläre Aufnahme in ausgewählte Leukozyten zu detektieren.

Werden die Unterschiede zwischen *in vitro*-Zellkulturexperimenten und Experimenten in peripherem Vollblut (*ex vivo*) betrachtet, so sind folgende Faktoren relevant:

1. Einfluss der umgebenden Proteine

In Zellkulturexperimenten (*in vitro*) werden meist Zellkulturmedien, die mit fötalem Kälberserum (FCS) - meist in Konzentration von 10 Vol.-% - supplementiert werden, eingesetzt. Der Gesamtproteingehalt von FCS beträgt ca. $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Der Gesamtproteingehalt in FCS-supplementiertem Zellkulturmedium (mit 10 Vol.-%) beträgt ca. $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Das humane Blut enthält *in vivo* ca. $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Plasmaproteine, inklusive Fibrinogen und weiteren Gerinnungsfaktoren, die in Serum nicht mehr enthalten sind. Dies stellt sowohl einen bedeutenden quantitativen als auch einen qualitativen Unterschied dar. Hinzu kommt, dass bei der Gewinnung des Serums die Gerinnungskaskade aktiviert wird und infolgedessen Thrombozyten aktiviert werden und ihre Granula in das Serum entleeren (siehe 2.1.4.1 b.)). Des Weiteren ist das Immunsystem der Rinderföten noch nicht ausgeprägt und in Kontakt mit Antigenen gekommen, es fehlen daher Antikörper, die im Blutstrom eines gesunden, immunkompetenten Säugetiers vorliegen und ebenfalls auf Nanopartikeln adsorbieren können (siehe 2.1.6). Deswegen stellt Blutplasma oder Vollblut, bei dem die Gerinnungskaskade nur inhibiert wurde, ein adäquateres Milieu für Zellversuche mit Nanopartikeln dar.

2. Konkurrierende zelluläre Aufnahme

Im Gegensatz zu *in vitro*-Zellkulturexperimenten enthält das Blut viele unterschiedliche Zelltypen, die parallel getestet werden können. Die zelluläre Aufnahme erfolgt simultan bzw. kompetitiv in alle vorliegenden Zelltypen. So ist eine quantitative zelluläre Aufnahme vergleichend in Bezug auf die vorliegenden Nanopartikelkonzentrationen zu betrachten. Dies ist bei isolierten Zellarten in Monokulturen *in vitro* nicht möglich.

3. Stoffwechsel

Die Blutzellen weisen ein natürliches (physiologisches) Stoffwechselverhalten auf im Gegensatz zu Zellkulturexperimenten mit malignen, immortalisierten Zelllinien, die durch ihrer Entartung ein abnormes Verhalten in Bezug auf die Nanopartikelaufnahme und -interaktionen vorweisen können. Auch das Kultivieren von isolierten PBMC (siehe oben) findet mit Zellkulturmedien statt und nicht im biologischen Milieu.

Die Unterschiede zwischen einem *in vivo*-Tierexperiment und einem Experiment in peripherem Vollblut (*ex vivo*) bestehen darin, dass die Parameter, die zeitgleich in Tier-

experimenten *in vivo* getestet werden können (Testung *einer* bestimmten Konzentration für *eine* bestimmte Zeit mit *einem* Versuchstier), limitiert sind. Die Komplexität der Tierhaltung und –behandlung, sowie nachfolgende Zell- und Gewebeanalysen sind sehr aufwendig und von diversen Faktoren abhängig und beeinflussbar. Eine Wiederholung der Experimente unter exakt gleichen Bedingungen ist schwierig und nicht uneingeschränkt möglich. Die Durchführung und Reproduzierung von Zellkulturexperimenten *in vitro* sind leichter möglich.

Das vorliegende Testverfahren ist etabliert worden, um die Lücke zwischen *in vitro*-Zellkulturexperimenten an immortalisierten, malignen Zelllinien und *in vivo*-Tierversuchen zu schließen. Ein Inkubationsexperiment in Vollblut ist sehr nahe an den physiologischen Interaktionen von Nanopartikeln mit primären Blutzellen *in vivo*.

4.2.1 Etablierung des Analyseverfahrens

4.2.1.1 Beschreibung des Testsystems

Es gilt Nanopartikel als Wirkstofftransportsysteme zu entwickeln, die entweder gezielt bestimmte Leukozyten adressieren oder eine ausreichend lange Zirkulationsdauer im Blutstrom aufweisen, um das Zielgewebe zu erreichen bevor diese von phagozytierenden Leukozyten internalisiert werden (siehe 2.1.5.2).

Die in diesen Experimenten eingesetzten Polystyrol-Nanopartikel werden hinsichtlich ihrer Oberflächenfunktionalisierungen für eine solche Eignung untersucht. Unsere Arbeitsgruppe hat neben anderen schon erfolgreich gezeigt, dass die Variation von Oberflächenladungen, funktionellen Gruppen und der Dichte der funktionellen Gruppen sowie der verwendeten Monomere dazu dienen können, unterschiedliche Zelllinien zu markieren und somit bedingt durch ihr unterschiedliches Aufnahmeverhalten zu differenzieren^[16, 19, 91]. Die nach diesem Verfahren hergestellten Polystyrol-Nanopartikel zeigten bisher in Zellkultur keine bzw. sehr geringe zelltoxischen Eigenschaften^[16].

Es wurden Polystyrol-Nanopartikel eines einheitlichen Größenbereiches um 100-124 nm ausgewählt (Abb. 4.7). Die eingesetzten Nanopartikel besitzen keine proteinabweisenden PEG-Einheiten. Außerdem sind sie möglichst klein, eine Eigenschaft, die erforderlich ist, um bei intravenöser Applikation keine Embolien auszulösen. Der Größenbereich ist aber so gewählt, dass sie noch phagozytiert werden können (siehe 2.1.2.1 b.)).

Zur Synthese der carboxylfunktionalisierten Nanopartikel wurde SDS, für die aminofunktionalisierten Nanopartikel CTMA-Cl verwendet, um Nanopartikel mit einheitlichen Oberflächenladungen zu erhalten (entsprechend Abb. 4.1). Ebenso wurden unfunktionalisierte Nanopartikel als Kontrollnanopartikel synthetisiert mit den entsprechenden ionischen Tensiden SDS bzw. CTMA-Cl, um den Einfluss der Funktionalisierung durch die Comonomere AA und AEMH auf die zelluläre Aufnahmeverhalten zu bestimmen, wie es bereits auch in anderen Publikation gezeigt wurde^[276].

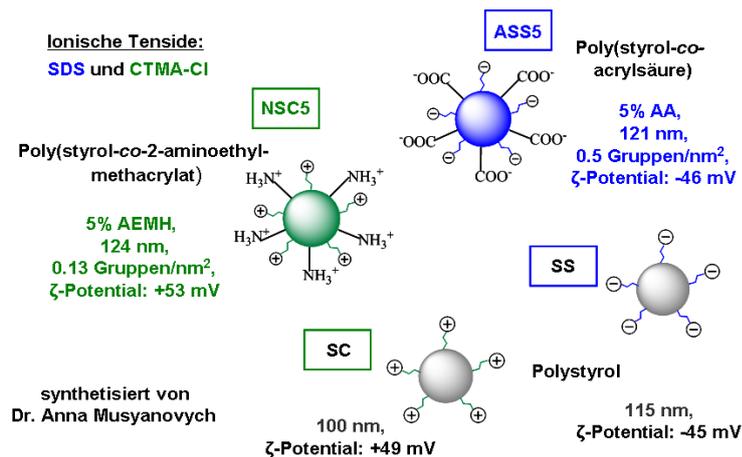


Abb. 4.7: Graphische Darstellung der Nanopartikel, die für die ladungsspezifische Aufnahme in Leukozyten aus peripherem Vollblut eingesetzt wurden. Die Charakteristika des aminofunktionalisierten (NSC5) und der carboxylfunktionalisierten Nanopartikels ASS5 (jeweils mit 5 Gew.-% Comonomer in Bezug auf Styrol), sowie die der beiden unfunktionalisierten Nanopartikel SC und SS sind gezeigt.

Die Experimente wurden mit Nanopartikeln, die von Frau Dr. Anna Musyanovych synthetisiert wurden, durchgeführt. Die funktionalisierten Nanopartikel haben einen Comonomergehalt von 5 Gew.-%. (Abb. 4.7 bzw. Tabelle 3.3).

Zur Etablierung des Analyseverfahrens wurden Nanopartikel aus der DB-Reihe (Abb. 4.2 bzw. Tabelle 3.2) mit unterschiedlichem Comonomergehalt eingesetzt. Diese Etablierung wird im folgenden Abschnitt beschrieben. Für die Experimente in peripherem Vollblut wurden $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ als Standardkonzentration für die Nanopartikelzugabe gewählt, dabei ergaben sich gut analysierbare und reproduzierbare Ergebnisse. Bei *in vitro*-Zellkultur-experimenten werden standardmäßig $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nanopartikel zu $2\cdot 10^5$ ausgesäten Zellen zugegeben^[16]. Dieses Verhältnis würde einer Konzentration von $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bei ca. $8\cdot 10^6$ Leukozyten $\cdot\text{mL}^{-1}$ bei Erwachsenen entsprechen. Diese Konzentration ist somit 10-fach geringer als bei *in vitro*-Zellkulturexperimenten und liegt im Bereich von *in vivo*-Tier-versuchen mit Mäusen (vgl. 4.2.3.3). Analysenergebnisse von Inkubationsexperimenten mit geringeren und höheren Nanopartikel-Konzentrationen werden in den Abschnitten 4.2.3.3 und 4.2.2.5 gezeigt.

4.2.1.2 Etablierung des Testsystems

Bei der Etablierung des Testsystems wurde zur Entnahme des peripheren Blutes ausschließlich mit K₃EDTA antikoaguliertes Blut verwendet, das für klinische Routineuntersuchungen eingesetzt wird. Zuerst wurde versucht, bestimmte Leukozytengruppen im FSC/SSC auszuwählen (vgl. Abb. 4.8) und somit die entsprechende Nanopartikelaufnahme der jeweiligen Leukozytengruppe zu detektieren. Es wurden carboxylfunktionalisierte Nanopartikel mit 1, 2, 3, und 5 Gew.-% Comonomer verwendet (DB-PS-AAa bis d), sowie der unfunktionalisierte Polystyrol-Nanopartikel DB-PS-(AA)g. Testversuche mit aminofunktionalisierten Nanopartikeln wurden mit DB-PS-AEMHa (1 Gew.-%), DB-PS-AEMHb (3 Gew.-%) und DB-PS-AEMHc (5 Gew.-%) durchgeführt, sowie mit dem unfunktionalisierten Nanopartikel DB-PS-(AEMH)f. Sowohl die carboxylfunktionalisierten als auch die aminofunktionalisierten Nanopartikel zeigen mit zunehmendem Anteil an Comonomer eine stärkere Aufnahme in Lymphozyten-, Monozyten- und Granulozyten-Populationen. Monozyten zeigen die stärkste Aufnahme nach 8 h. Diese Proben sollten aber nur erste Hinweise in Bezug auf die Etablierung des Testsystems geben.

Des Weiteren wurden diverse Versuchsreihen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten zwischen 4 und 24 h durchgeführt. Es zeigte sich, dass vor allem bei den Monozyten die detektierte Anzahl deutlich abnimmt und deswegen Inkubationszeiten > 8 h nicht sinnvoll erscheinen. Diese Reduktion kann auf ein Adhärenzen der Monozyten an den Wänden des Entnahmeröhrchens zurückzuführen sein. Die Adhäsion wird allerdings bestmöglich durch permanentes Bewegen der Proben auf dem Blutröhrchen-Roller verhindert.

4.2.1.3 Lebensdauer der Leukozyten außerhalb des Körpers

Die Lebensdauer der zur Analyse eingesetzten Leukozyten in physiologischer Umgebung wird in Abschnitt 2.1.5.2 beschrieben.

Die Viabilität von Leukozyten ist in EDTA- und Heparin-antikoagulierten Proben für 24 h gegeben, lediglich die Viabilität der Leukozyten kann in EDTA-Proben abnehmen^[277]. Durch Leukapherese gewonnene Leukozytenkonzentrate können bei einer Lagerung von 20 bis 24 °C noch 2-4 h später appliziert werden, dennoch erhält der Empfänger die Transfusion meist direkt nach der Spende^[278]. Die World Health Organization (WHO) hat als Antikoagulans für differenzierte Zellzählungen von Leukozyten EDTA neben Citrat empfohlen. Für die Verwendung von Heparin wurde keine Empfehlung, aber auch keine Einschränkungen genannt^[223]. Die durchschnittliche Lebensdauer der Leukozyten kann nicht zu einer deutlichen Reduzierung der Zellzahl während der Nanopartikelinkubation führen. Auch die von der

WHO (engl. *World Health Organisation*) angegebene durchschnittliche Stabilität der Leukozyten in Blutproben bei Raumtemperatur (RT) liegt, für die in dieser Arbeit zu analysierenden Leukozyten, durchschnittlich bei mindestens 7 h^[223] (Angaben beziehen sich auf die Qualität der Zellen, die für die differenzierte Zellzählung notwendig ist).

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurde eine Obergrenze der Inkubationsdauer mit Nanopartikeln von 8 h festgelegt, um von keiner größeren Beeinträchtigung der physiologischen Aktivität der Leukozyten in den Blutentnahmeröhrchen bei RT auszugehen.

Theoretische Ausführungen zu den Antikoagulanzen werden in Abschnitt 2.1.4.2 beschrieben und in den Abschnitten 4.2.2.1 und 4.2.2.5 weiterführend mit den Versuchsergebnissen diskutiert.

4.2.1.4 Markierung der Leukozytenpopulationen mit spezifischen Antikörpern

Eine genauere Definition der Leukozyten (vgl. 2.1.5.1) ist durch eine Markierung der Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern möglich (Abb. 4.8).

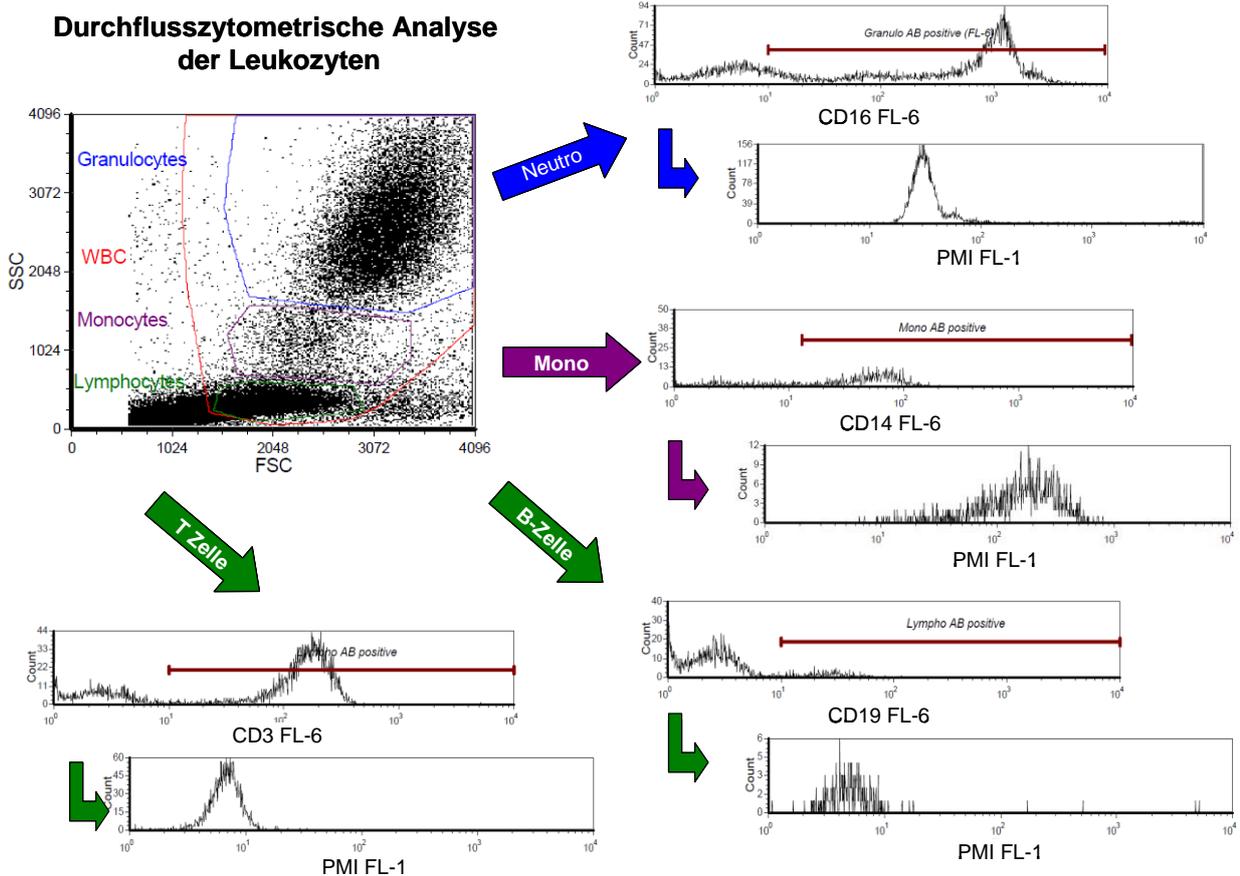


Abb. 4.8: Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von Antikörper-positiven Leukozytengruppen (CD3+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen, CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophile). Zuerst wird die entsprechende Leukozytengruppe im FSC/SSC Dot-Plot ausgewählt und anschließend in Histogrammen der Antikörper-markierten Zellen (FL-6) die quantitative Nanopartikelaufnahme (FL-1) bestimmt.

Die Fluoreszenzfarbstoffe Allophycocyanin (APC) bzw. AlexaFluor 647 werden im FL-6 detektiert. Die CD3-positiven T-Lymphozyten (CD3⁺ T-Zellen), CD19-positiven B-Lymphozyten (CD19⁺ B-Zellen), CD14-positiven Monozyten (CD14⁺ Mono) und CD16-positiven neutrophilen Granulozyten (CD16⁺ Neutro) wurden selektiert, um mit dem in Abb. 4.8 dargestellten durchflusszytometrischen Analyseverfahren, die quantitative Nanopartikelaufnahme der entsprechenden Leukozytenfraktionen zu bestimmen.

Die Antikörper-markierte Probe wird zuerst im FSC/SSC Dot-Plot (Punktediagramm) dargestellt und die entsprechende Population (Lymphozyten, Monozyten oder neutrophilen Granulozyten) ausgewählt. Diese Auswahl („Gating“) verhindert eine fälschliche Analyse von CD16⁺ Monozyten, die ebenfalls mitangefärbt werden. Eine gute Trennung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten-Populationen im FSC/SSC ist dafür zwingend notwendig. Die ausgewählte Zellfraktion ist zunächst in einem Histogramm (FL-6) dargestellt und die Antikörper-markierten Zellen werden mit einem Marker ausgewählt (brauner Balken). In einem neuen Histogramm (FL-1) werden dann diese Antikörper-positiven Zellen dargestellt, die eine Fluoreszenz, bedingt durch die Nanopartikel (PMI), aufweisen. Hieraus wird der Median oder das arithmetische Mittel der Fluoreszenzintensität gemessen, der Aufschluss über die quantitative Nanopartikelaufnahme der entsprechenden Zellfraktion gibt.

Diese Darstellung in Abb. 4.9 wurde gewählt, um den Unterschied zwischen arithmetischem Mittel und Median der Fluoreszenzintensität zu zeigen. Dieser Unterschied ist häufig bei den analysierten Zellpopulationen zu beobachten. Der Median stellt die verlässlicheren Werte zur Darstellung der quantitativen Analyse dar, da hohe Fluoreszenzintensitätswerte, die durch starke intrazelluläre Aufnahmen einiger weniger Zellen oder durch Agglomerationen der Nanopartikel auf den Zellmembranen verursacht sein können, nicht so stark gewichtet werden. Der Median wurde aufgrund dessen im Folgenden zur Analyse der Fluoreszenzintensität ausgewählt.

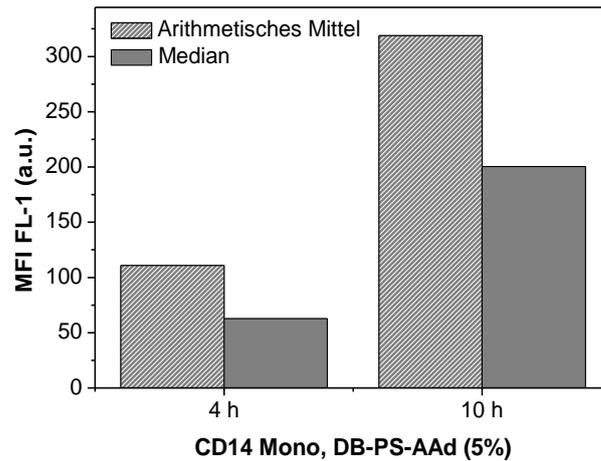


Abb. 4.9: Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Aufnahme von DB-PS-AAAd (5 Gew.-% Comonomer) in CD14+ Monozyten nach 4 und 10 h. Dargestellt ist das arithmetische Mittel und der Median der Fluoreszenzintensität. Daten der Einfachansätze sind nicht normiert.

Abschließend wurde mit entsprechenden Isotypkontrollen der eingesetzten Antikörper nachgewiesen, dass die gewählten Antikörperfärbungen spezifisch sind (Abb. 4.10).

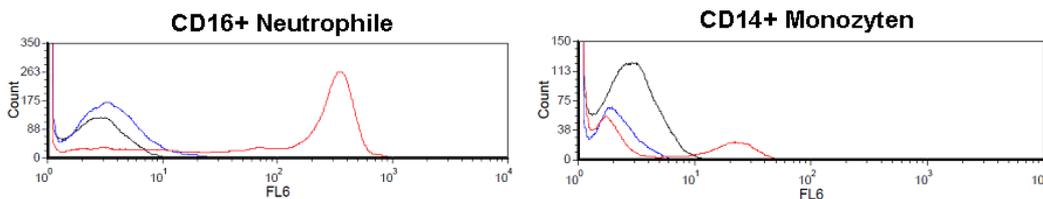


Abb. 4.10: Histogramme (FL-6) der durchflusszytometrischen Analyse der Antikörper (rot) CD14 APC und CD16 AlexaFluor647 im Vergleich zu der entsprechenden Isotypkontrolle (blau) und der Negativ-Kontrolle (schwarz).

Die in Abb. 4.10 dargestellten Antikörperfärbungen von CD16+ Neutrophilen und CD14+ Monozyten zeigen eine spezifische Antikörperfärbung. Ebenso wurde eine spezifische Antikörperfärbung für CD3+ und CD19+ T- und B-Lymphozyten erprobt (nicht dargestellt).

Die Durchführung ausgehend von der Blutentnahme über die Nanopartikelinkubation, Antikörperfärbung und Lyse der Erythrozyten bis hin zu Präparation der Proben ist in Abschnitt 3.1.8 ausführlich beschrieben. Es wurden in den einzelnen Experimenten jeweils Einfachansätze vermessen, um eine zeitgleiche Messung aller Leukozytenpopulationen zu zwei Zeitpunkten aus demselben Blutentnahmeröhrchen (Inkubationsvolumen 1 mL) zu ermöglichen (benötigtes Probenvolumen für Einfachmessung 100 μ L). Die Experimente wurden aber als Gesamtansatz mehrfach wiederholt (mind. 3-fach).

Aus den Testreihen zur Etablierung des Versuchssystems lässt sich zusammenfassen, dass die entwickelte Analysemethode mit „FSC/SSC-Gating“ und Antikörperfärbung der Leukozytengruppen zuverlässig und reproduzierbar ist. CD14⁺ Monozyten zeigen die stärkste Zellaufnahme, gefolgt von CD16⁺ neutrophilen Granulozyten und CD19⁺ B- und CD3⁺ T-Lymphozyten. Oberflächenfunktionalisierungen der Nanopartikel führen zu einer stärkeren zellulären Aufnahme bei CD14⁺ Monozyten und CD16⁺ neutrophilen Granulozyten.

4.2.2 Aufnahme in CD3⁺, CD14⁺, CD16⁺ und CD19⁺ Leukozyten

Für die folgenden Experimente wurden die in Abb. 4.7 dargestellten Nanopartikel, (synthetisiert von Frau Dr. Anna Musyanovych) mit einheitlichen Oberflächenladungen, bedingt durch Comonomer (5 Gew.-%) und Tensid, verwendet.

4.2.2.1 Einfluss des Antikoagulanses auf die zelluläre Nanopartikelaufnahme

In dem entwickelten System erfolgen die zellulären Aufnahmen von Nanopartikeln in verschiedene Zelltypen in unverdünntem peripherem Vollblut simultan. Die Inkubation mit Nanopartikeln wird in dem komplexen Vollblutmilieu durchgeführt. Hierzu ist keine weitere Manipulation während der Nanopartikelinkubation nötig. Die Lyse der Erythrozyten und die Antikörperfärbung erfolgt erst nach Ablauf der Inkubationszeit der Nanopartikel. Der einzige Eingriff während des gesamten Experimentablaufes ist die Verhinderung des Blutgerinnungsprozesses durch Antikoagulanzen.

In den nachfolgenden Experimenten erfolgte dies entweder durch Komplexierung von Calcium durch K₃EDTA bzw. Na₃Citrat oder durch Li-Heparin (siehe 2.1.4.2). Es ist literaturbekannt, dass EDTA-Salze eine gewisse hyperosmolare Wirkung auf Leukozyten haben, und zu einem Schrumpfen der Leukozyten führen^[279-280]. Des Weiteren wird diskutiert, dass EDTA, Citrat und Heparin aktivierende Effekte auf Thrombozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten haben. Bei EDTA ist dieser Effekt am schwächsten ausgeprägt^[281]. Die Konzentrationen von Thrombozytenfaktor 4 (vgl. Abb. 2.8), der aus den α -Granula der Thrombozyten freigesetzt wird, ist bei Heparin-antikoagulierten Blutproben am höchsten^[281].

Im folgenden Abschnitt werden Experimentreihen zur zellulären Aufnahme der Nanopartikel beschrieben, die das zelluläre Aufnahmeverhalten in Abhängigkeit des jeweiligen zugesetzten Antikoagulanses untersuchen. Wie in Abb. 4.11 (A) zu sehen ist, zeigen Monozyten eine

Abnahme der zellulären Aufnahme des Nanopartikels ASS5, wenn die Calcium-komplexierenden Agenzien K_3EDTA und $Na_3Citrat$ eingesetzt werden im Vergleich zu Proben, die mit Li-Heparin antikoaguliert werden (Hinweis: die Y-Achse in Abb. 4.11 (A) ist unterbrochen). Monozyten zeigten im Vergleich dazu eine schwächere zelluläre Aufnahme bei der Inkubation mit dem aminofunktionalisierten Nanopartikel NSC5, wobei aber der Abfall der nanopartikulären Zellaufnahme hier deutlich stärker ausgeprägt ist bei der Verwendung von K_3EDTA und $Na_3Citrat$.

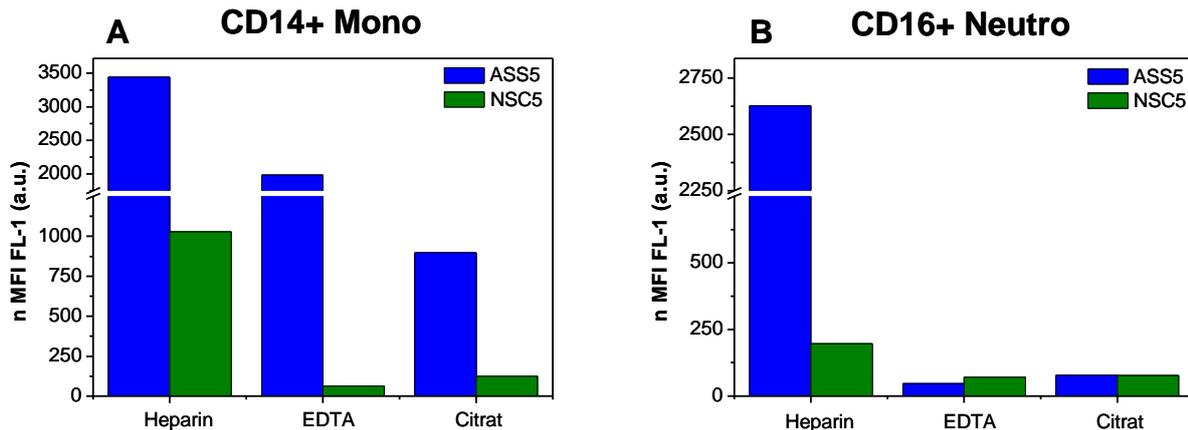


Abb. 4.11: Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Aufnahme von ASS5 (blau) und NSC5 (grün) in CD14+ Monozyten (A) und CD16+ Neutrophilen (B) nach 8 h. Versuchsansätze wurden mit Li-Heparin, K_3EDTA und $Na_3Citrat$ antikoaguliert. Der normierte Median der Fluoreszenzintensität (n MFI) ist dargestellt.

Für neutrophile Granulozyten ist die Abnahme des carboxylfunktionalisierten Nanopartikels ASS5 bei Verwendung von Calcium-komplexierenden Agenzien noch drastischer (Abb. 4.11 (B)), mit y-Achsenunterbrechung), während der aminofunktionalisierte Nanopartikel NSC5 nicht besonders stark aufgenommen wird und die Abnahme der zellulären Aufnahme in K_3EDTA - und $Na_3Citrat$ -Blutentnahmeröhrchen daher insgesamt nur schwach zu verzeichnen ist. Die Abnahme der zellulären Aufnahme bei Einsatz von K_3EDTA oder $Na_3Citrat$ ist im Vergleich zu dem Effekt von ASS5 geringer. CD3+ T-Lymphozyten und CD19+ B-Lymphozyten zeigen mit allen drei Antikoagulanzen nur eine marginale zelluläre Aufnahme.

Deshalb werden im Folgenden zwei alternative Hypothesen diskutiert:

Zum einen könnte Li-Heparin die zelluläre Aufnahme verstärken durch Adsorption von Li-Heparin auf der Nanopartikeloberfläche. Infolgedessen könnte durch die hohe negative Ladungsdichte des Heparins eine verstärkte zelluläre Aufnahme durch Interaktionen mit den Leukozyten herbeigeführt werden.

Zum anderen könnte die vollständige Komplexbildung der Calcium-Ionen die zelluläre Aufnahme verringern (siehe unten), durch Hemmung verschiedener Stoffwechselfvorgänge. Zur

Klärung dieser Fragestellung wurden die funktionalisierten Nanopartikel ASS5 und NSC5 in Konzentrationen von $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in antikoagulierten Blutentnahmeröhrchen (K_3EDTA und Li-Heparin) in PBS^- für 2 h auf dem Blutröhrchenroller inkubiert und anschließend mittels statischer Lichtstreuung unter Variation des Detektionswinkels vermessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.12 dargestellt und zeigen für ASS5 (A) keine Veränderung des Durchmessers in PBS^- und PBS^- mit K_3EDTA im Vergleich zu den mittels DLS bestimmten Werten der Nanopartikeldispersion (vgl. Abb. 4.7).

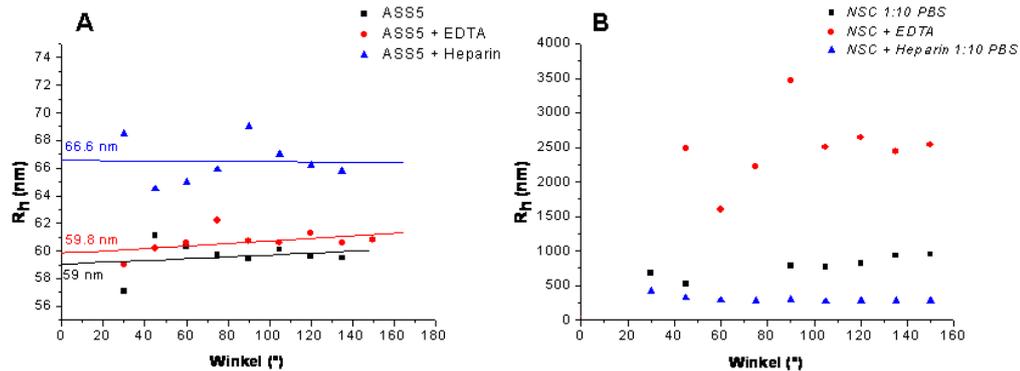


Abb. 4.12: Darstellung der hydrodynamischen Radien (R_h) von ASS5 (A) und NSC5 (B) nach Bestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung in PBS^- , PBS^- und K_3EDTA und PBS^- und Li-Heparin. Konzentration an Antikoagulans entsprechend Blutentnahmeröhrchen, Nanopartikelkonzentration $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Bei der Probe mit Li-Heparin nimmt der gemessene Radius um durchschnittlich 7 nm zu; dies kann auf eine Adsorption des Li-Heparins zurückzuführen sein. Für NSC5 (Abb.4.12 (B)) sind Agglomerationen in PBS^- zu verzeichnen, die auch visuell sichtbar sind. Die gemessenen Radien liegen weit über dem Wert der in der Nanopartikeldispersion mittels DLS gemessen wurde. Bei der Probe mit Li-Heparin sind die hydrodynamischen Radien deutlich niedriger; dies kann auf eine Adsorption von Li-Heparin zurückzuführen sein, welche die Nanopartikel desaggregiert (ähnlich dem möglichen stabilisierenden Effekt durch Serumproteinen, vgl. 2.1.3.3).

Für die Überprüfung des Einflusses der Komplexbildung der Calcium-Ionen auf die zelluläre Aufnahme wurde getestet, ob die Addition von Li-Heparin zu einer mit K_3EDTA antikoagulierten Blutprobe (EDTA_Hep) die zelluläre Aufnahme verstärkt oder die Zugabe von K_3EDTA zu einer mit Li-Heparin antikoagulierten Blutprobe (Hep_EDTA) die zelluläre Aufnahme verringert.

Wie in Abb. 4.13 gezeigt werden kann, verursacht die Zugabe von K_3EDTA in Li-Heparin-Blutentnahmeröhrchen (Hep_EDTA) oder Li-Heparin zu K_3EDTA (EDTA_Hep) in etwa die gleiche zelluläre Aufnahme für ASS5 wie bei alleiniger Verwendung von K_3EDTA . Die

Calcium-Komplexierung bedingt durch K_3EDTA ist somit der limitierende Faktor in Bezug auf die Zellaufnahme. Bei diesen Versuchsansätzen wurden Blutprobe in einem Antikoagulans aufgenommen, dann 10 min auf dem Blutröhrchenroller gemischt und dann erst in das jeweilige andere Antikoagulansröhrchen gegeben. Somit ist gewährleistet, dass beide Antikoagulanzen ihre Wirkung entfalten können.

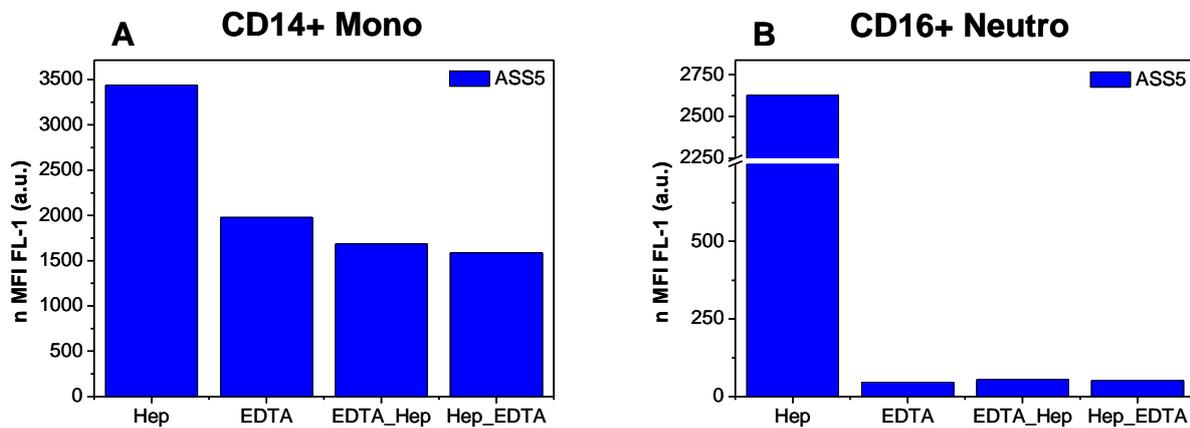


Abb. 4.13: Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Aufnahme von ASS5 in CD14+ Monozyten (A) und CD16+ Neutrophilen (B) nach 8 h. Versuchsansätze wurden mit Li-Heparin (Hep) und K_3EDTA antikoaguliert, sowie einer mit K_3EDTA antikoagulierten Probe Li-Heparin zugegeben (EDTA_Hep) und einer mit Li-Heparin antikoagulierten Probe K_3EDTA zugegeben (Hep_EDTA). Der normierte Median der Fluoreszenzintensität (nMFI) ist dargestellt.

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass K_3EDTA die zelluläre Aufnahme hemmt (Abb. 4.13). Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Effekt ist, dass ein Mangel an intrazellulärem Calcium - beteiligt an verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden^[282-283] - entsteht, weil die intrazellulären Speicher nicht mehr durch extrazelluläres Calcium aufgefüllt werden können in Folge der Calcium-Komplexierung bzw. -depletion durch K_3EDTA (bzw. $Na_3Citrat$). Calcium ist an diversen regulatorischen Funktionen der Signalkaskade von Immunzellen beteiligt, wie der Zellaktivierung und -differenzierung^[284]. Calcium ist ebenfalls an den Phagozytosemechanismen beteiligt^[285]. *Jaconi et al.* konnten für humane Neutrophile nachweisen, dass die phagozytotische Aufnahme calciumunabhängig ist, nicht jedoch die nachfolgende Fusion von sekundären Granula mit Phagosomenmembranen^[283]. *Ducusin et al.* untersuchten den Einfluss von extrazellulären Calciumkonzentrationen auf Phagozytosemechanismen und intrazelluläre Calciumkonzentration und konnten nachweisen, dass erniedrigte extrazelluläre Calciumkonzentrationen zu einer Verminderung der Phagozytoseaktivität führen^[286]. *Ducusin et al.* und *Bohmer et al.* konnten nachweisen, dass bei Verwendung von K_3EDTA als Antikoagulans die Phagozytoseaktivität von polymorphkernigen Leukozyten beeinträchtigt ist^[287-288].

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Versuche mit Li-Heparin in anti-koaguliertem Vollblut durchgeführt. Heparin besitzt durch die Carboxyl- und Sulfatgruppen eine hohe negative Ladungsdichte. Kritisch ist zu betrachten, ob eine möglich Aufnahme-steigerung durch eine Adsorption von Li-Heparin auf den Nanopartikeln oder den Plasmaproteinen, die wiederum mit den Nanopartikeln wechselwirken, bedingt werden könnte.

4.2.2.2 Einfluss der Funktionalisierung auf die zelluläre Nanopartikelaufnahme

In den weiterführenden Experimenten wurde das Aufnahmeverhalten der funktionalisierten Nanopartikel (ASS5 und NSC5) untersucht und mit dem der unfunktionalisierten Nanopartikel (SS und SC) verglichen. Nach einer Inkubation in peripherem Vollblut für 2 h zeigten die Monozyten die stärkste zelluläre Aufnahme für den carboxylfunktionalisierten Nanopartikel (ASS5), gefolgt vom aminofunktionalisiertem Nanopartikel (NSC5) (Abb. 4.14 (A)). Auch die unfunktionalisierten Nanopartikel SS und SC zeigen eine zelluläre Aufnahme, aber eine sehr geringe in Monozyten.

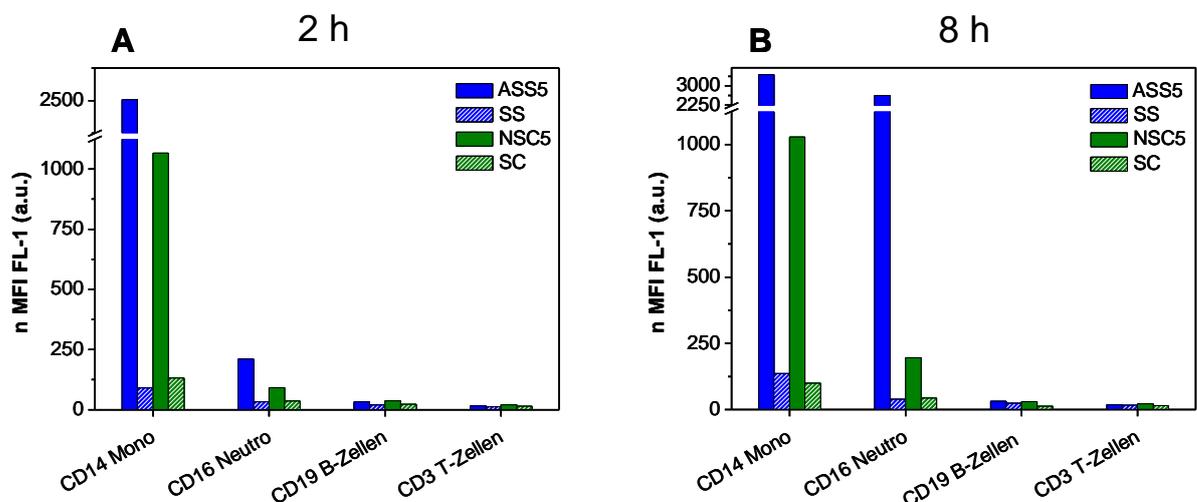


Abb. 4.14: Durchflusszytometrische Analyse nach 2 h (A) und 8 h (B) der zellulären Aufnahme von ASS5 (blau), SS (blau-liniert), NSC5 (grün) und SC (grün-liniert) in mit Li-Heparin antikoaguliertem Vollblut. Dargestellt ist die zelluläre Aufnahme von CD14+ Monozyten (Mono), CD16+ Neutrophilen (Neutro), CD19+ B-Zellen und CD3+ T-Zellen. Der normierte Median der Fluoreszenzintensität (n MFI) ist dargestellt.

Eine geringe zelluläre Aufnahme der beiden funktionalisierten Nanopartikel ASS5 und NSC5 ist in neutrophilen Granulozyten nach 2 h zu verzeichnen (Abb. 4.14 (B)), wohingegen die der unfunktionalisierten Nanopartikel SC und SS zu vernachlässigen ist.

Die zelluläre Aufnahmerate aller Nanopartikel in B- und T-Zellen ist gering. Das konnte auch mit den Nanopartikeln aus der DB-Charge in den vorausgehenden Experimenten beobachtet werden (vgl. 4.2.1.2).

Nach 8 h Nanopartikelinkubation ist die zelluläre Aufnahme von ASS5 und NSC5 in Monozyten (Abb. 4.14 (B)) nur leicht erhöht, was die Annahme bestätigt, dass Monozyten über Phagozytosemechanismen verfügen, die schnell erfolgen und dann erschöpft sind^[289-291]. In neutrophilen Granulozyten nimmt hingegen nach 8 h die zelluläre Aufnahme für den carboxylfunktionalisierten Nanopartikel (ASS5) deutlich, für den aminofunktionalisierten Nanopartikel (NSC5) geringer ausgeprägt, zu (Abb. 4.14 (B)). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass v.a. carboxylfunktionalisierte Nanopartikel nach einer längeren Inkubationszeit verstärkt aufgenommen werden, dies kann ebenso in Abb. 4.16 gesehen werden. Möglicherweise ist die höhere Anzahl der funktionellen Gruppen des carboxylfunktionalisierten Nanopartikels im Vergleich zum aminofunktionalisierten Nanopartikel ausschlaggebend für die unterschiedlichen zellulären Aufnahmeraten.

Die Funktionalisierung stellt sich als bedeutendster Faktor für die zelluläre Aufnahme heraus. Dies bestätigen in der vorliegenden Arbeit auch Experimente mit funktionalisierten Nanopartikeln in Abschnitt 4.3; hierbei wurde gezeigt, dass sowohl bei der Inkubation mit Serum, als auch mit BSA-bedeckten Nanopartikeln und ohne additives Serum bzw. BSA jeweils die funktionalisierten Nanopartikel die stärkste Aufnahme in HeLa-Zellen zeigen. Ohne Proteine ist die absolute zelluläre Aufnahme am höchsten. Dieser Einfluss von funktionalisierten Nanopartikeln im Vergleich zu unfunktionalisierten wurde in unserer Arbeitsgruppe schon mehrfach für diverse immortalisierte Zelllinien^[16, 50] und MSC^[3, 276] gezeigt. In peripherem Vollblut wurden Nanopartikel mit adsorbiertem BSA analysiert (siehe 4.3.2.4). Auch bei diesen Nanopartikeln zeigt der carboxylfunktionalisierte die stärkste zelluläre Aufnahme in Monozyten.

Für *in vitro*-Experimente mit Makrophagen konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel mit einer Oberflächenfunktionalisierung, die eine Ladung der Oberfläche bewirken, stärker internalisiert werden^[292-293]. Lunov et al. untersuchte die Wechselwirkungen von carboxyl- und aminofunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln in isolierten humanen Makrophagen und THP-1; es konnte dabei sowohl in Serum-haltigem Medium, als auch in Puffer, eine stärkere Aufnahme für den carboxylfunktionalisierten Nanopartikel festgestellt werden^[210]. In anderen Veröffentlichungen wird postuliert, dass positive Oberflächenladungen der Nanopartikel zu Wechselwirkungen mit den negativen Oberflächenladungen der Zellmembranen führen und diese dann besser internalisiert werden^[293-294]. Ungeladene, aber hydrophile Oberflächen verursachen eine geringere zelluläre Aufnahme^[54, 293].

Die bisherigen Ausführungen betrachten allein die Oberflächenladungen bzw. -funktionalisierungen der Nanopartikel. Wird in Serum oder Plasma inkubiert, entsteht durch die

Adsorptionen der Proteine auf der Nanopartikeloberfläche eine Nivellierung der Oberflächenladungen. *Zahr et al.* zeigten, dass nach BSA-Adsorption alle Nanopartikel eine leicht negatives ζ -Potential zeigten, unabhängig von der vorherigen Oberflächenladung^[293]. Von *Gessner et al.* konnte gezeigt werden, dass die Quantität der Adsorption von humanen Plasmaproteinen auf negativ geladene Polystyrol-Nanopartikeln mit zunehmender Anzahl der Oberflächenladung zunimmt; die Qualität der Proteinadsorptionsschicht sich aber nicht wesentlich verändert^[295]. Außerdem konnte diese Gruppe zeigen, dass auf positiv geladenen Polystyrol-Nanopartikeln vermehrt Proteine adsorbieren mit einem $I_p < \text{pH } 5,5$ (z. B. Albumin) und auf negativ geladenen präferiert Proteine mit einem $I_p > 5,5$ (z.B. Ig G) (vgl. 4.3.2.5). Von *Allemann et al.* wurde bei Analysen mit Citrat-Plasma gezeigt, dass auf negativ geladenen Poly(L-Laktid)-Nanopartikeln in den ersten Minuten Albumin adsorbiert, das nach 10 min sehr stark reduziert ist. Die Adsorption von IgG nimmt hingegen von Beginn an kontinuierlich zu, wie die Bindung von Komplementfaktor 3^[275]. Proteinen wie Albumin wird eine eher dysopsonisierende Wirkung zugesprochen (siehe 2.1.2.1 b.)). Opsonisierende Proteine wie IgG, Komplementfaktor 3, aber beispielsweise auch die Adsorption von Apolipoproteinen können zu Wechselwirkungen mit den phagozytierenden Zellen führen und den Phagozytoseprozess einleiten^[66]. Möglicherweise spielt die Ausprägung der Adsorptionsschicht von Proteinen auf Nanopartikeloberflächen eine größere Rolle, für spezifische zelluläre Aufnahmemechanismen, wie die Phagozytose, nicht aber für unspezifische Mechanismen wie die Makropinozytose (vgl. siehe 2.1.2.1 a.) und c.)). *Lunov et al.* konnten mit carboxylfunktionalisierten und aminofunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln nachweisen, dass die Aufnahmemechanismen der isolierten humanen Makrophagen sich bei Inkubation in HBSS (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*) und in Zellkulturmedium (RPMI mit 10 Vol.-% humanem AB Serum)^[210] unterscheiden. Von ihnen wurde gezeigt, dass auf dem carboxylfunktionalisierten Nanopartikel insgesamt mehr verschiedene Serumproteine adsorbieren als auf dem aminofunktionalisierten Nanopartikel; in HBSS-Puffer konnten keine Proteine nachgewiesen werden. Es handelte sich vorwiegend um IgG und Albumin. Dasselbe konnte *Gessner et al.* für negativ geladene Polystyrol-Nanopartikel nachweisen^[243]. Des Weiteren zeigten *Lunov et al.* mit diesen Modellnanopartikeln bei isolierten humanen Makrophagen in HBSS-Puffer, dass die Internalisierung des carboxylfunktionalisierten mittels Endozytose und des aminofunktionalisierten Nanopartikels mittels Makropinozytose erfolgte. Bei Inkubation in serumhaltigem Medium erfolgte die intrazelluläre Aufnahme phagozytotisch. Dies erlaubt den Schluss, dass die Adsorption von spezifischen, opsonisierenden Proteinen, wie IgG für den Aufnahmemechanismus bzw. die Phagozytose bedeutend ist. Alle vorausgehend

geschilderten Aspekte können einen Einfluss auf die starke zelluläre Aufnahme der funktionalisierten Nanopartikel in neutrophilen Granulozyten und v.a. in Monozyten haben, insbesondere des carboxylfunktionalisierten Nanopartikels. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass Phagozytosemechanismen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der zellulären Aufnahme der funktionalisierten Nanopartikel bei den beschriebenen *ex vivo*-Experimenten haben.

Die zelluläre Aufnahme in die markierten Leukozyten ist deutlich abhängig von der Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel, die durch das Comonomer herbeigeführt wird. Die Oberflächenladung, die durch das Tensid verursacht wird, ist weniger bedeutsam. Diese spielt in diesem Fall nur eine untergeordnete Bedeutung für die zelluläre Aufnahme.

Das ζ -Potential der eingesetzten Nanopartikel ist vor allem vom Tensid abhängig; wie in Abb. 4.7 gezeigt wird und ist nicht wesentlich durch das funktionelle Comonomer verursacht. Dementsprechend kann eine Wechselwirkung aufgrund des ζ -Potentials mit den Leukozyten oder den Plasmaproteinen nicht ausschlaggebend für die stark unterschiedliche zelluläre Aufnahme sein.

Die Daten, die in Abb. 4.14 (B) präsentiert werden, können auch als relativer Prozentsatz der gesamten zellulären Aufnahme nach 8 h dargestellt werden (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Prozentuale Anteile der Nanopartikelaufnahme im Vergleich zur Gesamtfluoreszenz in markierten Leukozyten (Darstellung der Daten aus Abb. 4.14).

Nanopartikel	Fluoreszenz aller analysierten Zellen: nMFI / %	CD3+ T-Zellen: nMFI / %	CD14+ Mono: nMFI / %	CD16+ Neutro: nMFI / %	CD19+ B-Zellen: nMFI / %
SS	213,25/100	15,43/7,24	135,83/63,70	38,59/18,10	23,4/10,97
ASS5	6117,46/100	18,22/0,30	3440,58/56,24	2626,88/42,94	31,78/0,52
SC	169,7/100	14,94/8,80	99,82/58	43,19/25,45	11,75/6,92
NSC5	1276,35/100	22,04/1,73	1028,2/80,56	196,05/15,36	30,06/2,36

Wenn Nanopartikel als Wirkstofftransportsysteme für T- und B-Zellen verwendet werden, sollte das zelluläre Aufnahmeverhalten dieser Nanopartikel in Monozyten und Neutrophilen reduziert sein, sonst kann es zu unerwarteten Nebenwirkungen in diesen Zellpopulationen kommen. Es sollte ein höherer Anteil von den Zielzellen, d.h. den CD3+ B- und CD19+ T-Zellen, aufgenommen werden und nicht von Monozyten und Neutrophilen internalisiert werden. Wie in Tabelle 4.1 zu sehen, kann dies mit SS und SC erreicht werden, mit ca. 7,0 – 11,0% der gesamten prozentualen Aufnahme bzw. prozentualen Fluoreszenzintensität, in Vergleich zu ca. 0,3 – 2,4% bei den beiden funktionalisierten Nanopartikeln ASS5 und NSC5.

Dies zeigt, dass die relative bzw. anteilmäßige Aufnahme von Nanopartikeln in CD3+ B- und CD19+ T-Zellen entsprechend gesteuert werden kann.

Eine Funktionalisierung der Nanopartikel hat für einen gezielten Transport in Lymphozyten keinen Benefit. Die unfunktionalisierten Nanopartikel zeigen, möglicherweise bedingt durch ihre kleinere Größe, eine anteilmäßig leicht stärkere zelluläre Aufnahme in den Lymphozyten wie die funktionalisierten Nanopartikel.

4.2.2.3 Einfluss der Nanopartikelkonzentrationen auf die zelluläre Aufnahme

In der nächsten Stufe der Experimente wurden die Beziehungen zwischen dem zellulären Aufnahmeverhalten in CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophilen und den zugegebenen Konzentrationen der Nanopartikel in Abhängigkeit von bestimmten Inkubationszeiten untersucht. CD3+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen wurden nicht in diese Versuchsreihe miteinbezogen, da sie in vorangehenden Experimenten eine sehr schwache Aufnahme zeigten.

Hierfür wurden Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen von 75, 150, 300 und 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ durchgeführt. Inkubationen mit höheren Konzentrationen von 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ führten zu verschlechterten Darstellungen des Zellbildes in den FSC/SSC-Dot-Plots, insbesondere nach vorangeschrittenen Inkubationszeiten von > 4 h. In Tierversuchen werden u.a. von *Pagnani et al.* ähnliche Konzentrationen eingesetzt (150-1050 μg PLGA-Nanopartikel i.v., bei einem Blutvolumen von ca. 1,5 mL je Maus)^[290]. Wie in Abb. 4.15 zu sehen ist, resultiert die Inkubation von höheren Konzentrationen an Nanopartikeln nach 8 h in einer verstärkten zellulären Aufnahmerate für Monozyten (Abb. 4.15 (A)) und neutrophile Granulozyten (Abb. 4.15 (B)).

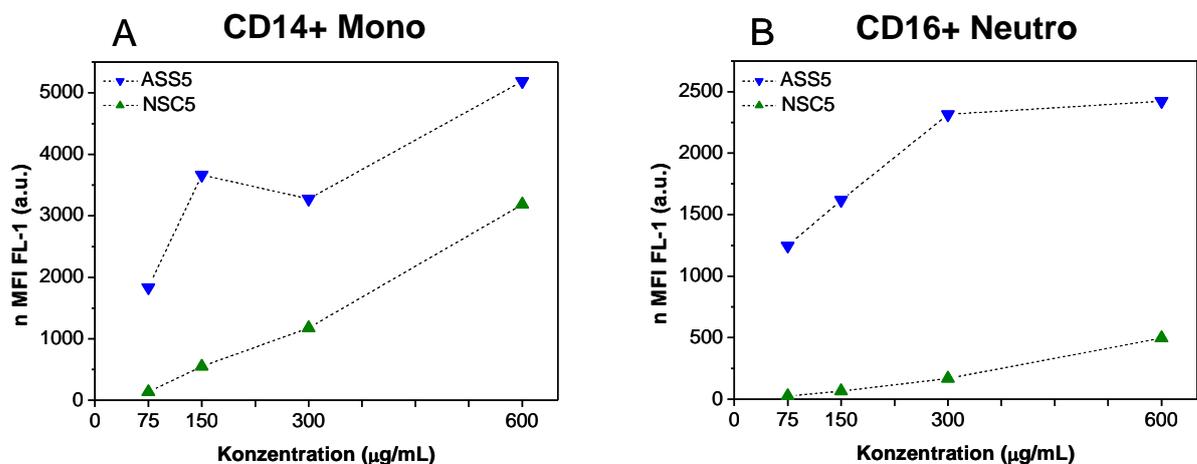


Abb. 4.15: Durchflusszytometrische Analyse von CD14+ Monozyten (A) und CD16+ Neutrophilen (B) nach 8-stündiger Inkubation mit 75, 150, 300 und 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ASS5 und NSC5 in mit Li-Heparin antikoaguliertem peripheren Vollblut. Der normierte Median der Fluoreszenzintensität (n MFI) ist aufgetragen.

Der aminofunktionalisierte Nanopartikel (NSC5) zeigt keine Sättigungskonzentration die zelluläre Aufnahme betreffend, sondern mit höheren Nanopartikelkonzentrationen eine stetig zunehmende zelluläre Aufnahme für Monozyten und neutrophile Granulozyten (Abb. 4.15).

Der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel (ASS5) zeigt für höhere Konzentrationen (300 und 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) bei CD16+ neutrophilen Granulozyten ein Plateau und somit scheint eine Sättigungskonzentration in diesem Fall erreicht zu werden (Abb. 4.15 (A), (B)). Die Verwendung von weiteren höheren Konzentrationen sollte dann zu keiner weiteren Veränderungen in der Höhe der zellulären Aufnahme führen. Bei T- und B-Zellen führt auch eine Inkubation mit höheren Nanopartikelkonzentrationen von 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nur zu geringen Steigerungen der zelluläre Aufnahme bei den funktionalisierten Nanopartikeln ASS5 und NSC5. Die unfunktionalisierten Nanopartikel SS und SC zeigen keine Steigerung der Aufnahme.

4.2.2.4 Einfluss der Inkubationszeit auf die zelluläre Nanopartikelaufnahme

Des Weiteren wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf das zelluläre Aufnahmeverhalten ausführlich betrachtet. Wie in Abb. 4.16 (A) (Skalierung beginnt bei rel. Fluoreszenzeinheiten (n MFI) von 1000) gezeigt, wird die zelluläre Aufnahme in CD14+ Monozyten weder für ASS5 noch für NSC5 mit zunehmender Zeit (> 2-4 h) grundlegend verstärkt.

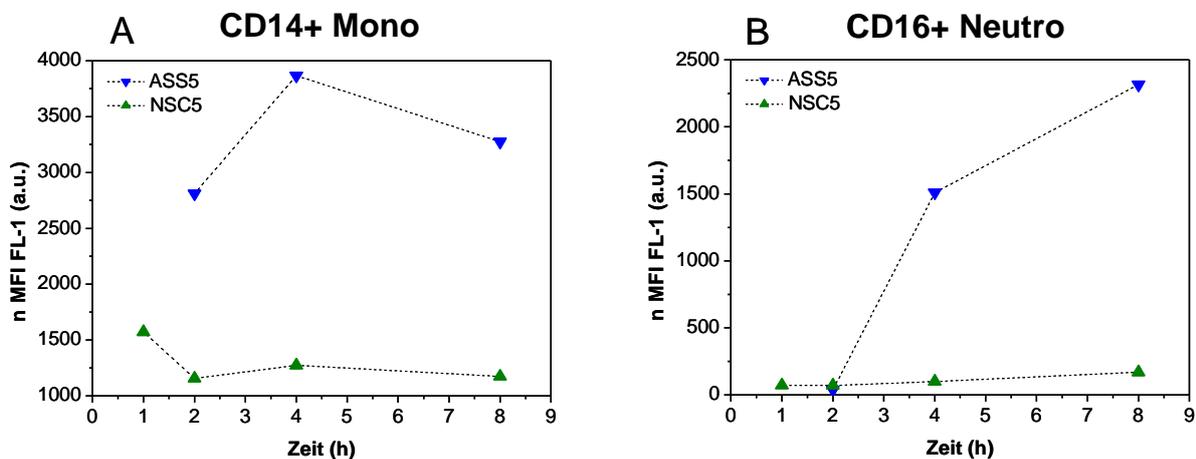


Abb. 4.16: Durchflusszytometrische Analyse von CD14+ Monozyten (A) und CD16+ Neutrophilen (B) nach 8-stündiger Inkubation mit ASS5 und NSC5 (je $300\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in mit Li-Heparin antikoaguliertem peripheren Vollblut. Der normierte Median der Fluoreszenzintensität (n MFI) ist aufgetragen.

Ebenso findet keine deutliche Zunahme (Abb. 4.16 (B)) für den aminofunktionalisierten Nanopartikel (NSC5) in CD16+ Neutrophilen statt, jedoch wird der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel (ASS5) bei längeren Inkubationszeiten deutlich stärker aufgenommen.

4.2.2.5 Zusammenfassung der Experimente mit funktionalisierten Nanopartikel in anti-koagulierte peripherem Vollblut

Abschließend ist mit Abb. 4.17 noch eine vergleichende Übersicht für CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophile gegeben, die zusammenfassend die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse für den carboxylfunktionalisierten Nanopartikel (ASS5) und den aminofunktionalisierten Nanopartikel (NSC5) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen darstellt. Die Inkubationszeiten betragen jeweils 2, 4 und 8 h, für NSC5 wurde versuchsweise auch eine Messung nach 1 h durchgeführt.

In Abb. 4.17 (A)-(D) werden die Ergebnisse nach Inkubation in mit Li-Heparin antikoagulierte Blut gezeigt und in (E)-(H) zusätzlich die Ergebnisse vergleichend nach Inkubation in mit K₃EDTA antikoagulierte Blut dargestellt. Die Einflüsse folgender Faktoren werden betrachtet:

Antikoagulans

Die Inkubation in Li-Heparin führt im Vergleich zu K₃EDTA zu höheren zellulären Aufnahmeleistungen, sowohl in CD14+ Monozyten, wie auch in CD16+ Neutrophilen. Wie in Abb. 4.11 gezeigt, ist dieser Effekt auf die Calcium-komplexierende Wirkung von K₃EDTA zurückzuführen (vgl. Abb. 4.13).

Werden die Unterschiede der Aufnahmesteigerung bei einem Wechsel von Li-Heparin zu K₃EDTA (betrachtet seien an dieser Stelle repräsentativ die Konzentrationen von 300 µg·mL⁻¹ nach 8-stündiger Inkubation in Abb. 4.17) analysiert, entstehen folgende Unterschiede bei Betrachtung von CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophilen:

- Bei CD14+ Monozyten ist für ASS5 ((A) und (E)) eine Aufnahmesteigerung in Li-Heparin um ca. das 1,5-fache zu beobachten, bei NSC5 ((B) und (F)) um ca. das 20-fache.
- Bei CD16+ Neutrophilen ist für ASS5 ((C) und (G)) eine Aufnahmesteigerung in Li-Heparin um ca. das 30-fach zu beobachten, bei NSC5 ((D) und (H)) nur ca. um das 2-fache.

Wechselwirkungen von Plasmaproteinen und Opsoninen oder Adsorption des negativ geladenen Heparins auf der Oberfläche der funktionalisierten Nanopartikel bzw. mögliche Agglomerationen der Nanopartikel bedingt durch Wechselwirkungen mit dem jeweiligen Antikoagulans, die zu dieser unterschiedlichen Nanopartikel Aufnahme führen, müssen hierfür in Betracht gezogen und weiterführend untersucht werden.

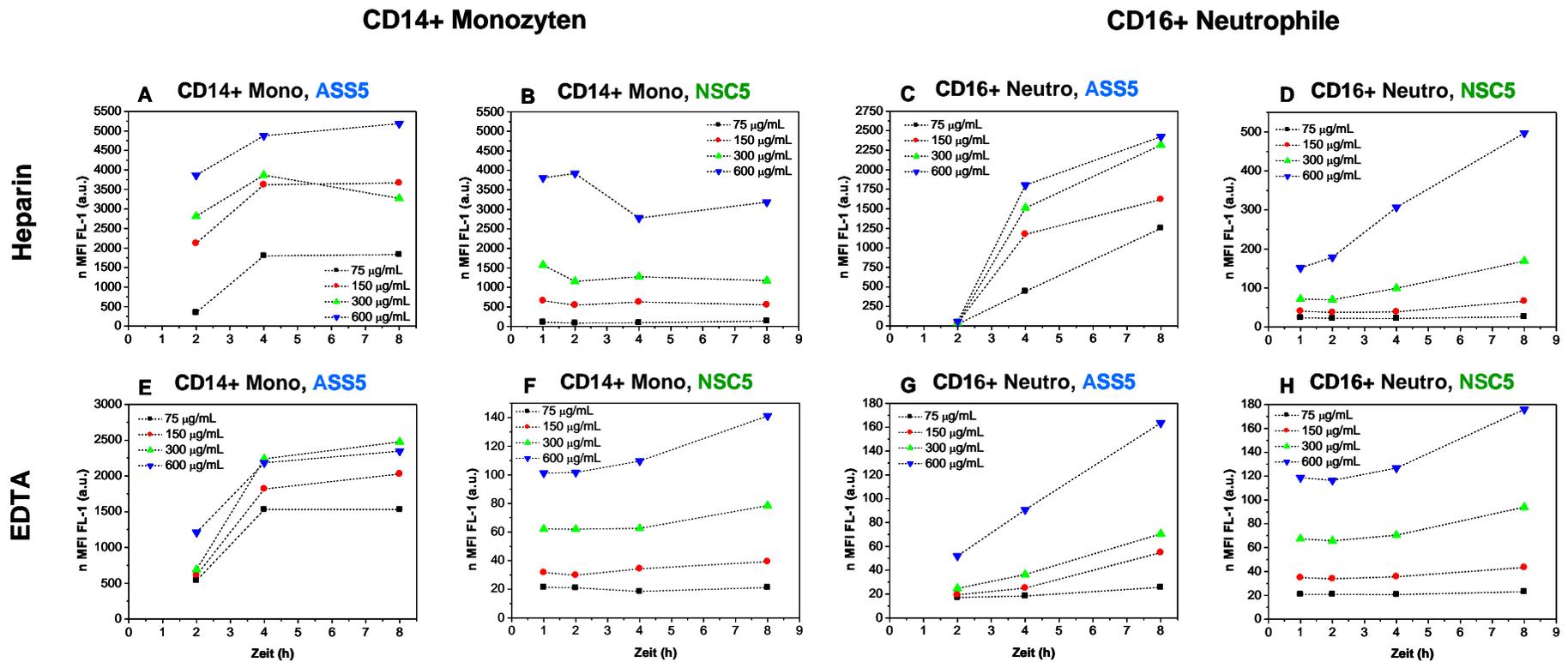


Abb. 4.17: Durchflusszytometrische Analysen von CD14+ Monozyten (A), (B), (E) und (F) und CD16+ Neutrophilen (C), (D), (G) und (H) nach 1, 2, 4 und 8 h. (A)-(D) sind Proben die mit Li-Heparin; (E)-(H) Proben die mit K₃EDTA antikoaguliert wurden. Zur Nanopartikelinkubation wurden Konzentrationen von 75 (schwarz), 150 (rot), 300 (grün) und 600 (blau) µg·mL⁻¹ des carboxylfunktionalisierten Nanopartikels ASS5 und des aminofunktionalisierten Nanopartikels NSC5 verwendet (siehe jeweilige Diagrammbeschriftung). Der normierte Median der Fluoreszenzintensität (n MFI) ist aufgetragen.

Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel

Generell zeigt der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel ASS5 eine deutlich stärkere zelluläre Aufnahme, sowohl in CD14+ Monozyten, als auch in CD16+ Neutrophilen, bei Inkubation in verschiedenen Konzentrationen und bei Einsatz von Li-Heparin und K₃EDTA als Antikoagulans (Abb. 4.17 (A)-(H)). Möglicherweise ist dies, neben der Art der Funktionalisierung und der Oberflächenladung der Nanopartikel und der daraus resultierenden Wechselwirkungen mit den im Blut enthaltenen Proteinen, auch auf eine erhöhte Anzahl an funktionellen Gruppen (ASS5: 0,5·nm⁻²) im Vergleich zum aminofunktionalisierten Nanopartikel (NSC5: 0,13·nm⁻²) zurückzuführen.

Konzentration der Nanopartikel

Wie auch in Abb. 4.15 gezeigt werden konnte, führt die Inkubation mit Nanopartikelkonzentrationen > 300 µg·mL⁻¹ zu höheren zellulären Aufnahmeraten in CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophilen. Dies ist auch in Abb. 4.17 in mit Li-Heparin und K₃EDTA antikoagulierten Proben zu erkennen. In Abb. 4.17 (E) (CD14+ Monozyten, ASS5, K₃EDTA) und (C) (CD16+ Neutrophile, ASS5, Li-Heparin) ist eine gewisse Sättigung der zellulären Aufnahme zu erkennen, d. h. eine Konzentrationserhöhung von 300 µg·mL⁻¹ auf 600 µg·mL⁻¹ führt zu keiner größeren Änderung der zellulären Aufnahmerate.

Generell wird bestätigt, dass der Einsatz von 300 µg·mL⁻¹ für zelluläre Aufnahmeexperimente in Leukozyten eine sinnvolle Konzentration darstellt.

Inkubationszeiten der Nanopartikel

Wie in Abb. 4.17 (A) für diverse Nanopartikelkonzentrationen zu sehen ist, zeigen CD14+ Monozyten in Li-Heparin für ASS5 über Inkubationszeiten von 2, 4 und 8 h eine zelluläre Aufnahmesteigerung bei zunehmender Nanopartikelinkubationszeit; für ASS5 ist der Anstieg zwischen 4 und 8 h allerdings deutlich schwächer ausgeprägt als zwischen 2 und 4 h. Für NSC5 (Abb. 4.17, (B)) ist in Li-Heparin keine Aufnahmesteigerung mit zunehmender Inkubationszeit für Monozyten zu verzeichnen. Die zelluläre Aufnahme von NSC5 findet in den ersten 2 h statt. Dies kann mit einer gewissen Sättigung der CD14+ Monozyten einhergehen, aber auch auf eine Einschränkung der Partikelaufnahme-fähigkeit bzw. der Zellviabilität hindeuten.

Gleiche Beobachtungen wurden auch mit K₃EDTA antikoagulierten Proben (Abb. 4.17 (E) und (F)) für ASS5 gemacht, jedoch zeigt NSC5 eine leichte Zunahmerate bei fortschreitender Inkubationszeit (allerdings im Bereich von niedrigen Fluoreszenzintensitäten). Proben mit

beiden Antikoagulanzen zeigen für ASS5 (bei allen Nanopartikelkonzentrationen) in CD14+ Monozyten nach 4 h keine deutliche Aufnahmesteigerung.

Bei den CD16+ Neutrophilen ist die zelluläre Aufnahme im Vergleich zu den CD14+ Monozyten deutlich schwächer ausgeprägt. Die zelluläre Aufnahme ist generell schwächer ausgeprägt und nimmt kontinuierlich zu. Zwischen 4 und 8 h ist eine deutliche Aufnahmesteigerung zu sehen (vgl. Abb.4.16 und Abb. 4.17 (C), (D), (G) und (H)), die bei CD14+ Monozyten nicht mehr sehr stark ausgeprägt ist. Es ist bei CD16+ Neutrophilen sowohl in mit Li-Heparin, als auch mit K₃EDTA antikoaguliertem peripheren Vollblut zu beobachten, dass eine längere Inkubationszeit kontinuierlich zu einer stärkeren zellulären Aufnahmerate führt, insbesondere bei ASS5.

Die Auftragungen der Kurven, generiert aus den Messdaten der verschiedenen Konzentrationsreihen, zeigen einen ähnlichen Verlauf. Die Kurven mit niedrigeren Konzentrationen liegen unter denen der höheren Konzentrationen.

4.2.2.6 Lokalisation der Nanopartikel in den Leukozyten mittels CLSM

Die zur durchflusszytometrischen Analyse verwendeten Antikörper konnten auch zur konfokalen Laser-Raster-Elektronenmikroskopie verwendet werden. Dafür wurden diese Fluoreszenz-markiert, so dass eine eindeutige Markierung der entsprechenden Zellen für mikroskopische Aufnahmen möglich war. Um eine ausreichend hohe Zellzahl in den Kammern der IBIDI μ -Slides zur Analyse vorliegen zu haben wurde für die Probenpräparation die doppelte Blutmenge (200 μ l) im Vergleich zur Präparation der Proben für die durchflusszytometrischen Analysen verwendet. Analog dazu wurde auch die verwendete Antikörpermenge zur Färbung verdoppelt. Für Details des Anfärbeprotokolls siehe Abschnitt 3.1.8. Die beste Färbung konnte mit dem Antikörper CD16 Alexa Fluor 647 erzielt werden, dieses Fluorochrom erwies sich auch bei den CLSM-Experimenten als sehr stabil und intensiv fluoreszierend. Bei den mit APC markierten Antikörpern war ebenfalls eine gute Detektion möglich, jedoch erforderte ein schnelleres Verblässen der Färbung eine zügige Analyse der Proben. Die in Abb. 4.18 gezeigten CLSM-Aufnahmen mit Transmissionslicht, zeigen deutlich, dass durch die verwendeten Antikörper die Leukozyten selektiv markiert und die markierten Zellen sich auch entsprechend morphologisch und von ihrem prozentualen Anteil an der gesamten Zellzahl (gut ersichtlich in den Übersichtsbildern mit kleiner Vergrößerung bzw. ohne Zoom) unterscheiden. Für T- und B-Zellen konnten keine nennenswerten intrazellulären Aufnahmen der eingesetzten Nanopartikel festgestellt werden. Für CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophile ist eine Lokalisation der Nanopartikel in den Zellen zu

detektieren (Abb. 4.18-4.21). Zukünftig kann die Verwendung von weiteren Antikörpern zur sicheren Detektion bestimmter Leukozytengruppen, neben den morphologischen Merkmalen, dienlich sein, um beispielsweise CD16+ Neutrophile von weiteren CD16+ Leukozyten (wie beispielsweise natürlichen Killer-Zellen und einem Teil der Monozyten (vgl. Tabelle 2.1)), zu unterscheiden.

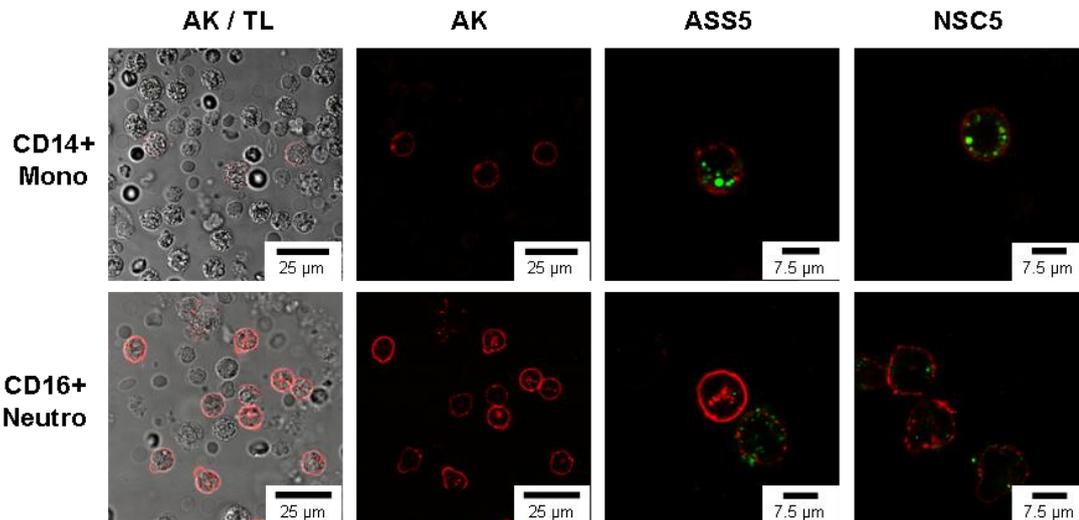


Abb. 4.18: CLSM-Aufnahmen von CD14+ Monozyten (obere Reihe) und CD16+ Neutrophilen (unterer Reihe). Die erste Spalte (AK / TL) zeigt eine antikörper-markierte Probe mit Transmissionslicht ohne Nanopartikel, die zweite Spalte zeigt die Aufnahmen der Spalte eins ohne Transmissionslicht (AK). Die dritte Spalte zeigt CLSM-Aufnahmen mit ASS5 und die vierte Spalte mit NSC5 jeweils nach 6-stündiger Inkubation. Die spezifische Antikörperfärbung ist in rot dargestellt (CD14 APC und CD16 AlexaFluor647), die Nanopartikel in grün (PMI).

Für neutrophile Granulozyten wird von *Bartneck et al.* ein Einlagern von Nanopartikeln in extrazellulären Strukturen diskutiert (NET, siehe 2.1.2.1 c.))^[54, 92]. Bei den Experimenten, die in Abb. 4.18 gezeigt werden kann für CD16+ neutrophile Granulozyten eine relativ ungleichmäßige Aufnahme oder Anlagerung von Nanopartikeln beobachtet werden. Durch die konfokalen CLSM-Aufnahmen von CD16+ neutrophilen Granulozyten werden intrazelluläre Aufnahmen der Nanopartikel bestätigt, vermehrt sind auch Lokalisationen an den Membranen für beide funktionalisierte Nanopartikel zu beobachten, insbesondere für den carboxylfunktionalisierten Nanopartikel ASS5. Diese Lokalisierung an den Membranen kann auf eine Einlagerung in extrazellulären Strukturen hinweisen.

In Abb. 4.19 ist ein CD14+ Monozyt dargestellt, in dem nanopartikelhaltige Vesikel zu sehen sind. Die Größe der Nanopartikel enthaltenden Vesikel kann nach der Inkubationszeit von 6 h durch eine Fusion von Phagosomen bzw. Phagolysosomen bedingt sein oder durch eine makropinozytische Aufnahme von mehreren Nanopartikeln. Makropinozytische Vesikel haben eine Größe $> 1 \mu\text{m}$ ^[44] und wurden in isolierten humanen Makrophagen, die mit Gold-Nanopartikeln *in vitro* inkubiert wurden, beobachtet; eine phagozytische Aufnahme war

aufgrund von Inhibitorexperimenten für diese Nanopartikel von den Autoren ausgeschlossen worden^[54].

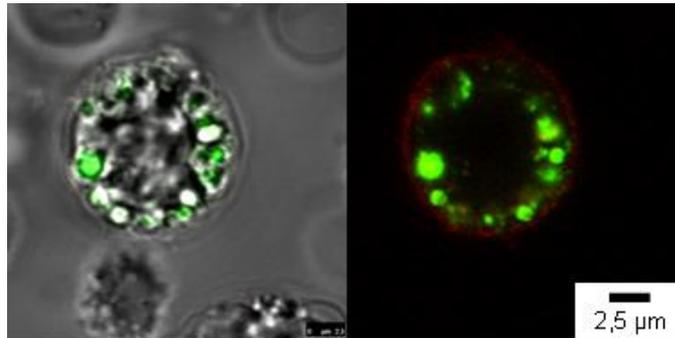


Abb. 4.19: CLSM-Aufnahme eines CD14+ Monozyten nach 6-stündiger Inkubation mit NSC5 (verwendetes Antikoagulans: Li-Heparin). Die linke Aufnahme zeigt den CD14+ Monozyten mit Transmissionslicht, die rechte Aufnahme ohne Transmissionslicht. Die spezifische Antikörperfärbung ist in rot dargestellt (CD14 APC), die Nanopartikel in grün (PMI).

Makropinozytose oder Endozytotische-Mechanismen können auch für die hier durchgeführten Experimente aufgrund der Vesikelgrößen von teilweise $> 1 \mu\text{m}$ (in CD14+ Monozyten, Abb. 4.18-4.21) und der Größe der Nanopartikel, die prinzipiell Clathrin- oder Caveolin-abhängige Aufnahmemechanismen ermöglichen, nicht ausgeschlossen werden.

In Abb. 4.20a sind Schnitte in z-Ebene durch einen CD14+ Monozyten nach Inkubation mit ASS5 dargestellt. In gelb sind Kolokalisationen von Nanopartikeln und Zellmembran dargestellt.

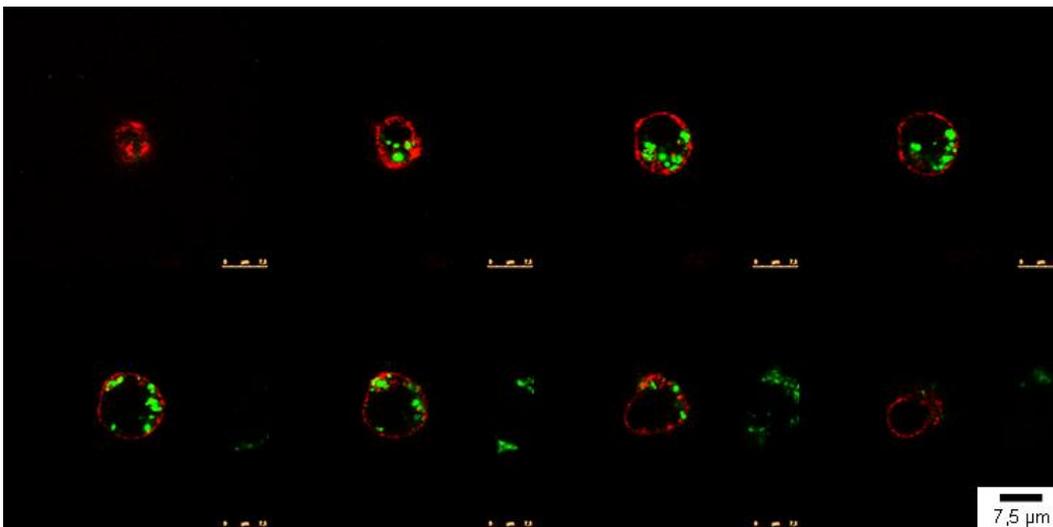


Abb. 4.20a: Konfokale Schnitte durch einen CD14+ Monozyten nach 6-stündiger Inkubation mit ASS5 (verwendetes Antikoagulans: Li-Heparin). Die spezifische Antikörperfärbung ist in rot dargestellt (CD14 APC), die Nanopartikel in grün (PMI).

In Abb. 4.20b ist eine 3D-Darstellung der z-Schnitte von Abb. 4.20a dargestellt. Hierbei ist eine gleichmäßige Verteilung der Nanopartikel (ASS5) in den Zellen zu sehen.

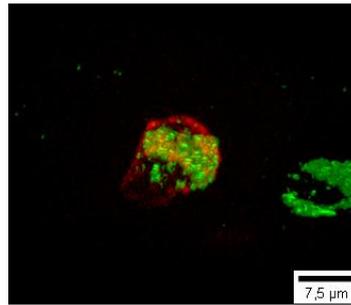


Abb. 4.20b: Zur 3D-Ansicht zusammengefügte Schnitte des CD14+ Monozyten aus Abb. 4.20a. Die spezifische Antikörperfärbung ist in rot dargestellt (CD14 APC), die Nanopartikel in grün (PMI).

In Abb. 4.21a sind Schnitte in z-Ebene durch einen CD14+ Monozyten nach Inkubation mit NSC5 dargestellt. In gelb sind Kollokalisierungen von Nanopartikeln und Zellmembran dargestellt.

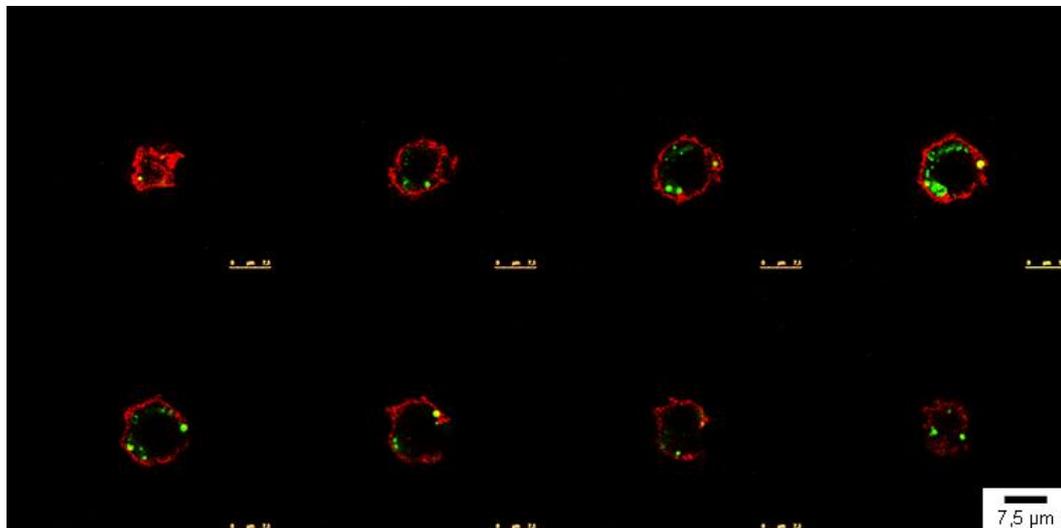


Abb. 4.21a: Konfokale Schnitte durch einen CD14+ Monozyten nach 6-stündiger Inkubation mit NSC5 (verwendetes Antikoagulans: Li-Heparin). Die spezifische Antikörperfärbung ist in rot dargestellt (CD14 APC), die Nanopartikel in grün (PMI).

In Abb. 4.21b ist eine 3-D Darstellung der z-Schnitte von Abb. 4.21a dargestellt. Hierbei ist eine gleichmäßige Verteilung der Nanopartikel (NSC5) in den Zellen zu sehen.

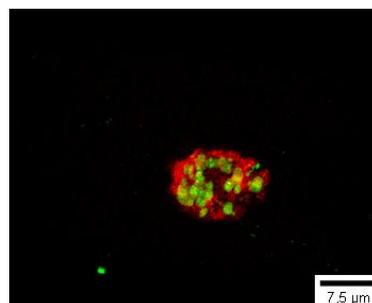


Abb. 4.21b: Zur 3D-Ansicht zusammengefügt Schnitte des CD14+ Monozyten aus Abb. 4.21a. Die spezifische Antikörperfärbung ist in rot dargestellt (CD14 APC), die Nanopartikel in grün (PMI).

Die Abb. 4.18-4.21 weisen deutlich eine intrazelluläre Lokalisation der beiden funktionalisierten Nanopartikel ASS5 und NSC5 in CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophilen nach. Eine Detektion der schwachen zellulären Aufnahme der unfunktionalisierten Nanopartikel SS und SC mittels CLSM war in CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophilen ebenfalls möglich. Ebenso konnte eine intrazelluläre Aufnahme der Nanopartikel bei mit K₃EDTA-antikoagulierten Proben nachgewiesen werden.

4.2.2.7 Zusammenfassung der Experimentreihe mit funktionalisierten Nanopartikeln in peripherem Vollblut

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gelungen ist ein *ex vivo*-Testsystem für die Inkubation von Leukozyten in antikoaguliertem Vollblut zu etablieren. Hiermit kann eine Verbindung zwischen *in vitro*-Zellkulturexperimenten und *in vivo*-Tierversuchsreihen geschaffen werden, die es erlaubt, Bedingungen in peripherem Vollblut zu imitieren. Calcium-komplexierende Antikoagulanzen senken die physiologische Aktivität der Zellen, im Gegensatz zu Li-Heparin und führen zu einer geringeren intrazellulären Nanopartikelaufnahme. Trotzdem zeigen Untersuchungen mit K₃EDTA und Li-Heparin antikoaguliertem Blut vergleichbare Tendenzen bei der zellulären Aufnahme, insbesondere von CD14+ Monozyten und CD16+ neutrophilen Granulozyten. Allerdings ist in mit Li-Heparin antikoaguliertem Blut die intrazelluläre Aufnahme um ein Vielfaches stärker. Die intrazelluläre Lokalisation der eingesetzten Nanopartikel konnte mit CLSM-Aufnahmen bestätigt werden. Des Weiteren werden Inkubationsexperimente mit funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln, die mit Lutensol® AT50, einem nicht-ionischen Tensid stabilisiert wurden, in Abschnitt 4.3.2.4 und Inkubationsexperimente mit Hyaluronsäure- und Heparin-Nanokapseln in Abschnitt 4.4.1.2 und 4.4.2.2 gezeigt.

In weiterführenden Experimenten bedarf es einer genaueren Analyse des Einflusses der zugesetzten Antikoagulanzen sowohl auf die Viabilität der Zellen, als auch auf die nanopartikulären Systeme. Inkubationen in einem Inkubator bei 37 °C sollten denen bei Raumtemperatur vorgezogen werden. Untersuchungen mit kürzeren Inkubationszeiten und einem Set von Nanopartikeln mit einem breiteren Größenspektrum könnten weitere Erkenntnisse zum Einfluss von Größen in Zusammenhang mit Inhibitorstudien zu phagozytotischen oder endozytostischen Aufnahmewegen liefern.

Das Verfahren kann ausgedehnt werden auf weitere Immunzellen, wie CD56+ natürliche Killerzellen oder CD11c+ dendritischen Zellen. Diese Methode eignet sich auch prinzipiell zur Analyse von peripherem Vollblut aus Tierversuchen.

4.3 Zelluläre Aufnahme von nicht-ionisch stabilisierten, funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln mit und ohne adsorbiertem bovinem Serumalbumin

Nanopartikel kommen bei einer intravenösen Verabreichung unmittelbar in Kontakt mit der Blutbahn und sind dabei mit hohen Konzentrationen von Plasmaproteinen konfrontiert, welche mit der Oberfläche der Nanopartikel wechselwirken. Die Proteinfraction mit dem höchsten Anteil ist dabei das Serumalbumin mit ca. 63%. Eine Proteinadsorption von Plasmaproteinen muss generell für alle nanopartikulären Wirkstofftransportsysteme in Betracht gezogen werden, die in der Blutbahn zirkulieren.

Für die folgenden Experimente wurde bovines Serumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) verwendet, wie es auch in FCS, das essentieller Zusatz für Zellkulturmedien ist, enthalten ist. BSA diente bereits in vielen Studien als Modellprotein, um die Wechselwirkungen mit Partikeloberflächen zu untersuchen^[241].

Wie schon in Abschnitt 4.1.2 gezeigt wurde, beeinflusst zusätzliches FCS im Zellkulturmedium, die zellulären Aufnahmeraten der Nanopartikel erheblich. Albumin ist die größte Proteinfraction im Serum. Fibrinogen, ein Protein mit hoher Bindungsaffinität, sowie weitere Gerinnungsfaktoren sind in FCS nicht enthalten. Die adsorbierten Proteine bilden eine dynamische Korona auf der Nanopartikeloberfläche aus und geben ihr ein neues Erscheinungsbild, mit dem die Zellen bei Inkubationsexperimenten konfrontiert werden^[77] (siehe 2.1.6).

Bei den ITC-Experimenten von Frau Dr. Grit Baier wurde BSA als Modellprotein für Adsorptionsprozesse von Albumin auf funktionalisierten und nicht funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikel ausgewählt^[21].

Mittels ITC wurde der Bedeckungsgrad von BSA auf diversen funktionalisierten Nanopartikeln bestimmt. In Abb. 4.22 sind beispielhaft die Rohdaten der exothermen Messkurven dargestellt.

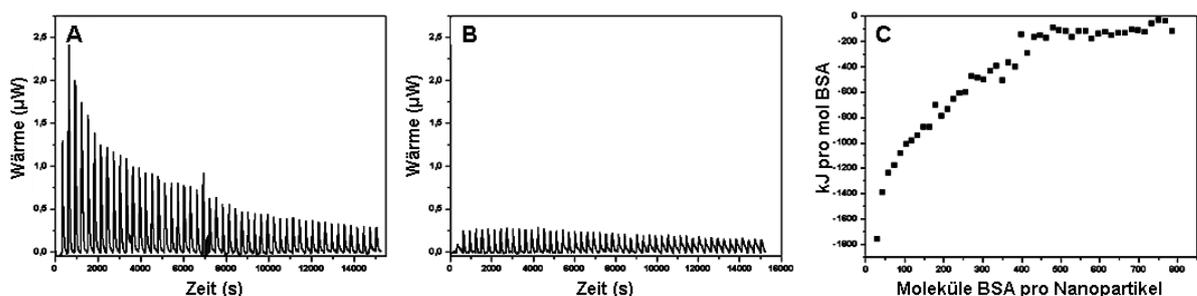


Abb. 4.22: Rohdaten der Titrationskurven: BSA mit Nanopartikel (A), BSA mit Wasser (B) und die daraus resultierenden Integrale (C)^[21].

In Abb. 4.22 sind Rohdaten der Titrationsen von BSA mit Nanopartikel (A) und BSA mit Wasser (B) dargestellt. Bei der Messung (B) wurden die Verdünnungsenthalpien von BSA mit Wasser ermittelt. Die Werte der Verdünnungsenthalpien wurden bei der Auswertung von den dazugehörigen Messwerten abgezogen. Die daraus resultierenden Kurven der Enthalpien (ΔH) wurden für jeden Titrationschritt integriert und die Wärmeänderung ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ BSA) gegen BSA-Moleküle pro Nanopartikel aufgetragen (Abb. 4.22 (C)). Mit diesen Daten erfolgte die Berechnung des Bedeckungsgrades der Nanopartikel^[21] (Tabelle 4.2).

Der Einfluss der BSA-Bedeckung der Nanopartikel auf die zelluläre Aufnahme in HeLa-Zellen sowie der Zusammenhang zwischen dem ermittelten Bedeckungsgrad und der zellulären Aufnahme wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten untersucht.

Von *Ogawara et al.* konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass HSA-bedeckte Polystyrol-Nanopartikel (50 nm) länger in der Blutbahn von Ratten zirkulieren als Nanopartikel, die unbedeckt i.v. verabreicht werden^[296]. *Wilhelm et al.* zeigten, dass BSA-bedeckte anionische Nanopartikel eine niedrigere Assoziationsrate mit HeLa-Zellen aufweisen als unbedeckte^[247].

Es wurden für die in diesem Kapitel beschriebenen Zellexperimente drei Polystyrol-Nanopartikel eingesetzt: PS (unfunktionalisiert), PS-AA (carboxylfunktionalisiert) und PS-AEMH (aminofunktionalisiert) (Tabelle 3.4). Die Nanopartikel sind mit Lutensol® AT50 nicht-ionisch stabilisiert (Abb. 4.23), die funktionalisierten Nanopartikel sind mit 2 Gew.-% Comonomer von Frau Dr. Grit Baier hergestellt worden. Lutensol® AT50 hat durch die hydrophilen Polyethylenglykoleinheiten einen gewissen PEG-Effekt, der die Bedeckung mit Proteinen reduziert (siehe 2.1.3.3).

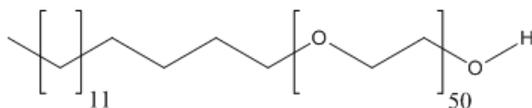


Abb. 4.23: Strukturformel von Lutensol® AT50.

Synthesebedingt besitzen die funktionalisierten Nanopartikel nicht die gleiche Anzahl an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche; der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel trägt 0,63 und der aminofunktionalisierte 0,14 funktionelle Gruppen·nm⁻². Somit ist eine Vergleichbarkeit in Bezug auf den Einfluss der Anzahl der Gruppen nicht möglich.

Der Einfluss der Bedeckung der Nanopartikel mit BSA vor der Zugabe in das Zellkulturmedium auf die zelluläre Aufnahme sollte, in Abhängigkeit der unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen, untersucht werden. Hierzu wurde Probenansätze mit DMEM mit und ohne 10 Vol.-% FCS verwendet. Dadurch sollte zum einen der Einfluss einer BSA-Bedeckung der Nanopartikel unter Standardbedingungen (DMEM mit FCS) getestet und zum

anderen mögliche weitere Effekt von additivem FCS (DMEM ohne FCS) ausgeschlossen werden. Der Ablauf der experimentellen Durchführung ist in Abschnitt 3.1.6 beschrieben.

Die intrazelluläre Nanopartikelaufnahme wurde durchflusszytometrisch quantifiziert und mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie bestätigt.

4.3.1 Auswahl der Zelllinie für die Experimentreihe mit BSA-bedeckten Nanopartikeln

Mit den Nanopartikeln PS, PS-AA und PS-AEMH (siehe Tabelle 3.4), die mit 2 Gew.-% Comonomer synthetisiert wurden, sind zuerst Experimente zur allgemeinen zellulären Aufnahmefähigkeit der Nanopartikel durchgeführt worden. Für die Inkubation wurden die oben genannten Nanopartikel mit und ohne BSA-Bedeckung verwendet. Die Versuche wurden nach Standardprotokoll durchgeführt, die Nanopartikelinkubation erfolgte mit und ohne FCS (10 Vol.-%) und es wurden Inkubationszeiten von 4 h gewählt, da nach diesem Zeitfenster meist schon ein großer Teil der Aufnahmen stattfindet. Die durchflusszytometrischen Experimente sind in Abb. 4.24 dargestellt: HeLa-Zellen (A), MSC (B) und Jurkat-Zellen (C).

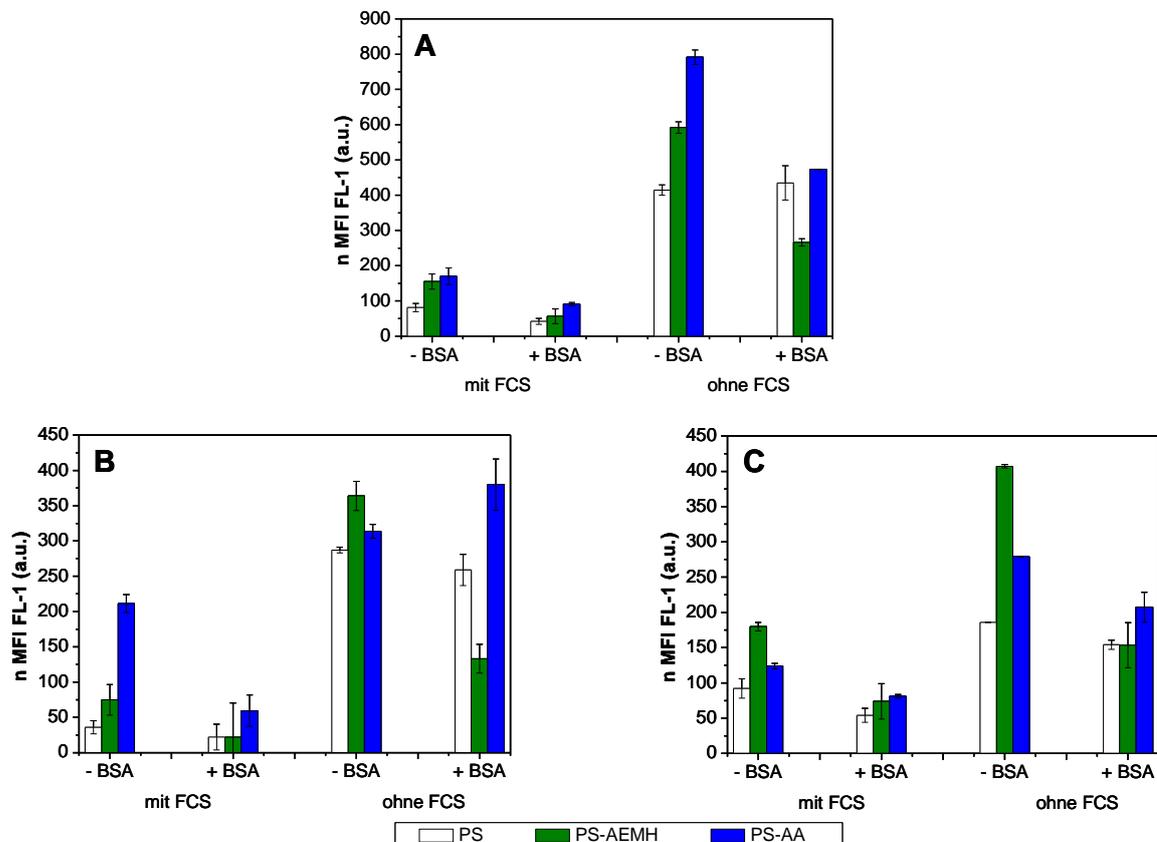


Abb. 4.24: Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Aufnahme von PS, PS-AEMH und PS-AA (jeweils mit (+) und ohne (-) BSA-Bedeckung) nach 4 h Nanopartikelinkubation in DMEM mit und ohne 10 Vol.-% FCS. (A) HeLa-Zellen, (B) MSC und (C) Jurkat-Zellen. Der Median der Fluoreszenzintensität ist normiert. Mittelwerte von Dreifachansätzen mit den jeweiligen Standardabweichungen sind gezeigt.

Generell ist erwartungsgemäß bei allen Zelllinien die Aufnahme ohne additives FCS im Zellkulturmedium höher, ebenso zeigen HeLa-Zellen die insgesamt stärkste zelluläre Aufnahme. HeLa-Zellen (Abb. 4.24 (A)) zeigen für BSA-bedeckte und nicht bedeckte Nanopartikel in Medium mit und ohne FCS die beste zelluläre Aufnahme für PS-AA. Das Ergebnis sollte auf den Einfluss der Carboxylierung der Nanopartikel zurückzuführen sein. Auch bei den MSC (Abb. 4.24 (B)) ist die Aufnahme des carboxylierten Nanopartikels mit und ohne BSA-Bedeckung in FCS-haltigem Medium am stärksten ausgeprägt, nicht jedoch bei der Inkubation in FCS-freiem Medium. PS-AA ohne BSA-Bedeckung wird in FCS-freiem Medium etwas schlechter aufgenommen als PS-AEMH; mit BSA-Bedeckung ist wiederum die Aufnahme von PS-AA am stärksten. Bei den Jurkat-Zellen (Abb. 4.24 (C)) ist sowohl mit und ohne additivem FCS im Medium bei den Nanopartikeln ohne BSA-Bedeckung die Aufnahme des aminofunktionalisierten Nanopartikels PS-AEMH am stärksten. Bei BSA-bedeckten Nanopartikeln wird in Medium mit und ohne FCS der Nanopartikel PS-AA von den Jurkat-Zellen etwas besser aufgenommen als die anderen beiden Nanopartikel. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die folgende Versuchsreihe auf HeLa-Zellen beschränkt, da sie die beste Aufnahme und eindeutige Tendenzen bezüglich der präferierten Aufnahme von PS-AA mit und ohne BSA-Bedeckung zeigten.

Die intrazelluläre Aufnahme in HeLa-Zellen wurde mittels CLSM-Aufnahmen nach 4 (ohne FCS) und 24 h (mit FCS im Zellkulturmedium) nachgewiesen (Abb. 4.25).

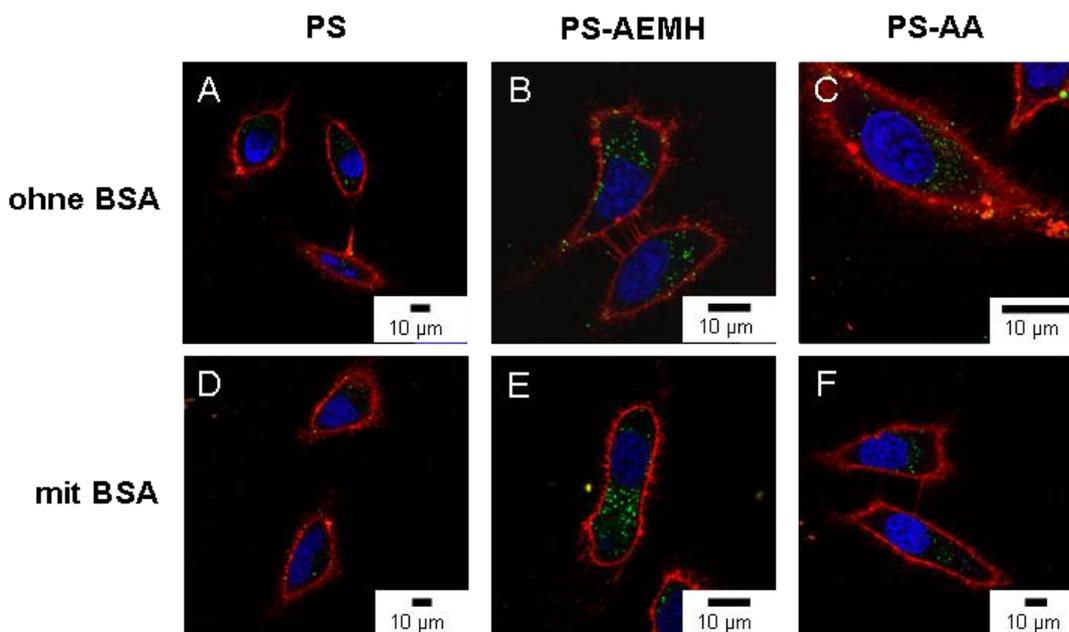


Abb. 4.25: CLSM-Aufnahmen nach 4 h Inkubation mit den Nanopartikeln PS, PS-AEMH und PS-AA, jeweils mit und ohne BSA in FCS-freiem Medium. Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask Orange), die Nanopartikel grün (PMI) und der Zellkern blau (DraQ5).

In Abb. 4.25 (4 h Inkubation, ohne FCS) weisen die HeLa-Zellen eine intrazelluläre Lokalisation der untersuchten Nanopartikel auf. Außerdem wurde eine mögliche Membrananlagerung der Nanopartikel ausgeschlossen. Offensichtlich führt die intrazelluläre Aufnahme von Polystyrol-Nanopartikeln bei HeLa-Zellen nicht zu einer Veränderung der Zellmorphologie im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Negativ-Kontrolle nicht dargestellt). Die Zellen zeigen sich vital während des gesamten Beobachtungszeitraumes von 4 und 24 h. Die Nanopartikel verteilen sich im Zytoplasma der Zelle. Es gibt keine prominenten Anlagerungen der Nanopartikel an den Zellmembranen (illustriert durch die gelbe Überlagerung von rot dargestellter Zellmembran und grün dargestellten Partikeln). Die carboxyl-funktionalisierten Nanopartikel zeigen eine bevorzugte Lokalisation nahe dem Zellkern. Eine Unterscheidung zwischen BSA-bedeckten und unbedeckten Nanopartikeln ist nicht zu erkennen.

CLSM-Aufnahmen von PS, PS-AA und PS-AEMH mit Alexa 594 Fluoreszenz-markiertem BSA wurden durchgeführt, um eine Kolo-kalisation des adsorbierten BSA auf den Nanopartikeln intrazellulär nachzuweisen (siehe 4.3.2.3, Abb. 4.30 und 4.31).

4.3.2 Aufnahmen von BSA-bedeckten Nanopartikeln in HeLa-Zellen mit und ohne additivem fötalem Kälberserum im Zellkulturmedium

Die durchflusszytometrischen Analysen mit HeLa-Zellen wurden mit BSA-bedeckten und nicht bedeckten Nanopartikeln (PS, PS-AEMH und PS-AA) durchgeführt, jeweils mit und ohne 10 Vol.-% FCS im Medium. 2, 4, 8 und 24 h wurden als zeitlich sinnvoll abgestufte Inkubationszeiten gewählt, da die durchschnittliche Zellteilungsrate von HeLa-Zellen bei 48 h^[297] liegt. HeLa-Zellen zeigen nach Inkubation mit den oben genannten Nanopartikeln keine gravierende Zytotoxizität (Abb. 4.26), die auf den Mangel an FCS zurückzuführen ist. Damit ist anzunehmen, dass der Zellstoffwechsel und somit das Nanopartikel aufnehmenverhalten durch eine Inkubation ohne FCS nicht beeinflusst wird.

4.3.2.1 Viabilitätsexperimente

Zeitgleich mit der Bestimmung der Nanopartikelaufnahme wurde eine 7-AAD-Färbung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Zellviabilitätsexperimente sind Abb. 4.26 gezeigt.

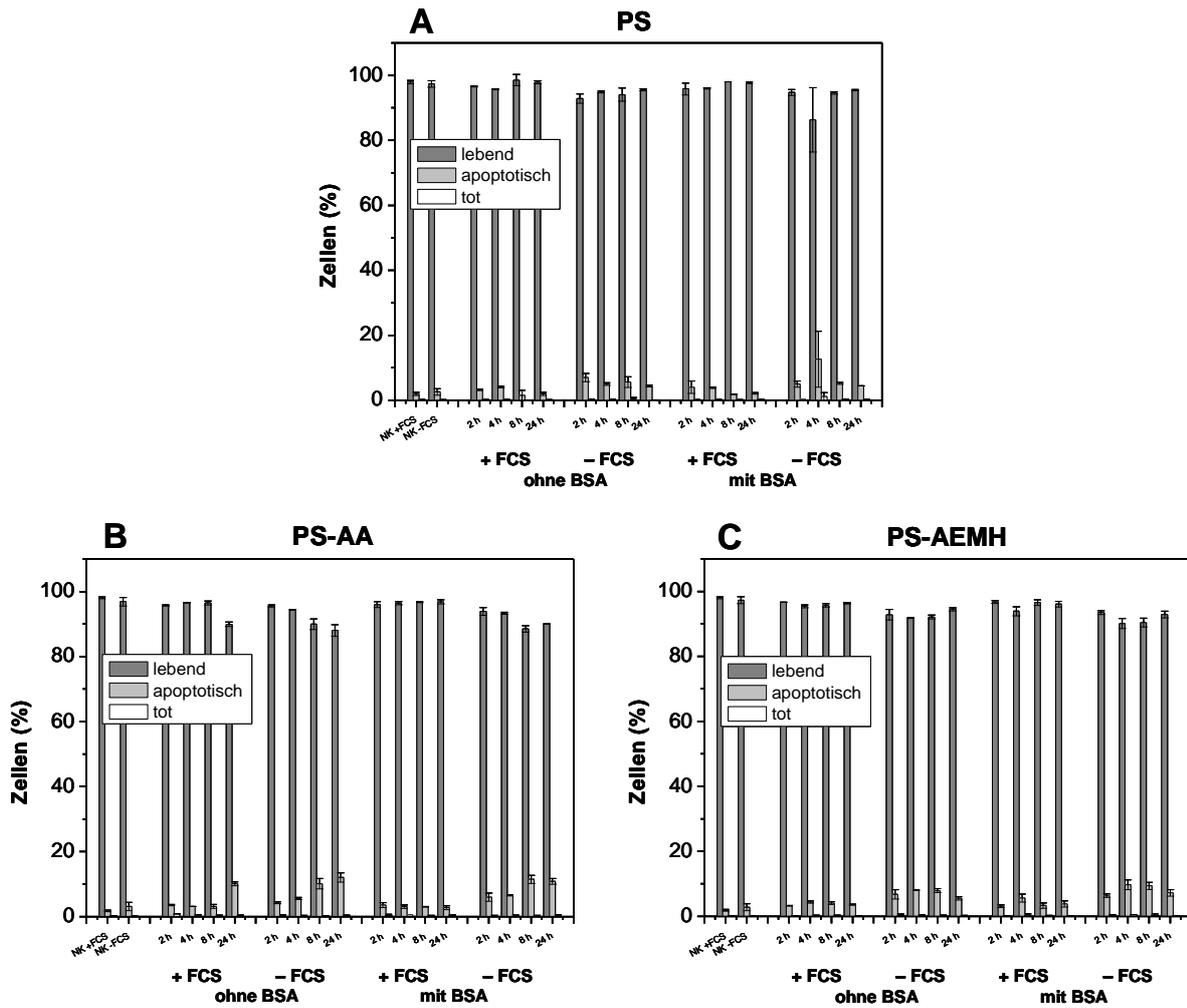


Abb. 4.26: Viabilitätsexperimente (7-AAD-Färbung) mit HeLa-Zellen nach 2, 4, 8 und 24-stündiger Inkubation mit PS (A), PS-AA (B) und PS-AEMH (C), jeweils mit und ohne BSA-Bedeckung und mit (+ FCS) und ohne (- FCS) additivem 10 Vol.-% FCS im Zellkulturmedium. Die Negativ-Kontrollen (NK), die mit und ohne FCS kultiviert wurden, sind zum Vergleich ebenfalls gezeigt. Der prozentuale Anteil der lebenden (dunkelgrau), apoptotischen (hellgrau) und toten Zellen (weiß) ist mit den Standardabweichungen aus den Dreifachansätzen angegeben.

Die Ergebnisse in Abb. 4.26 zeigen keinerlei zytotoxische Effekte der Nanopartikel PS, PS-AEMH und PS-AA auf die Zellviabilität nach Inkubationszeiten von 2, 4, 8 und 24 h. In allen Fällen beträgt der Anteil der vitalen Zellen über 90 %, nahezu der gleiche Prozentsatz wie in der unbehandelten Negativ-Kontrolle. BSA-bedeckte Nanopartikel haben ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität.

Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen nimmt mit zunehmend längeren Inkubationszeiten von 8 und 24 h leicht zu. Dieser Effekt ist bei den HeLa-Zellen, die ohne supplementiertes FCS im Medium inkubiert wurden, ebenfalls zu beobachten, weil ihr Metabolismus durch den Mangel an Serumproteinen beeinträchtigt wird. Dieser Effekt ist für die Zellen, die mit FCS im Medium inkubiert werden, nicht vorhanden.

4.3.2.2 Zellaufnahme in Abhängigkeit einer BSA-Bedeckung mit und ohne additivem FCS

Zunächst werden alle Experimente im folgenden Abschnitt ohne FCS im Medium während der Partikelinkubation durchgeführt (Abb. 4.27 und 4.28 (C) und (D)). Es müssen also keine weiteren Effekte von zusätzlichen Proteinen, die durch das additive FCS im Zellkulturmedium verursacht werden, mit in die Betrachtungen einbezogen werden.

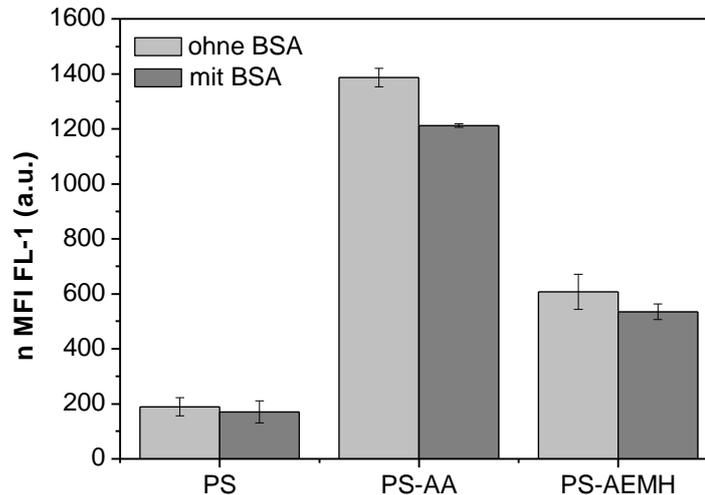


Abb. 4.27: Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Aufnahme von PS, PS-AA und PS-AEMH ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) BSA-Bedeckung in FCS-freiem Medium nach 24 h.

Nanopartikel ohne BSA-Bedeckung zeigen eine leicht höhere Zellaufnahmerate als Nanopartikel mit einer BSA-Korona (siehe vergleichende Diskussion 4.3.2.5). Diese Resultate werden in den Säulendiagrammen in der Abb. 4.27 gezeigt.

Werden die Ergebnisse aus den ITC-Titrations-Experimenten bei pH 6 betrachtet, ergeben sich folgende Zusammenhänge. Der pH-Wert liegt über dem isoelektrischen Punkt von BSA ($I_p = \text{pH } 4,78$)^[244], deshalb wird BSA partiell deprotoniert und hat eine negative Oberflächenladung und infolgedessen dominieren die elektrostatischen Kräfte über die hydrophoben Wechselwirkungen. Der aminofunktionalisierte Nanopartikel PS-AEMH ist partiell protoniert, deshalb adsorbiert BSA aufgrund der Anziehungskräfte (elektrostatische Wechselwirkungen). Der carboxylfunktionalisierte Partikel PS-AA ist deprotoniert; es resultieren Abstoßungskräfte zwischen dem negativ geladenen Nanopartikel und dem negativ geladenen BSA. So wird im Vergleich zum PS-AEMH-Nanopartikel weniger BSA auf dem PS-AA-Nanopartikel adsorbiert. Die von *Baier et al.* mittels ITC bestimmten Bedeckungsgrade der Nanopartikel, die für die Zellaufnahmeexperimente verwendet wurden, sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Charakteristika der Nanopartikel.

Bezeichnung	Durchmesser (nm)		ζ -Potential (mV)		Anzahl funktionelle Gruppen (nm ⁻²)	Bedeckungsgrad (%)
	vor BSA-Titration	nach BSA-Titration	vor BSA-Titration	nach BSA-Titration		
PS	200	225	-8	-28	-	53
PS_AA	190	210	-21	-37	0,63	27
PS_AEMH	170	195	+7	-17	0,14	63

Der Nanopartikel PS-AA zeigt den geringsten Bedeckungsgrad mit 27%, der nicht funktionalisierte PS-Nanopartikel hat einen Bedeckungsgrad von 53% und der PS-AEMH-Nanopartikel zeigt den höchsten mit 63%. Infolge des geringeren Bedeckungsgrades von PS-AA ist der Einfluss der somit durch Proteine schwächer abgeschirmten Carboxylgruppen höher und daher wird eine stärkere Zellaufnahme erwartet. Der Einfluss von funktionellen Gruppen auf die Partikeloberfläche ist bedeutend für das zelluläre Aufnahmeverhalten und die Quanti- und Qualität der adsorbierten Proteine, die auf der Nanopartikeloberfläche die Proteinkorona ausbilden^[79]. Hinzu kommt, dass der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel PS-AA viermal mehr funktionelle Gruppen als der aminofunktionalisierte Nanopartikel PS-AEMH hat (siehe Tabelle 3.4). Dieser Punkt muss bei der Diskussion der folgenden Ergebnisse in Betracht gezogen werden. Ebenso beeinflusst das ζ -Potential der Nanopartikel die zelluläre Aufnahme^[244]: Partikel mit negativem ζ -Potential zeigen eine geringere BSA-Adsorption als Partikel mit positivem ζ -Potential bei einem physiologischen pH von 7,42 und eine geringeren zelluläre Aufnahme. Dies zeigen entsprechend die Ergebnisse der ITC-Experimente in Tabelle 4.2. Außerdem zeigten Studien mit Polystyrol-Nanopartikeln, dass Partikel mit positiver Oberflächenladung vorwiegend Proteine adsorbieren, deren isoelektrischer Punkt < 5,5 ist (das entspricht Serumalbumin $I_p = \text{pH } 4,78$) und bei physiologischem pH somit anionischen Charakter haben. Negativ geladene Partikel adsorbieren hauptsächlich Proteine mit einem isoelektrischen Punkt > 5,5, (entspricht IgG > 7,4), die bei physiologischem pH vorwiegend kationischen Charakter haben^[79, 243] (vgl. 4.2.2.2). Werden alle diese vorausgehend genannten Faktoren in Betracht gezogen, sollte der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel PS-AA die stärkste zelluläre Aufnahme zeigen. In der Tat zeigt der carboxylfunktionalisierte PS-AA-Nanopartikel die stärkste Aufnahme, entsprechend der geringeren Bedeckung mit BSA, der schwächer abgeschirmten funktionellen Gruppen und der insgesamt höheren Anzahl an funktionellen Gruppen im Vergleich zu dem PS-AEMH Nanopartikel, wie nachfolgende Ergebnisse zeigen.

Nach der Zugabe der Partikeldispersion zum Zellkulturmedium entstehen Diffusions- und Sedimentationseffekte neben Interaktionen mit Elektrolyten und anderen Komponenten, die die Partikel genauso wie das BSA auf der Partikeloberfläche beeinflussen^[113, 117]. Wenn Nanopartikel in FCS-freies Medium gegeben werden, sind sie vollständig mit BSA bedeckt. Das BSA, das die Proteinkorona bildet, wird zu einem Anteil in das Zellkulturmedium diffundieren und eine neue Gleichgewichtskonstante wird sich einstellen. Wie von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen wurde, bilden Plasmaproteine oder HSA eine dauerhafte Proteinkorona, auch bei einem Wechsel aus einem biologischen Medium in ein Anderes^[298] oder nach mehreren Waschschritten^[77]. Eine Adsorptionsschicht von Fluoreszenz-markiertem BSA konnte assoziiert mit den Nanopartikeln nach der Zellaufnahme nachgewiesen werden (siehe CLSM-Aufnahmen Abb. 4.31). Es ist zu bedenken, dass in FCS-freiem Medium kein kompetitiver Austausch mit weiteren Proteinen stattfindet, wie es in FCS-haltigem Medium oder Blutplasma der Fall ist^[299]. Von Dutta et al. wurde in Serum-freiem Medium ein anti-inflammatorischer Effekt in Makrophagen mit BSA-bedeckten SWNTs (engl. *single-walled carbon nanotubes*) nachgewiesen, während SWNTs ohne BSA diesen Effekt nicht zeigten^[207].

Die Einflüsse der funktionellen Gruppen, die mit BSA bedeckt wurden und Proteine im Zellkulturmedium führen zu den unterschiedlichen Ausprägungen der dauerhaften Proteinkorona^[240] (siehe 2.1.6) und somit zu den Unterschieden in der Zellaufnahmerate.

In Abb. 4.28 sind durchflusszytometrische Analysen der Nanopartikel PS, PS-AEMH und PS-AA mit und ohne BSA-Bedeckung dargestellt.

Der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel PS-AA zeigt generell die stärkste Aufnahme vor dem aminofunktionalisierten PS-AEMH (Abb. 4.28 (A)-(D)). Der unfunktionalisierte Nanopartikel PS zeigt nur eine geringe zelluläre Aufnahme. Die Hauptursache für die stark erhöhte Zellaufnahme des PS-AA-Nanopartikels sollte die hohe Anzahl an funktionellen Gruppen im Vergleich zu PS-AEMH darstellen.

Generell ist die zelluläre Aufnahmerate in FCS supplementiertem Medium um ein Mehrfaches geringer als im FCS-freien Medium. Bei den Proben mit FCS im Zellkulturmedium hat nach 4 h der größte Teil der zellulären Aufnahme bereits stattgefunden (Abb. 4.28 (A) und (B)); bei den Proben ohne FCS findet zwischen 4 und 8 h Inkubationszeit noch eine ca. eine Verdopplung der zellulären Aufnahmerate statt (Abb. 4.28 (C) und (D)). Eine BSA-Bedeckung der PS-Nanopartikel hat auf diese Beobachtung keinen Einfluss.

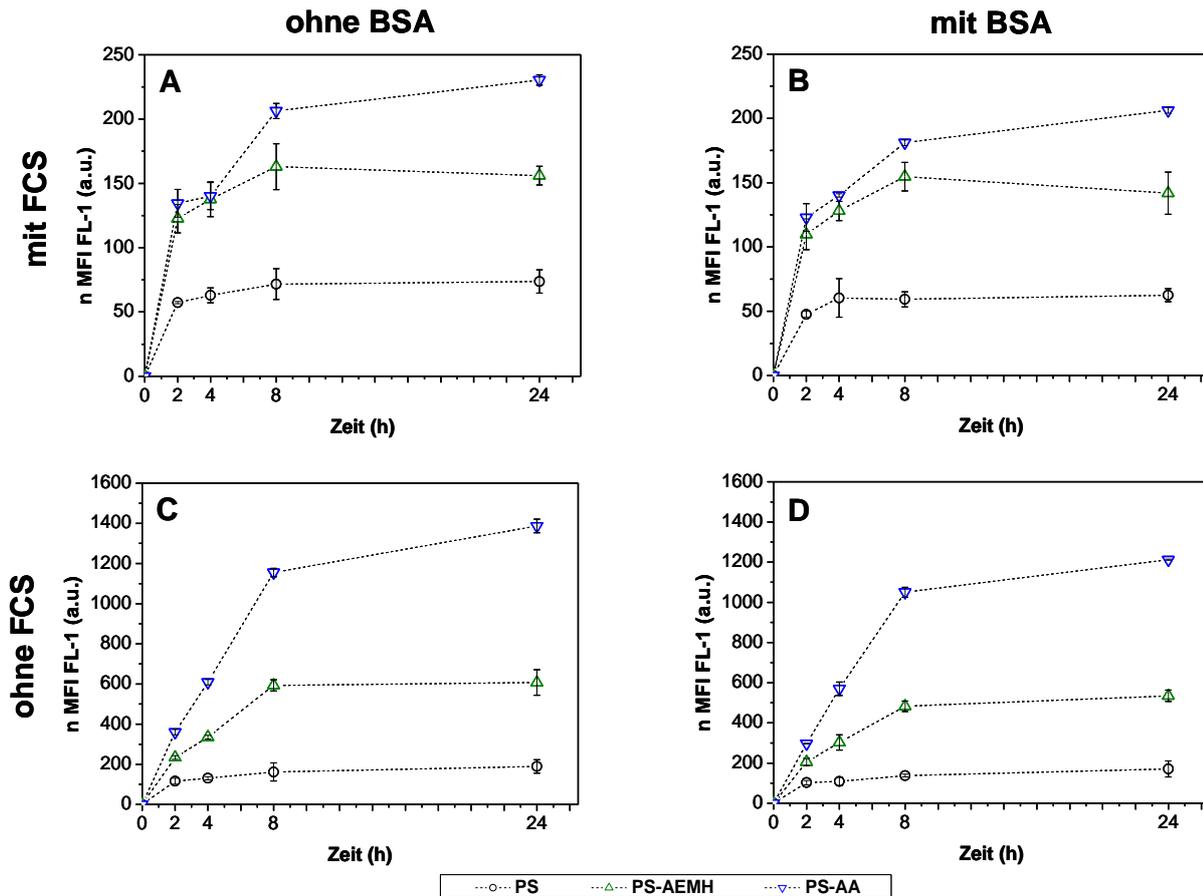


Abb. 4.28: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen der Nanopartikel PS, PS-AEMH und PS-AA nach 2, 4, 8 und 24 h in HeLa-Zellen. Die Experimente wurden mit 10 Vol.-% FCS ((A) und (B)) und ohne additives FCS ((C) und (D)) im Zellkulturmedium durchgeführt. (A) und (C) zeigen Ergebnisse mit Nanopartikeln ohne BSA-Bedeckung und (B) und (D) mit BSA-Bedeckung. Der normierte Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ist aufgetragen. Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachansätzen sind gezeigt.

Bei einem Vergleich der Nanopartikel-Inkubationsexperimente mit und ohne FCS im Zellkulturmedium nimmt die zelluläre Aufnahme für PS-AEMH ca. um das 2-4 fache (zwischen 2 und 24 h) und ca. dem 4-8 fachen (zwischen 2 und 24h) für PS-AA zu. Der Einfluss der additiven Proteine im Zellkulturmedium ist somit bedeutend und abhängig von der Funktionalisierung des Nanopartikels. Ein Wechsel zum FCS-freien Medium führt für den PS-Nanopartikel lediglich zu einer Verdopplung der zellulären Aufnahme.

Die Gegenwart der BSA-Korona auf der Nanopartikeloberfläche führt zu einer leicht erniedrigten zellulären Aufnahme in FCS-freiem Medium (vgl. Abb. 4.28 (C) und (D)), insbesondere für die beiden funktionalisierten Nanopartikel. Diese Beobachtung kann auch für die BSA-bedeckten funktionalisierten Nanopartikel im FCS-haltigen Medium gemacht werden (vgl. Abb. 4.28 (A) und (B)); die Unterschiede sind allerdings äußerst gering ausgeprägt.

Die Verhältnisse (Tabelle 4.3) der zellulären Aufnahme­raten der unterschiedlich geladenen Nanopartikel differieren mit fortschreitender Inkubationszeit (nach 8 und 24 h) in FCS-freiem Medium zunehmend, wenn sich die stabile sogenannte dauerhafte Proteinkorona ausbildet (engl. *long-lived corona*)^[8, 299] hat.

Tabelle 4.3: Verhältnisse der zellulären Aufnahme­raten (n MFI (a.u.)) von HeLa-Zellen in Bezug auf den un­funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikel (PS = 1). Die Daten der Tabelle stammen aus der Experimentreihe mit und ohne FCS im Zellkulturmedium, die in Abb. 4.28 gezeigt ist.

Inkubationsdauer (h)		Probenbezeichnung	mit FCS (Verhältnisse der n MFI)	ohne FCS (Verhältnisse der n MFI)
2	- BSA	PS	1	1
		PS-AEMH	2,14	2,01
		PS-AA	2,35	3,11
	+ BSA	PS	1	1
		PS-AEMH	2,3	2
		PS-AA	2,58	2,7
4	- BSA	PS	1	1
		PS-AEMH	2,19	2,57
		PS-AA	2,23	4,66
	+ BSA	PS	1	1
		PS-AEMH	2,12	2,8
		PS-AA	2,32	5,26
8	- BSA	PS	1	1
		PS-AEMH	2,27	3,67
		PS-AA	2,88	7,14
	+ BSA	PS	1	1
		PS-AEMH	2,61	3,51
		PS-AA	3,06	7,63
24	- BSA	PS	1	1
		PS-AEMH	2,12	3,21
		PS-AA	3,13	7,33
	+ BSA	PS	1	1
		PS-AEMH	2,27	3,13
		PS-AA	3,3	7,09

Die Verhältnisse der zellulären Aufnahme­rate von PS : PS-AEMH : PS-AA (Tabelle 4.3) verändern sich in FCS-freiem Medium von ca. 1 : 2,0 : 3,1 (nach 2 h) zu ca. 1 : 3,1 : 7,1 (nach 24 h). Bei Betrachtung der Verhältnisse ohne FCS im Zellkulturmedium ist auffällig, dass sich das Verhältnis von PS-AEMH zu PS weitaus geringer ändert zwischen 2 und 24 h, als das Verhältnis von PS-AA zu PS. Für diesen Effekt muss die Carboxylfunktionalisierung

ausschlaggebend sein, besonders bei längeren Inkubationszeiten in FCS-freiem Medium. Werden die Ergebnisse mit additivem FCS im Medium betrachtet, zeigen die Verhältnisse der Zellaufnahmeraten einen geringeren Unterschied der drei Nanopartikel im Vergleich zum FCS-freien Medium. Nach längeren Inkubationszeiten gibt es keine Veränderung in den Aufnahmeverhältnissen (Tabelle 4.3) in Bezug auf die Nanopartikelaufnahmerate, wie es in den Experimenten ohne FCS beobachtet wurde. Die Aufnahmeverhältnisse verändern sich kaum von PS : PS-AEMH : PS-AA nach 2 und 4 h von ca. 1 : 2,3 : 2,6 zu ca. 1 : 2,3 : 3,3 nach 8 und 24 h (Tabelle 4.3). Die zusätzlichen Proteine haben nivellierende Effekte für die funktionellen Gruppen. Die Proteine mit niedrigeren Austauschraten und höheren Affinitäten zur Partikeloberfläche verdrängen BSA^[79]. Auch hier zeigt der PS-AA-Nanopartikel die stärkste Zellaufnahmerate aufgrund seiner hohen Anzahl an funktionellen Gruppen. Ein Effekt durch die vorausgehenden BSA-Bedeckung der Nanopartikel auf die Verhältnisse der zellulären Aufnahmeraten zeigt sich, sowohl im FCS-freien als auch im FCS-haltigen Medium, nicht explizit.

4.3.2.3 Verwendung von Fluoreszenz-markiertem BSA

Mit folgenden Experimenten sollte der Verbleib von BSA auf den Nanopartikeln deutlich gemacht werden.

Fluoreszenz-markiertes BSA (BSA Alexa Fluor 594) wurde analog den bisher durchgeführten Versuchen auf die eingesetzten Nanopartikel auftitriert.

In Abb. 4.29 ist die im FL-5 detektierte Fluoreszenzintensität des Fluoreszenz-markierten BSA bei Inkubation mit den bedeckten Nanopartikeln PS, PS-AEMH und PS-AA ohne FCS gezeigt.

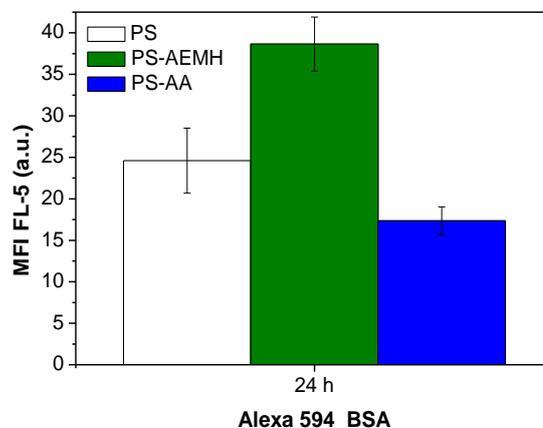


Abb. 4.29: Durchflusszytometrische Analyse mit Auftragung des Fluoreszenzsignals von PS-AEMH und PS-AA (FL-1, PMI) und von dem Fluoreszenz-markierten BSA (FL-5, BSA Fluor Alexa 594) jeweils mit PS-AEMH und PS-AA bedeckt in HeLa-Zellen nach 24 h. Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ist aufgetragen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Dreifachansätze sind gezeigt.

Insgesamt wird nur eine geringe Fluoreszenz detektiert, PS-AEMH erzeugt die höchste Fluoreszenzintensität, gefolgt von PS und PS-AA (Abb. 4.29). Diese Reihenfolge korreliert mit den mittels ITC berechneten Bedeckungsgraden (Tabelle 4.2). Die durchflusszytometrischen Daten erlauben den Schluss, dass PS-AEMH, bedingt durch die Adsorption von BSA auf der Nanopartikeloberfläche (und den höchsten Bedeckungsgrad), am meisten BSA, sozusagen „partikelvermittelt“, in die Zellen einbringt. Hierbei ist aber weder die Anzahl der zellulär aufgenommenen Nanopartikel, noch die jeweilige spezifische Oberfläche berücksichtigt. Diese durchflusszytometrischen Analysen können dementsprechend nur als Tendenzen gewertet werden.

Folgend sind nun die Ergebnisse der CLSM-Experimente mit dem Fluoreszenz-markierten BSA (BSA Alexa Fluor 594) gezeigt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach dem oben erwähnten standardisierten Verfahren. In Abb. 4.30 sind die CLSM-Aufnahmen der Negativ-Kontrollen zu den einzelnen Zeitpunkten im entsprechenden Medium (4 h ohne FCS, 24 h ohne und mit FCS) gezeigt.

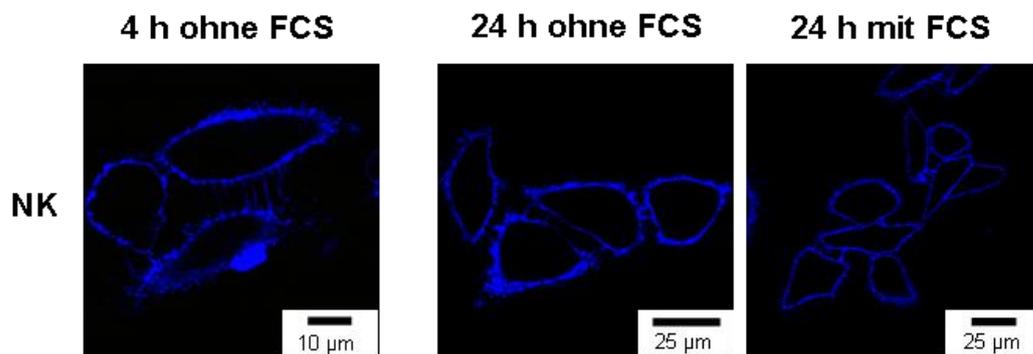


Abb. 4.30: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 4 h ohne FCS (links), 24 h ohne FCS (mitte) und 24 h mit FCS (rechts). Alle Aufnahmen sind Negativ-Kontrollen, die nicht mit Nanopartikeln inkubiert wurden. Zellmembran ist blau dargestellt (CellMask Deep Red).

Alle Zellen in Abb. 4.30, die als Negativ-Kontrollen dienen, erscheinen vital und sind morphologisch nicht verändert.

In Abb. 4.31 sind die CLSM-Aufnahmen der mit dem Fluoreszenz-markierten BSA-bedeckten Nanopartikel dargestellt. Das Fluoreszenz-markierte BSA ist rot dargestellt. Die Nanopartikel (grün) werden gut aufgenommen, vor allem nach Inkubation für 4 und 24 h ohne FCS. Die zelluläre Aufnahme nach 24 h mit FCS im Medium ist generell niedriger. Ebenso ist zu beobachten, dass alle mit BSA-bedeckten Nanopartikel bei Inkubation mit FCS eine deutlich geringere Kolokalisation (gelbe Färbung, durch Überlagerung von rot (BSA) und grün (Nanopartikel)) mit den intrazellulär aufgenommenen Nanopartikeln aufweisen; es wird also weniger mit den Nanopartikeln assoziiertes BSA ins Zellinnere aufgenommen. Ursache

können hierfür Austauschprozesse des BSA mit anderen Proteinen des FCS sein, so dass sich die Zusammensetzung der Nanopartikel-Korona verändert und weniger des ursprünglich adsorbierten BSA auf der Nanopartikeloberfläche verbleibt.

Bei einer Inkubation ohne FCS ist sowohl nach 4 als auch nach 24 h eine deutliche intrazelluläre rote Färbung bzw. eine Kolokalisation mit den Nanopartikeln (gelb) zu detektieren. Das BSA liegt teilweise neben oder auf den Nanopartikeln, z. B. bei Aufnahme (B) und (D) (Abb. 4.31) zu sehen, oder bei (O) und (R), direkt kolokalisiert (gelb), vor. Bei diesen Proben sind deutliche Assoziationen bzw. Kolokalisationen der intrazellulären Nanopartikel PS und PS-AEMH mit BSA zu detektieren. Bei PS-AA ((Abb. 4.31) (H) und (J)) ist dagegen sichtbar weniger Fluoreszenz-markiertes BSA intrazellulär mit den Nanopartikeln assoziiert. Hier liegen der größte Anteil der PS-AA-Nanopartikel nach 4 und 24h nicht kolokalisiert mit BSA vor.

Diese Ergebnisse bestätigen die Berechnungen der Bedeckungsgrade. Der Nanopartikel PS-AEMH mit dem höchsten errechneten Bedeckungsgrad mit 63% zeigt die stärkste Assoziation bzw. Kolokalisation mit dem Fluoreszenz-markierten BSA, gefolgt von PS (ermittelter Bedeckungsgrad: 53%). PS-AA mit dem geringsten Bedeckungsgrad von 27% zeigt schwächste Kolokalisation mit BSA. In FCS-freiem Medium sind diese Beobachtungen der intrazellulären Kolokalisation der Nanopartikel mit BSA auch noch nach 24 h zu beobachten. Dies zeigt, dass eine Adsorptionsschicht von BSA dauerhaft intrazellulär auf den Nanopartikeln assoziiert sein kann, eine dauerhafte Korona auf der Nanopartikeloberfläche ausbildet und diese intrazellulär mit den Nanopartikeln assoziiert bleibt. Dies wurde für Plasmaproteine^[246] auch von anderen Arbeitsgruppen entsprechend beobachtet. In einem komplexeren biologischen Milieu, wie dem Zellkulturmedium mit FCS, konnte eine deutlich geringere Kolokalisation (Abb. 4.31 (F), (L), (U)) aufgrund der dynamischen Veränderung der Proteinkorona festgestellt werden. Kritisch zu erwähnen ist, dass das Fluoreszenz-markierte BSA möglicherweise ein anderes Adsorptionsverhalten auf den Nanopartikeln wie natives BSA hat. Weiterführend können mit verschiedenen Fluoreszenz-markierten Proteinen solche Experimente durchgeführt werden, um die dynamischen Austauschprozesse und den Einfluss der Proteinkorona auf die zelluläre Aufnahme der Nanopartikel zu untersuchen.

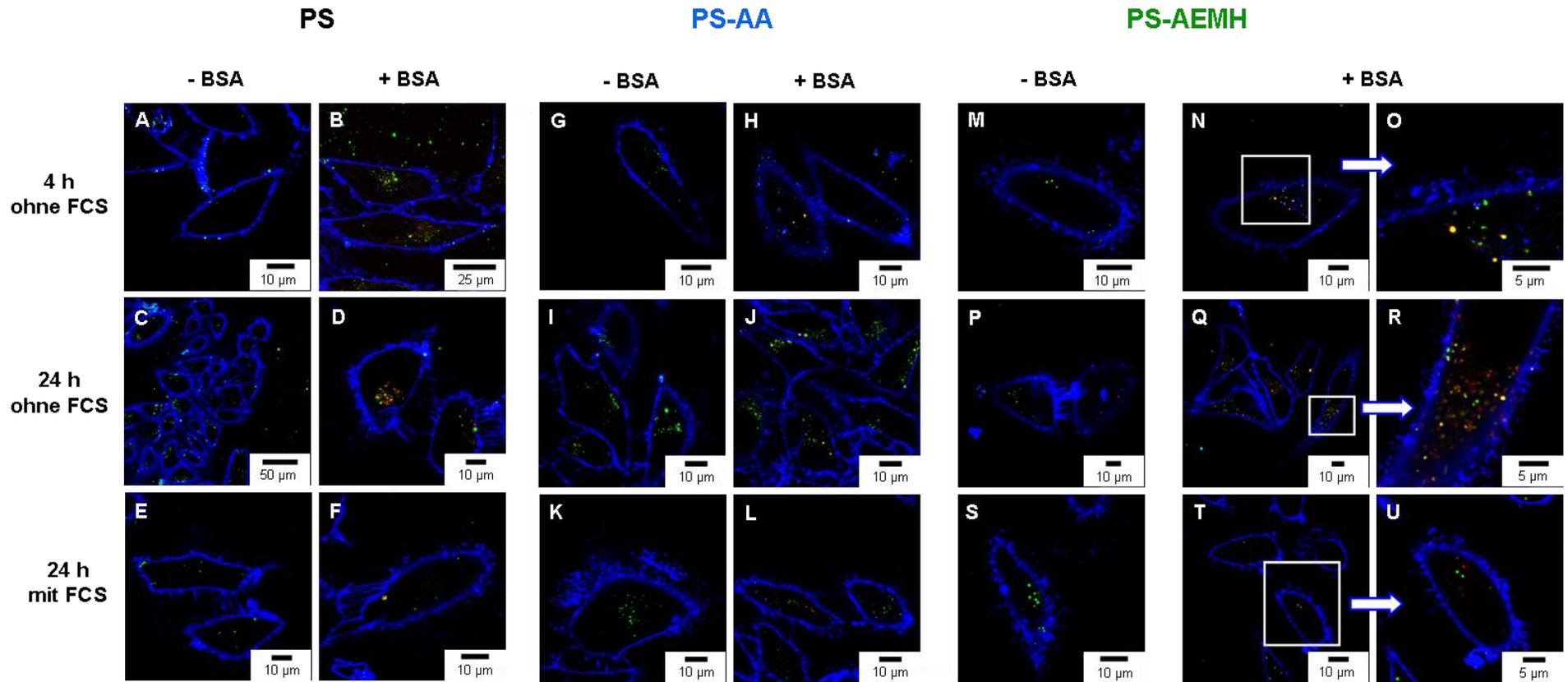


Abb. 4.31: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen, die mit den Nanopartikeln PS ((A)-(F)), PS-AA ((G)-(L)) und PS-AEMH ((N)-(U)) inkubiert wurden, jeweils ohne (-BSA) und mit BSA (+BSA)-Bedeckung für 4 h (ohne FCS) und 24 h (ohne und mit FCS). Die Zellmembran ist blau (CellMask Deep Red), Nanopartikel grün (PMI) und Fluoreszenzmarkiertes BSA rot (BSA Alexa Fluor 594) dargestellt.

4.3.2.4 Zelluläre Aufnahme in Leukozyten in peripherem Vollblut in Abhängigkeit einer BSA-Bedeckung

Weiterführend zu den bisherigen durchflusszytometrischen Experimenten mit den BSA-bedeckten Nanopartikeln in Zellkultur werden in diesem Abschnitt Analysen in peripherem Vollblut nach der etablierten Methode aus Abschnitt 4.2 durchgeführt. In Abb. 4.32 ist die zelluläre Aufnahme von PS, PS-AA, und PS-AEMH mit und ohne BSA-Bedeckung nach 2, 4 und 8 h dargestellt. Die Proben wurden mit K_3EDTA antikoaguliert, weil zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimentreihe die vergleichenden Versuchsreihen von Li-Heparin mit K_3EDTA (Abschnitt 4.2.2.1) noch nicht abgeschlossen waren und somit Li-Heparin zu diesem Zeitpunkt noch nicht als Antikoagulans der Wahl für Partikelinkubationsexperimente in peripherem Vollblut festgelegt war. Die eingesetzten Konzentration betragen $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. In peripherem Vollblut ist kein Unterschied bei der zellulären Aufnahme von Nanopartikeln mit und ohne BSA-Bedeckung zu beobachten. In Anbetracht der Menge an Proteinen und weiteren Substanzen in Vollblut zeigt eine Bedeckung mit BSA keine weiteren Auswirkungen.

$CD14+$ Monozyten zeigen erwartungsgemäß (wie bei den oben erwähnten Experimenten) die größte Aufnahme für den carboxylfunktionalisierten Nanopartikel PS-AA sowie eine Steigerung der zellulären Aufnahme über die gesamte betrachtete Inkubationsperiode zwischen 2 und 8 h. Die Aufnahmesteigerung in den ersten 4 h ist aber deutlich größer als zwischen 4 und 8 h. Dies wurde bereits bei den Experimenten mit den ionisch stabilisierten Nanopartikeln (vgl. 4.2.2) festgestellt. Der aminofunktionalisierte Nanopartikel PS-AEMH zeigt eine deutlich schwächere Aufnahme durch $CD14+$ Monozyten, er liegt auf fast genauso niedrigem Niveau wie der unfunktionalisierte Nanopartikel PS.

$CD16+$ Neutrophile zeigen im Vergleich zu $CD14+$ Monozyten eine deutlich schwächere zelluläre Aufnahme (ebenso in 4.2.2 beobachtet), auch hier wird der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel PS-AA am stärksten aufgenommen. Dabei ist insbesondere bei fortgeschrittener Inkubationszeit, zwischen 4 und 8 h, eine zelluläre Aufnahmesteigerung bei den $CD16+$ Neutrophilen festzustellen. Auch dieser Effekt wurde bereits bei den in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Experimenten beobachtet.

Bei den beiden getesteten Lymphozyten-Populationen zeigen die $CD3+$ T-Zellen keine bis eine sehr geringe Aufnahme der eingesetzten Nanopartikel und keine Veränderungen bei längeren Inkubationszeiten. Die $CD19+$ B-Zellen zeigen ebenfalls nur eine sehr schwache Aufnahme für PS, PS-AA und PS-AEMH, aber mit zunehmender Inkubationszeit eine leichte Steigerung der zellulären Aufnahme.

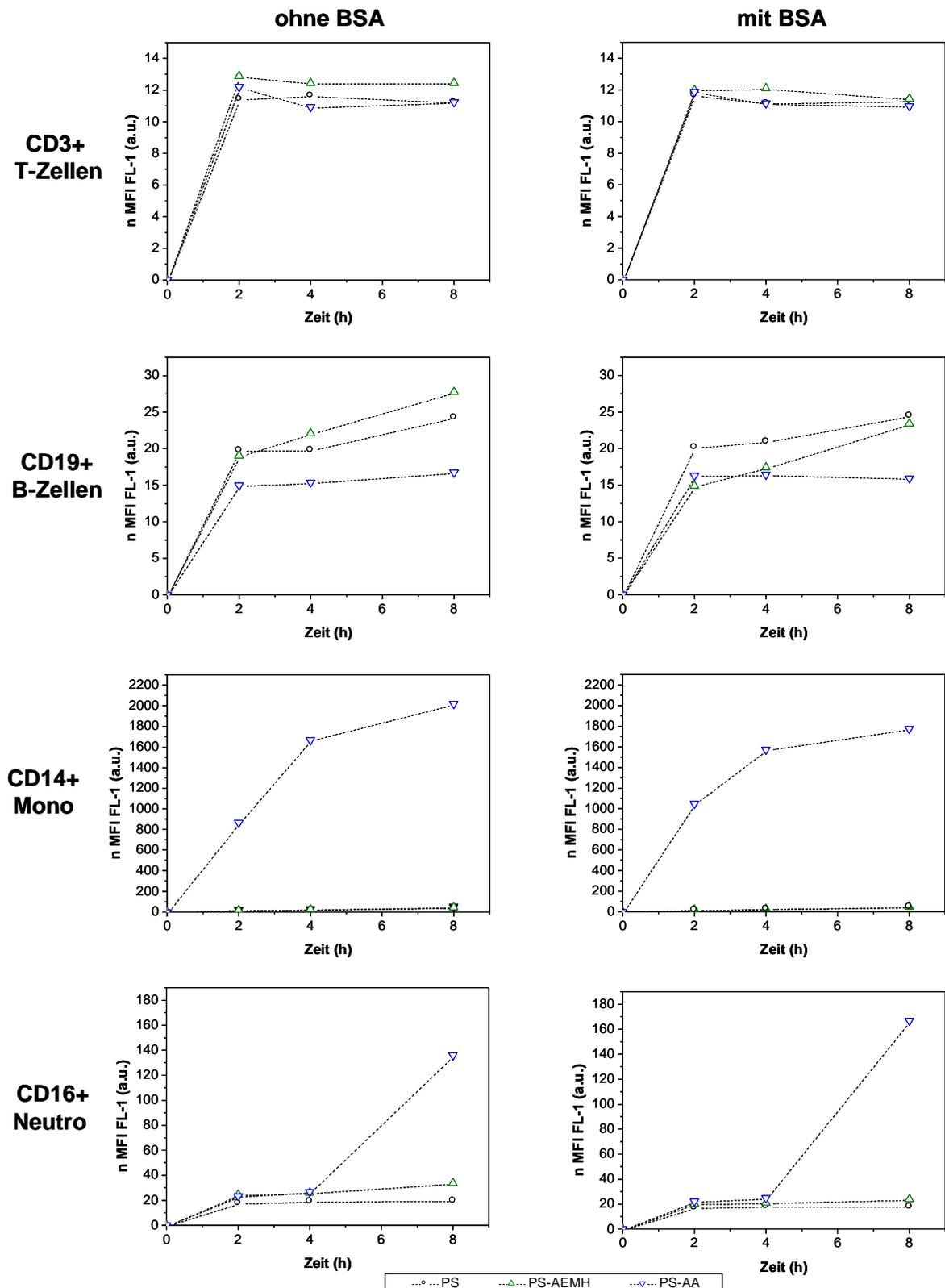


Abb. 4.32: Durchflusszytometrische Analyse von peripherem Vollblut, antikoaguliert mit K_3EDTA . Die Nanopartikel PS, PS-AEMH und PS-AA wurden mit und ohne BSA-Bedeckung eingesetzt ($300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Nach 2, 4 und 8 h wurden CD3+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen, CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophile analysiert. Der normierte Median (n MFI) der Fluoreszenzintensität (Einfachansätze) ist aufgetragen.

4.3.2.5 Vergleichende Diskussion

BSA kann als Modellprotein für die Untersuchung der Wechselwirkungen von geladenen und ungeladenen Partikeln (funktionalisierte und unfunktionalisierte Nanopartikel) mit Proteinen im Allgemeinen dienen. Ähnliche Adsorptionseffekte können den Nanopartikeln, in Abhängigkeit von ihren unterschiedlichen funktionellen Gruppen, auch in anderen biologischen Milieus, z.B. dem Blutplasma in dem Albumin der Hauptproteinbestandteil ist, widerfahren. Mit den vorausgehenden ITC-Experimenten konnten die Wechselwirkungen von unfunktionalisierten und verschiedenen funktionalisierten geladenen Polystyrol-Nanopartikeln und BSA untersucht werden^[21]. Die funktionellen Gruppen der Nanopartikel beeinflussen den Adsorptionsprozess von BSA. Amino- und carboxylfunktionalisierte Nanopartikel verursachen verschiedene elektrostatische Wechselwirkungen zwischen BSA und der Nanopartikeloberfläche.

HeLa-Zellen zeigen eine Zellaufnahme sowohl von geladenen als auch ungeladenen Nanopartikeln. In diesen Experimenten zeigten die carboxylfunktionalisierten Nanopartikel eine stärkere Aufnahme als die aminofunktionalisierten Nanopartikel. Die Aufnahme der unfunktionalisierten Nanopartikel ist niedriger als die Zellaufnahme der funktionalisierten Nanopartikel. Nanopartikel mit einer BSA-Bedeckung zeigen eine leicht niedrigere zelluläre Aufnahme als Nanopartikel ohne BSA-Bedeckung. Dies wurde auch schon von *Ogawara et al.* (HSA-Bedeckung)^[296] und *Wilhelm et al.*^[247] gezeigt. Der mittels ITC ermittelte Bedeckungsgrad mit BSA ist für den anionischen PS-AA-Nanopartikel am niedrigsten (27%). BSA trägt vorwiegend negative Oberflächenladungen (bei einem pH-Wert > des isoelektrischen Punktes von BSA mit 4,78), welche die negativen Oberflächenladungen der carboxylfunktionalisierten Nanopartikel abstößt. *Gessner et al.* zeigten, dass Proteine mit einem isoelektrischen Punkt < 5,5 bevorzugt auf Nanopartikeln mit positiven Oberflächenladungen adsorbieren^[243]. Dies führt zu einer geringeren Proteinadsorption und zu einer schwächeren Abschirmung der Carboxyl-Gruppen auf der Nanopartikeloberfläche von PS-AA und infolgedessen zu stärkeren Wechselwirkungen mit der Zelloberfläche. Den höchsten Bedeckungsgrad zeigt der kationische Nanopartikel PS-AEMH mit 63%. Die BSA-Adsorption führt zu einer Nivellierung des ζ -Potentials der untersuchten Nanopartikel auf negative Werte (in Tabelle 4.2 gezeigt). *Ehrenberg et al.* zeigten diesen Effekt ebenfalls für HSA mit unterschiedlich funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln^[271]. Dem ζ -Potential des unbedeckten Nanopartikels kommt somit der zelluläre Aufnahme bzw. Assoziation keine entscheidende Rolle zu. *Ehrenberg et al.* zeigten auch, dass Nanopartikel mit Oberflächenladungen mehr HSA adsorbieren als ungeladene oder PEGylierte Nanopartikel. Ebenso wurde

von ihnen gezeigt, dass diese funktionalisierten Nanopartikel mit hohen HSA-Adsorptionsraten die höchsten Assoziationsraten mit humanen Endothelzellen haben. Diese Resultate bestätigen die Resultate der vorausgehend beschriebenen Versuchsreihen. Eine Funktionalisierung der Nanopartikel bzw. daraus resultierende Ladungseffekte sind bedeutender für Nanopartikel-Zellinteraktionen bzw. eine zelluläre Aufnahme, als adsorbierte Proteinschichten.

Werden BSA-bedeckte Nanopartikel zusammen mit FCS in Zellkultur inkubiert, führen die weiteren additiven Proteine zu einer Reduzierung der zellulären Aufnahme.

Weitere Proteine des FCS werden adsorbiert und desorbiert und verändern die vorausgehende Proteinkorona. Proteine auf der Nanopartikeloberfläche reduzieren die zelluläre Aufnahme^[248]. Wie die CLSM-Aufnahmen mit Fluoreszenz-markiertem BSA zeigen, bildet sich durch eine vorausgehende Bedeckung der Nanopartikel eine dauerhafte BSA-Korona aus und diese ist auch noch Stunden nach der Zellaufnahme unmittelbar mit den Nanopartikeln assoziiert. Diese Ausbildung einer dauerhaften Proteinadsorptionsschicht wurde für die Adsorption von Plasmaproteinen von *Salvati et al.* ebenfalls in CLSM-Analysen gezeigt^[246]. *Maffre et al.* zeigten, dass eine HSA-Bedeckung kein Gleichgewichtsprozess ist, sondern dass nach Entfernung der HSA-Lösung 50% des gebundenen HSA auf den Nanopartikel verbleiben^[245]. *Ehrenberg et al.*^[271] und *Walczyk et al.*^[77] zeigten ebenfalls, dass FCS bzw. Plasmaproteine auch nach mehreren Waschschritten eine dauerhafte Korona auf den Nanopartikeln ausbilden. Bei einer Inkubation der BSA-bedeckten Nanopartikel in peripherem Vollblut zeigen diese Partikel aber keinen Unterschied zu den Nanopartikeln ohne BSA-Bedeckung hinsichtlich der zellulären Aufnahme in Leukozyten. Der Einfluss der Komponenten des biologischen Milieus nivelliert diese Unterschiede.

Wie die Ergebnisse zeigen, kann eine vorausgehende Bedeckung der Nanopartikel mit einer BSA-Adsorptionsschicht einen Einfluss auf die Formierung der Proteinkorona der Nanopartikel bei Kontakt mit biologischem Medium bzw. FCS in Zellkultur haben und die zelluläre Aufnahme insgesamt reduzieren. Für eine Inkubation in peripherem Vollblut und Aufnahme in Leukozyten konnte dies nicht gezeigt werden.

Proteine nivellieren Ladungseffekte von amino- und carboxylfunktionalisierten Nanopartikeln, wie die Experimente mit additivem FCS im Medium zeigen. Im Vergleich zu den Experimenten, die ohne additives FCS im Medium durchgeführt wurden, sind die Unterschiede der zellulären Aufnahmeverhältnisse der Nanopartikel untereinander deutlich geringer (Tabelle 4.3). Der Einfluss der funktionellen Gruppen bleibt entscheidend, auch wenn Proteine auf der Nanopartikeloberfläche adsorbieren.

4.4 Zellaufnahmen von Nanokapseln aus diversen Monomeren und biokompatiblen Makromolekülen

Nanokapseln, die mit dem inversen Miniemulsionspolymerisationsverfahren hergestellt werden, eignen sich als Wirkstofftransportsysteme (engl. *drug carrier systems*) für hydrophile Wirkstoffmoleküle. Diese Nanokapseln können mit einer großen Anzahl von Wirkstoffmolekülen beladen werden, die im Zielgewebe freigesetzt werden können. Auf diese Weise können auch schwach wirksame Substanzen, die nur in hohen Konzentrationen eine Wirkung aufweisen (beispielsweise in Tumorzellen eine ausreichende Zytotoxizität erreichen), in ausreichend hohen Konzentrationen in den Zielzellen angereichert werden. Große Mengen eines Wirkstoffes können zeitgleich in die Zielzellen gelangen oder es wäre auch möglich, zwei synergistisch wirkende Arzneistoffe mit den Nanokapseln zeitgleich in die Zellen zu liefern. Die eingekapselten Substanzen werden auf dem Transportweg in die Zielzellen vor Abbau (beispielsweise enzymatisch oder durch Hydrolyse) geschützt und gleichzeitig die Nebenwirkungen reduziert. Das Zytostatikum Doxorubicin besitzt beispielsweise starke kardiotoxische Nebenwirkungen und zeigt durch die Einbettung in Liposomen deutlich reduzierte Nebenwirkungen^[300]. An nanopartikulären Wirkstofftransportsystemen aus diversen Materialien, die Doxorubicin und andere Wirkstoffe verkapseln, wird geforscht^[301-303]. Eine Funktionalisierung der Nanokapseln mit Antikörpern oder Proteinen ist ebenso für einen aktiven Wirkstofftransport möglich (siehe 2.1.3.4). Hierzu ist auch eine geringe Anzahl an Oberflächenstrukturen auf den Zielzellen unter Umständen ausreichend, um mit den funktionellen Gruppen auf den Nanokapseln zu interagieren (vgl. 2.1.3.4 und 4.4.4.6). In den Abschnitten 4.4.3 und 4.4.4 sind Experimente zur zellulären Aufnahme von diversen mit Folsäure funktionalisierten Nanokapseln beschrieben. Durch die kovalente Kopplung von Folsäure auf den Nanokapseln soll untersucht werden, ob dadurch eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme in die FR α -positiven HeLa-Zellen erreicht werden kann.

Im folgenden Kapitel werden Zellexperimente mit diversen Polyurethan/-harnstoff-Nanokapseln und Polyharnstoff-Nanokapseln beschrieben, die von Frau Dr. Grit Baier mit dem inversen Miniemulsionspolymerisationsverfahren synthetisiert wurden. Es wurden dabei verschiedene Monomere und diverse Makromoleküle und Polysaccharide eingesetzt, die biokompatibel sind und zum Teil körpereigene Substanzen darstellen (wie Hyaluronsäure und Heparin). In den in diesem Kapitel beschriebenen Zellversuchen mit diversen Nanokapseln wird ein hydrophiler Fluoreszenzfarbstoff (CyTM5 Mono NHS-Ester oder SR 101) anstatt eines hydrophilen Wirkstoffes eingekapselt. Auf das entsprechende, zur Nanokapsel-

herstellung eingesetzte Material und dessen biologische Eigenschaften, die eine Verwendung als biokompatibles Wirkstofftransportsystem ermöglichen, wird im entsprechenden Abschnitt Bezug genommen.

4.4.1 Hyaluronsäure-Nanokapseln

Hyaluronsäure (HS) ist ein hochmolekulares lineares Glykosaminoglykan, das intrazellulär, auf Zelloberflächen sowie überwiegend in der extrazellulären Matrix im Zellzwischenraum vorkommt^[304]. HS besteht aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten von (- β -1,3-N-Acetyl-D-glucosamin- β -1,4-D-Glucuronsäure-)_n (Abb. 4.33). Pro Disaccharideinheit hat es eine Carboxylgruppe und trägt deshalb bei physiologischem pH eine negative Oberflächenladung. Dieses lineare Polysaccharid kann ein Molekulargewicht von 6-8 MDa erreichen.

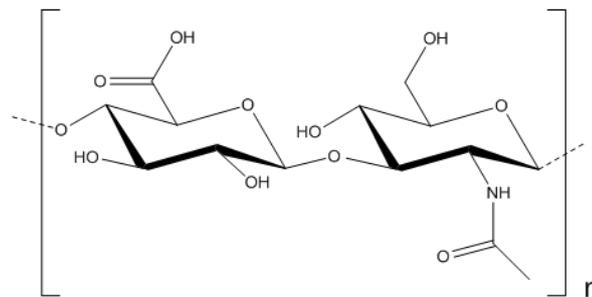


Abb. 4.33: Strukturformel von Hyaluronsäure.

Hyaluronsäure ist ein Biopolymer, das in niedrigen Konzentrationen ubiquitär vorkommt. Allerdings werden besonders hohe Gewebkonzentrationen beispielsweise während der Embryogenese vorgefunden. Generell wird HS bei Gewebewachstum und Wundheilungsvorgängen von den Zellen des betroffenen Gewebes und Endothelzellen vermehrt sezerniert. HS wirkt inflammatorisch auf die Zellproliferation und -migration in dem betroffenen Gewebe und stimuliert die Wundgranulation.

Auf zellulärer Ebene wird die HS-Biosynthese unmittelbar vor der Mitose gesteigert, dadurch wird es den Zellen ermöglicht, sich von ihren Nachbarzellen und der umgebenden zellulären Matrix zu lösen^[305-307]. Die der Mitose vorausgehende Erhöhung der HS-Konzentration erhöht die Zellmotilität^[308-309] und steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Bewegung von metastasierenden Tumorzellen. Gesunde Zellen bauen nach der Zellteilung die sie umgebende HS wieder ab, um wieder anzuwachsen und in Kontakt mit den benachbarten Zellen zu treten und ihre Funktionen im Gewebe zu erfüllen. Aktuell wird diskutiert, dass Krebszellen diesen

Schritt nicht vollständig durchführen und die Zellteilung unendlich fortsetzen können^[310]. HS besitzt des Weiteren eine sehr hohe Wasserbindungskapazität und ist Bestandteil der Gelenkflüssigkeit sowie des Gelenkknorpels und des Glaskörpers. Hyaluronsäure wird in verschiedenen Arzneimitteln und Medizinprodukten eingesetzt, wie in befeuchtenden Augentropfen und Nasensprays und kosmetischen Cremes, zur intraartikulären Applikation bei Arthrose oder in der Augenchirurgie zum Schutz der Endothelschicht.

Physiologisch interagiert Hyaluronsäure mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren, hauptsächlich mit CD44, und dem „Rezeptor für Hyaluronsäure-vermittelte Motilität“ (engl. *receptor for hyaluronic acid-mediated motility*, RHAMM). Der Einfluss von Hyaluronsäure auf die Progression von verschiedenen Krebsarten ist nachgewiesen worden^[311-312]. Tumorzellen produzieren oft verstärkt Hyaluronsäure und die Bindungsaffinität von CD44 für HS ist in diesen proliferierenden und migrierenden Zellen oft erhöht^[313]. CD44 ist der Hauptrezeptor für HS^[314] und wird auf nahezu allen Stammzellen und Krebszellen exprimiert. CD44 spielt eine wichtige Rolle in der Tumprogression und –angiogenese nach der Bindung an HS^[315]. RHAMM wird von vielen Tumorarten überexprimiert wie bei Prostata-, Brust- und Ovarialkrebs, Melanomen und verschiedenen Leukämieformen^[316-318].

HS kann von Hyaluronidasen enzymatisch gespalten und abgebaut werden. Sie kommen im menschlichen und tierischen Körper vor (medizinisch eingesetzt zur Offenhaltung von Wunden). Bakterien produzieren Hyaluronidasen und nutzen sie als Virulenzfaktoren, um sich im menschlichen Bindegewebe ausbreiten können^[304]. Aus diesem Grund ist es auch in verschiedenen Schlangen- und Insektengiften enthalten^[319-320]. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Hyaluronidasen und der Krebsentstehung wurde von *Jacobsen et al.*, *Lokeshwar et al.* und *Simpson et al.* nachgewiesen^[321-323]. Des Weiteren werden Hyaluronidasen therapeutisch angewandt bei kleineren chirurgischen und ophtho-chirurgischen Eingriffen, um einen schnelleren Wirkeintritt des Lokalanästhetikums zu erreichen (beispielsweise Hylase[®] „Dessau“ 150 I.E.).

Die Hyaluronsäure-Nanokapseln (HS) können potentiell von diesen Hyaluronidasen abgebaut werden, damit wäre eine enzymatische Freisetzung von inkorporierten Wirkstoffen möglich. HS-Nanokapseln würden sich demzufolge insbesondere als Wirkstofftransportsystem für Arzneistoffe, die in einem solchen Milieu gebraucht werden eignen. Untersuchungen zur Freisetzung werden momentan von Frau Dr. Grit Baier für die Entwicklung von HS-Nanokapseln, die einen bakteriziden Wirkstoff enthalten, durchgeführt. Durch diese HS-Nanokapseln soll

eine Besiedlung von pathogenen Bakterien verhindert werden, indem die von den Bakterien produzierten Hyaluronidasen die HS-Nanokapseln abbauen und den bakteriziden Wirkstoff freisetzen.

Die HS-Nanokapseln waren die ersten von der in diesem Kapitel beschriebenen Nanokapseln, mit denen Zellexperimente durchgeführt wurden. Zur Synthese wurde Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von $140\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ verwendet. Als hydrophiler Fluoreszenzfarbstoff wurde der CyTM5 Mono-NHS-Ester verwendet (Absorptionsmaximum 646 nm, Emissionsmaximum 664 nm), somit konnten Zytotoxizitätstests mit der 7-AAD-Färbung durchgeführt werden. Der Feststoffgehalt der Nanokapseln wurde von Frau Dr. Grit Baier ermittelt und auf 1 Gew.-% nach der Synthese und Redispergierung eingestellt. Als Standardkonzentration wurde, in Anlehnung an die vorausgehenden Zellexperimente, $2\cdot 10^5$ ausgesäte Zellen mit Nanopartikeln in einer Konzentration von $75\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inkubiert.

4.4.1.1 Aufnahme von Hyaluronsäure-Nanokapseln in HeLa-Zellen und MSC

Die ersten Experimente mit HS-Nanokapseln wurden mit HeLa-Zellen durchgeführt, weitere Versuche auch mit MSC. Für alle Zelllinien wurden die genannten Zellkulturmedien mit 10 Vol.-% FCS und Antibiotika verwendet (wenn nicht anderweitig erwähnt). Zuerst wurde getestet, welche Tenside sich für die Redispergierung der Nanokapseln in wässriger Phase eignen und nach erfolgter Inkubation der Zellen nicht zu zytotoxischen Effekten führen. Hierzu wurde die HS-Nanokapsel GB-M-57 (siehe Tabelle 3.5) verwendet. Für die Dauer von 4 h (CLSM) und 8 h (durchflusszytometrische Experimente) wurden HeLa-Zellen mit GB-M-57, redispergiert in wässriger CTMA-Cl-Lösung (GB-M-57-1-C), wässriger SDS-Lösung (GB-M-57-2-S) sowie in wässriger Lutensol[®] AT50-Lösung (GB-M-57-3-L), inkubiert (jeweils 0,1 Gew.-%). Diese Inkubationszeiten wurden ausgewählt, um ausreichend Zeit für die zelluläre Aufnahme zu erhalten und gegebenenfalls zytotoxische Effekte zu detektieren.

Die quantitative Auswertung zeigte insgesamt geringe zelluläre Aufnahmeraten und abweichende Werte für die Fluoreszenzintensität des Median und des arithmetischen Mittels (vgl. 4.2.1.3). Dies deutet auf eine ungleichmäßige zelluläre Aufnahme der HS-Nanokapseln in HeLa-Zellen hin. In Abb. 4.34 ist die durchflusszytometrische Analyse nach 7-AAD-Färbung abgebildet.

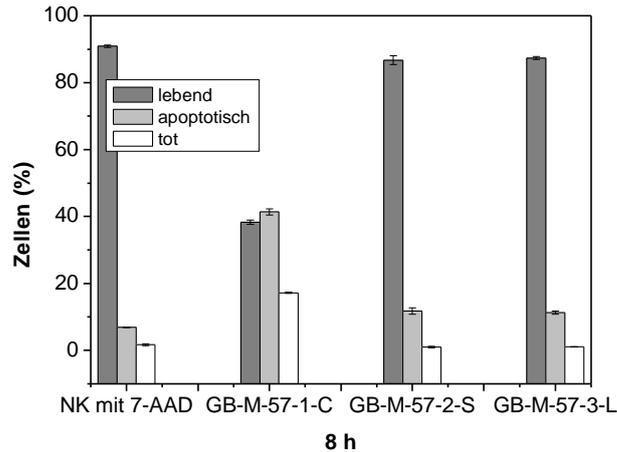


Abb. 4.34: Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen, nach 8-stündiger Inkubation mit GB-M-57-1-C, GB-M-57-2-S und GB-M-57-3-L. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil an lebenden (dunkelgrau), apoptotischen (hellgrau) und toten Zellen (weiß) ist mit den Standardabweichungen aus Dreifachansätzen angegeben. Die mit 7-AAD gefärbte Negativ-Kontrolle (NK mit 7-AAD) ist ebenfalls dargestellt.

Zu sehen ist, dass die Anzahl an apoptotischen HeLa-Zellen bei den Hyaluronsäure-Nanokapseln nur gering angestiegen ist im Vergleich zur mit 7-AAD gefärbten Negativ-Kontrolle (NK mit 7-AAD) und im Bereich von 10% der gesamten Zellen liegt (Abb. 4.34). Der Anteil an toten Zellen ist bei diesen Proben vergleichbar mit der Negativ-Kontrolle. Eine Redispersierung in 0,1%iger CTMA-Cl-Lösung (GB-M-57-1-C) erwies sich als zelltoxisch (ca. 41% der Zellen sind apoptotisch und ca. 17% bereits tot).

Erste CLSM-Aufnahmen (Abb. 4.36) nach 4 h zeigten für GB-M-57-1-C ((A) und (B)) abgelöste und von dem Membranfarbstoff (CellMask Orange) komplett angefärbte, tote Zellen. Aufgrund der Zelltoxizität nach Verwendung von HS-Nanokapseln redispergiert in CTMA-Cl-Lösung wurden für weitere Zelleexperimente ausschließlich in SDS- oder Lutensol® AT50-Lösung redispergierte Nanokapseln verwendet.

Weitere Beobachtungen der CLSM-Experimente mit HeLa-Zellen und MSC sind in Abb. 4.36 gezeigt; die Negativ-Kontrollen nach 24 und 48 h dieser Versuchsreihen in Abb. 4.35.

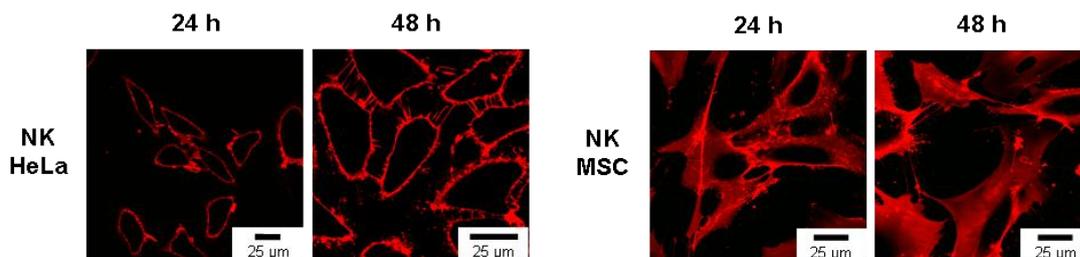


Abb. 4.35: CLSM-Aufnahmen der Negativ-Kontrollen von HeLa-Zellen (links) und MSC (rechts), jeweils nach 24 und 48 h. Zellmembran ist rot dargestellt (CellMaskOrange).

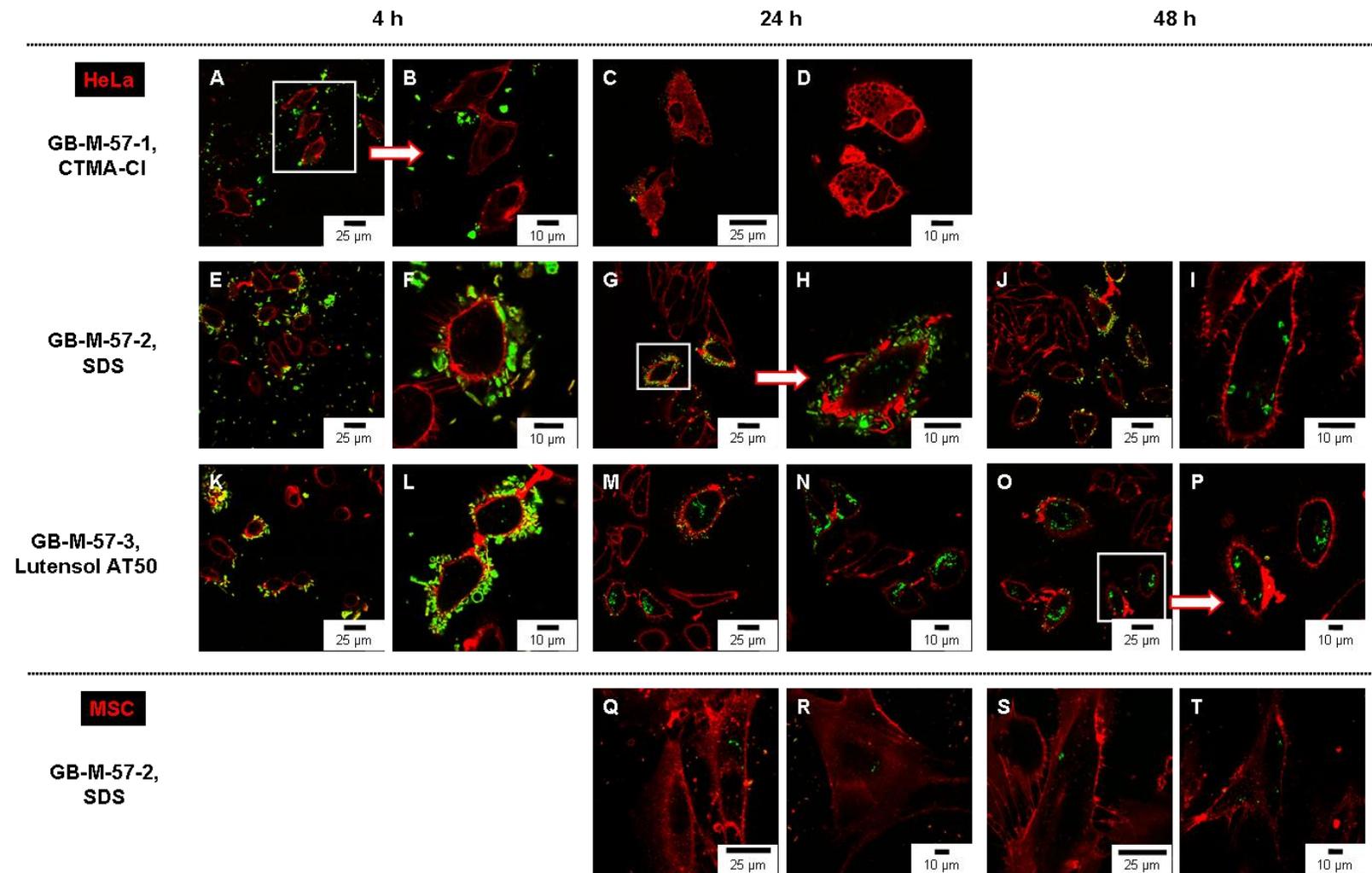


Abb. 4.36: CLSM-Aufnahmen nach 4, 24 und 48 h mit der HS-Nanokapsel GB-M-57-1 (redispersiert mit CTMA-Cl), GB-M-57-2 (redispersiert mit SDS) und GB-M-57-3 (redispersiert mit Lutensol® AT50) in HeLa-Zellen und GB-M-57-2 (redispersiert mit SDS) nach 24 und 48 h in MSC. Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask Orange) und die HS-Nanokapseln grün (CyTM5 Mono NHS-Ester).

Für GB-M-57-2-S (Abb. 4.36 (E) und (F)) und GB-M-57-3-L ((K) und (L)) wird eine sehr ungleichmäßige Aufnahme in die einzelnen HeLa-Zellen sowie eine Anlagerung der HS-Nanokapseln an einigen HeLa-Zellen auf der Zelloberfläche an der Zytoplasmamembran detektiert; andere HeLa-Zellen zeigen diese Anlagerungen hingegen nicht. Die Inkubationszeiten wurden für die CLSM-Experimente auf 24 und 48 h verlängert, um zu analysieren, ob eine gleichmäßigere Aufnahme in den Zellen bei längeren Inkubationszeiten erreicht wird und ob die Nanokapseln, die sich nach den ersten Stunden an den äußeren Membranen anlagern, von den HeLa-Zellen bei fortschreitender Inkubationsdauer internalisiert werden. Die mit SDS redispergierten Nanokapseln GB-M-57-2-S zeigen auch nach 24 h ((Abb. 4.36 (G) und (H)) sowie nach 48 h ((J) und (I)) Anlagerungen an den Zytoplasmamembranen und eine ungleichmäßige intrazelluläre Aufnahme. Ein Teil dieser HeLa-Zellen zeigt eine sehr starke intrazelluläre Aufnahme. Die mit Lutensol® AT50 redispergierten Nanokapseln (GB-M-57-3-L) zeigen nach diesen verlängerten Inkubationsperioden ((Abb. 4.36 (M)-(P)) ebenfalls eine ungleichmäßige zelluläre Aufnahme, die Anlagerungen an den Membranen scheinen etwas reduziert zu sein im Vergleich zu den CLSM-Aufnahmen nach 4 h und den Aufnahmen von GB-M-57-2-S.

Des Weiteren wurden CLSM-Experimente (Abb. 4.36) von MSC nach 24 ((Q) und (R)) und 48-stündiger ((S) und (T)) Inkubationsperiode durchgeführt, um deren Aufnahmeverhalten von HS-Nanokapseln zu untersuchen. Bei MSC findet nur eine sehr geringe intrazelluläre Aufnahme statt, eine Anlagerung an den Zellmembranen wurde bei MSC nicht beobachtet. Dieses zelluläre Aufnahmeverhalten steht in Kontrast zu den Beobachtungen, die bei HeLa-Zellen gemacht wurden.

Um die Reproduzierbarkeit der mit GB-M-57 erhaltenen Ergebnisse zu belegen, wurde von Frau Dr. Grit Baier erneut eine HS-Nanokapsel (GB-M-59) synthetisiert und in wässrige SDS- (GB-M-59-2-S) und Lutensol® AT50-Lösung (GB-M-59-3-L) redispergiert (jeweils 0,1 Gew.-%), auf die Verwendung von CTMA-Cl wurde wegen der oben beschriebenen Zytotoxizität verzichtet.

Längere Inkubationszeiten von 24 und 48 h wurden ausgewählt, da nur eine sehr geringe quantitative Aufnahme in durchflusszytometrischen Analysen von GB-M-57 nach 8 h zu verzeichnen war.

Bei den nachfolgend beschriebenen Durchflusszytometrie- und CLSM-Experimenten mit GB-M-59 stand neben der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit der HS-Nanokapsel GB-M-57 mit HeLa-Zellen und MSC, eine Untersuchung des Einflusses der

Lagerung der HS-Nanokapseln vor der Zugabe zum Zellkulturesperiment im Vordergrund. Ist ein permanentes Rühren der Nanokapseldispersion (Namenszusatz der Nanokapseln: „A“) oder ein Abstellen der Nanokapseldispersionen (Namenszusatz der Nanokapseln: „B“) vor der Zugabe zu den Zellkulturesperimenten möglicherweise sinnvoller?

Die quantitative Analyse sowie die Ergebnisse des Zellviabilitätstestes mit GB-M-59-2 (redispersiert in 0,1%iger SDS-Lösung) und GB-M-59-3 (redispersiert in 0,1%iger Lutensol® AT50-Lösung) in HeLa-Zellen sind in Abb. 4.37 dargestellt.

Das arithmetische Mittel der Fluoreszenzintensität (liniert) ist neben dem Median der Fluoreszenzintensität (flächig) dargestellt (Abb. 4.37 a)). Beiden Werte weichen beträchtlich voneinander ab; dies gibt in durchflusszytometrischen Analysen einen Hinweis auf eine ungleichmäßige zelluläre Aufnahme bzw. ein Anhaften der Nanokapseln an der Zelloberfläche bzw. der Zellmembranen wie es auch in CLSM-Aufnahmen in Abb. 4.36 zu sehen ist. Das arithmetische Mittel wird definiert als der Quotient aus der Summe aller Messwerte und der Anzahl der Messwerte. Der Median ist der Wert, der in der Mitte aller Messwerte liegt; entsprechend die Messdaten in zwei gleich große Hälften teilt. Der Median ist robuster gegenüber Ausreißern. Auf diese Experimente bezogen bedeutet das, dass Zellen mit sehr starker oder sehr schwacher zellulärer Aufnahme nicht so stark gewichtet werden wie durch das arithmetische Mittel.

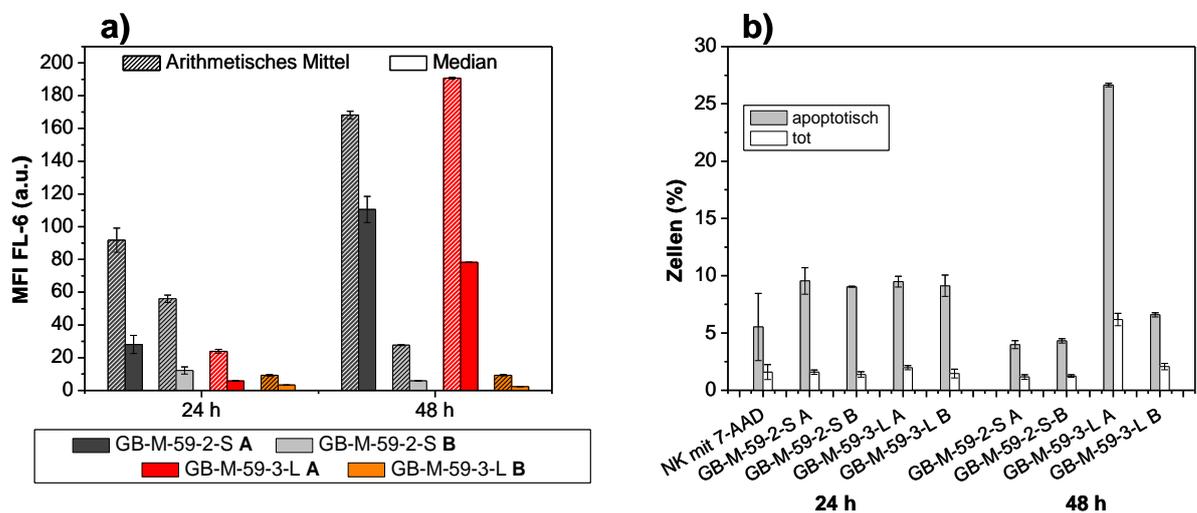


Abb. 4.37: Durchflusszytometrische Analyse nach 24 und 48 h von HeLa-Zellen mit unterschiedlich gelagerten HS-Nanokapseln: GB-M-59-2-S (dunkel- und hellgrau) und GB-M-59-3-L (rot und orange). „A“: permanent gerührte, „B“ abgestellt/nicht permanent gerührte HS-Nanokapseln vor der Zugabe zur Zellkultur. Diagramm a): arithmetisches Mittel (liniert) und Median (flächig) der Fluoreszenzintensität (MFI), Diagramm b): 7-AAD-Färbungen von apoptotischen (hellgrau) und toten (weiß). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der Dreifachansätze.

Die mit Lutensol® AT50 redispersierten Kapseln zeigen eine etwas geringere zelluläre Aufnahme (Abb. 4.37 a), rot „A“ und orange „B“, bei gleicher verwendeter Konzentration wie

die mit SDS redispergierten HS-Nanokapseln (Abb. 4.37 a), dunkelgrau „A“ und hellgrau „B“). Dieser Effekt könnte auf den „PEG-Effekt“ (siehe 2.1.3.3) des Lutensol® AT50 zurückzuführen sein und deshalb zu einer geringeren zellulären Aufnahme führen.

Das Fluoreszenzsignal bei den Proben mit den permanent gerührten Nanokapseln („A“) (dunkelgrau GB-M-59-2-S A, rot GB-M-59-3-L A) ist höher im Vergleich zu den Nanokapseln die abgestellt sind („B“) (grau GB-M-59-2-S B, orange GB-M-59-3-L B). Nach 48 h wird der Unterschied zwischen dem Einsatz der permanent gerührten HS-Nanokapseln „A“ und den abgestellten Nanokapseln „B“ noch deutlicher. HeLa-Zellen, die mit „A“ inkubiert wurden, zeigen nach 48 h ein deutlich höheres Fluoreszenzsignal, wohingegen die Proben mit „B“ eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zeigen.

Der Zellviabilitätstest (Abb. 4.37 b)) zeigt im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (NK mit 7-AAD) sowohl nach 24, als auch nach 48 h für apoptotische (hellgrau, um 10% der Gesamtzellzahl) und tote (weiß, um 2% der Gesamtzellzahl) Zellen keine Abweichungen. Eine Ausnahme mit 25% apoptotischen Zellen bildet die permanent gerührte Probe GB-M-59-3 L. Auf eine Darstellung der lebenden Zellen wurde in diesem Diagramm verzichtet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in allen folgenden, in diesem Kapitel beschriebenen Zell-experimenten nur Nanokapseln verwendet, die mit einer 0,1% igen SDS-Lösung redispergiert und vor der Zugabe zur Zellkultur permanent gerührt wurden. Dadurch kann sich kein Dichtegradient in der Nanokapsel-Dispersion ausbilden. Die Ausbildung eines Gradienten führt zu einer ungenauen Dosierung der Zugabe der Nanokapseln zur Zellkultur, wie es bei den Experimenten mit den abgestellten bzw. nicht permanent gerührten Nanokapsel-Dispersionen („B“) zu beobachten ist.

Um zusätzliche Informationen zur Lokalisation der HS-Nanokapseln zu erhalten, wurden weitere CLSM-Aufnahmen mit HeLa-Zellen durchgeführt. Für die CLSM-Aufnahmen wurden die permanent auf der Rührplatte gerührten HS-Nanokapseln („A“) eingesetzt.

Die CLSM-Aufnahmen in Abb. 4.38 (konfokale Schnitte in z-Achse nach Inkubation mit GB-M-59-2 S) und 4.39 (GB-M-59-2 S (A)-(E) und GB-M-59-3 L (F)-(J)) bestätigen eine ungleichmäßige zelluläre Aufnahme und Anlagerung der HS-Nanokapseln an den Zellmembranen der HeLa-Zellen nach 24 und 48 h. Bei den Proben mit GB-M-59-3 L erscheinen die Anlagerungen nach dieser Zeit etwas reduziert (Abb. 4.39 (H)-(I)). Dies wurde bereits mit GB-M-57-3 L beobachtet.

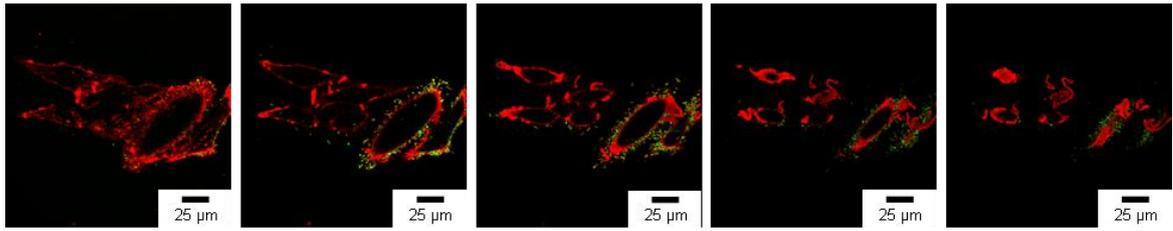


Abb. 4.38: Dargestellt sind konfokale Schnitte nach 24-stündiger Inkubation mit GB-M-59-2-S (HS-Nanokapseln wurden vor der Zugabe zur Zellkultur permanent gerührt). Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask Orange) und die HS-Nanokapseln grün (CyTM5 Mono-NHS-Ester).

Die konfokalen Schnitte durch die z-Achse (Abb. 4.38) zeigen eine Anlagerung der HS-Nanokapseln an den Membranen. In Abb. 4.39 sind einzelne Bildausschnitte der Zellmembranen an die HS-Nanokapseln anlagern vergrößert dargestellt.

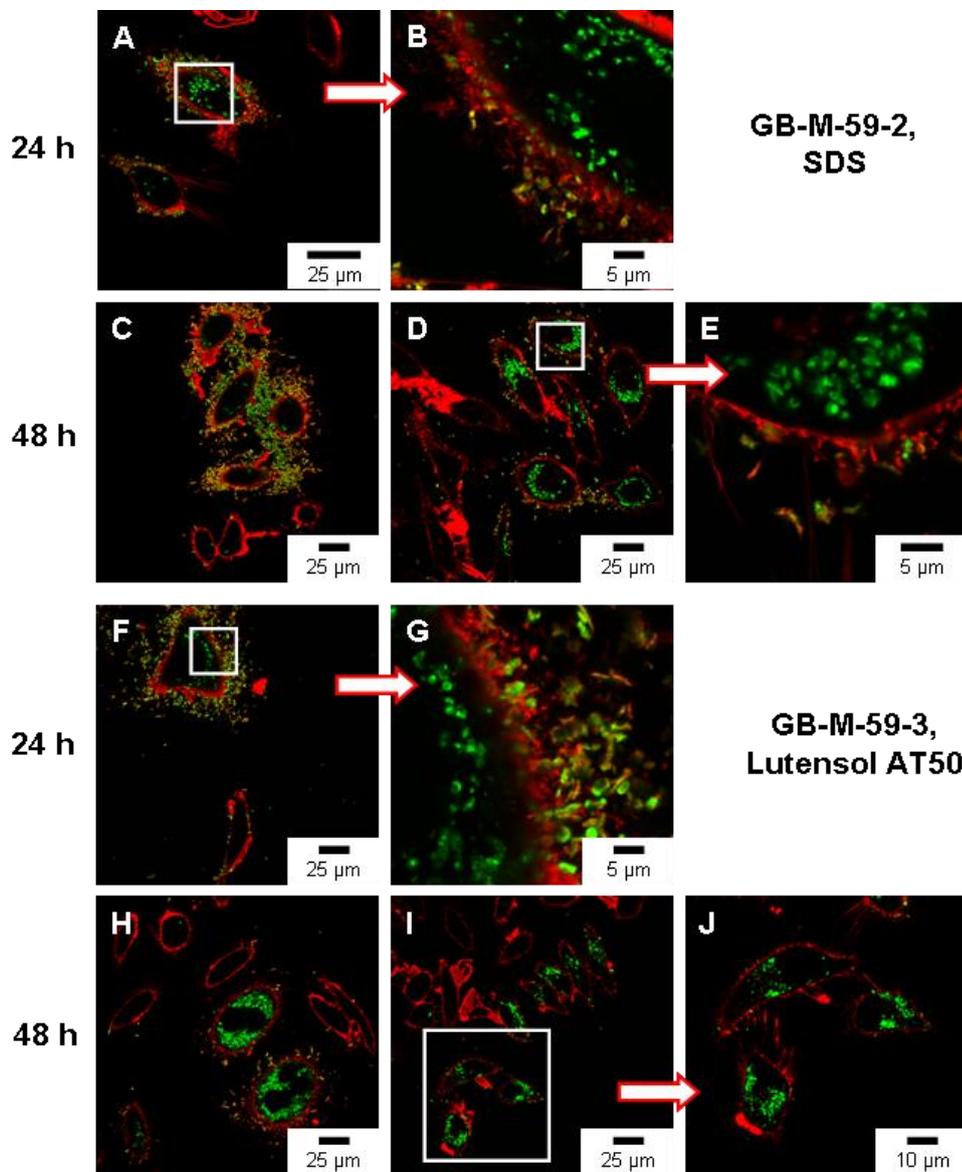


Abb. 4.39: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit GB-M-59-2-S und GB-M-59-3-L für 24 und 48 h (HS-Nanokapseln wurden vor der Zugabe zur Zellkultur permanent gerührt). Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask Orange) und die HS-Nanokapseln grün (CyTM5 Mono NHS-Ester).

Im folgenden Abschnitt werden ausführlicher Zellexperimente mit MSC und GB-M-59-2-S und GB-M-59-3-L beschrieben. Diese Analysen wurden zum Vergleich zu den Experimenten mit immortalisierten HeLa-Zellen durchgeführt. In Abb. 4.40 wurden die MSC zur Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der HS-Nanokapseln versetzt: $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Diagramm a)) und der routinemäßig eingesetzten Konzentration von $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Diagramm b)). Die Analyse erfolgte ebenfalls nach 24 und 48 h. Bei den Viabilitätsexperimenten mit 7-AAD wurden keine zelltoxischen Eigenschaften von GB-M-59-2-S und -3 L festgestellt.

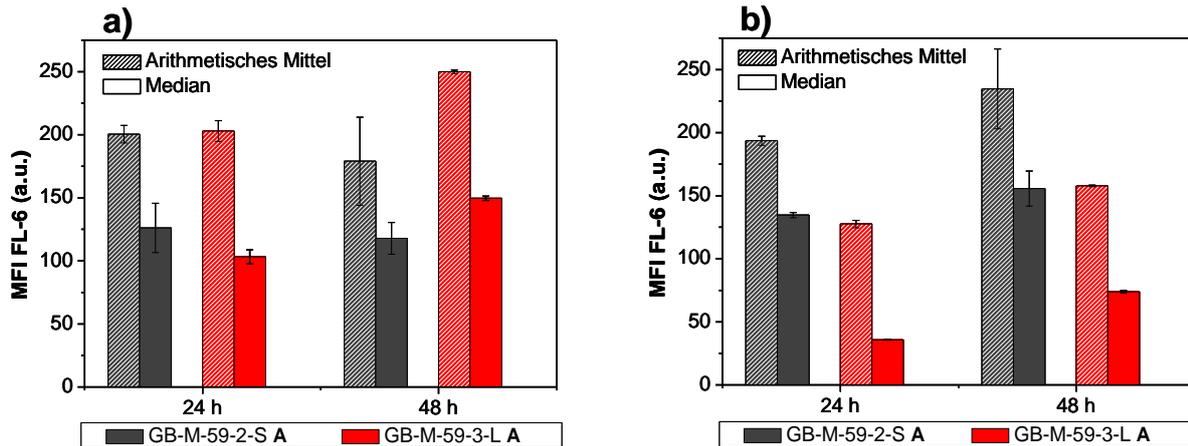


Abb. 4.40: Durchflusszytometrische Analyse von MSC nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit GB-M-59-2-S (dunkelgrau) und GB-M-59-3-L (rot); a) $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ und b) $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Das arithmetische Mittel (liniert) und der Median (flächig) der Fluoreszenzintensität (MFI) sind aufgetragen. Die Mittelwerte der Dreifachansätze mit den Standardabweichungen sind dargestellt.

Eine Verdoppelung der Konzentrationen führt nur zu einer deutlichen Aufnahmesteigerung bei den mit Lutensol® AT50 redispergierten HS-Nanokapseln, nicht jedoch bei den mit SDS redispergierten HS-Nanokapseln (Abb. 4.40 a) und b)). Sowohl das arithmetische Mittel (liniert), als auch der Median (flächig) der Fluoreszenzintensität ist aufgetragen. Auch bei diesen Experimenten mit MSC sind diese beiden Mittelwerte nicht deckungsgleich, sondern ergeben Differenzen, die auf eine ungleichmäßige zelluläre Aufnahme von HS-Nanokapseln schließen lassen (ebenso mit GB-M-57 bei MSC festgestellt). Bei Betrachtung der CLSM-Aufnahmen aus Abb. 4.41 sind sowohl nach 24 als auch nach 48 h keine prominenten Anlagerungen der HS-Nanokapseln an den Zellmembranen zu sehen. Dies wurde entsprechend mit GB-M-57-2 S bei MSC festgestellt.

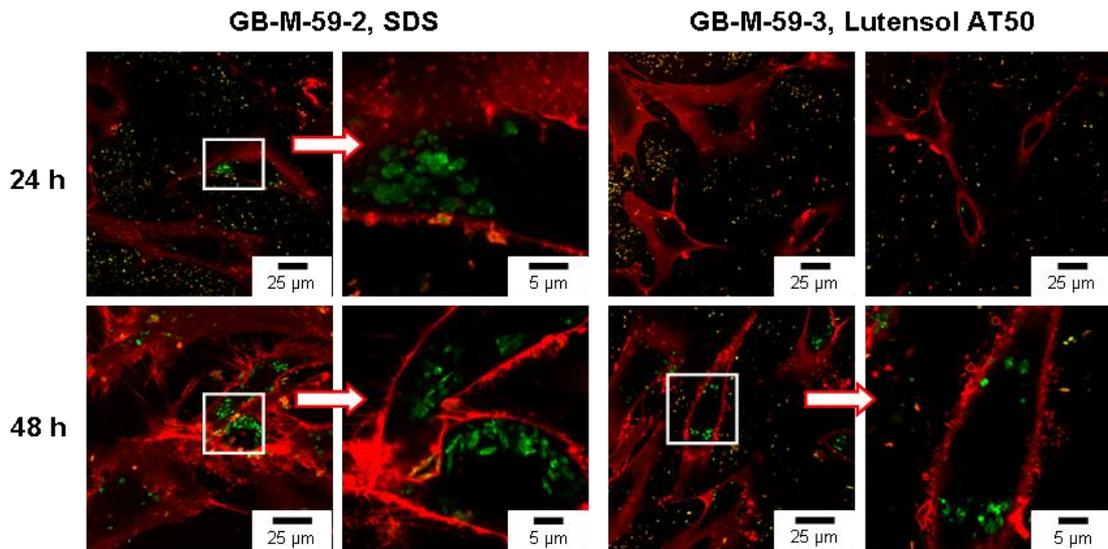


Abb. 4.41: CLSM-Aufnahmen von MSC nach Inkubation mit GB-M-59-2-S und GB-M-59-3-L für 24 und 48 h (HS-Nanokapseln wurden vor der Zugabe zur Zellkultur permanent gerührt). Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask Orange) und die HS-Nanokapseln grün (CyTM5 Mono NHS-Ester).

Von Frau Dr. Grit Baier wurde eine weitere HS-Nanokapsel (GB-M-72) zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit hergestellt und wieder in wässriger SDS- (GB-M-72-2-S) und Lutensol[®] AT50- (GB-M-72-3-L) Lösung redispersiert (jeweils 0,1 Gew.-%). Auch diese HS-Nanokapsel zeigt dieselben Ergebnisse bei Experimenten mit HeLa-Zellen: eine ungleichmäßige intrazelluläre Aufnahme und eine Adhäsion der HS-Nanokapseln auf manchen HeLa-Zellen (Abb. 4.42).

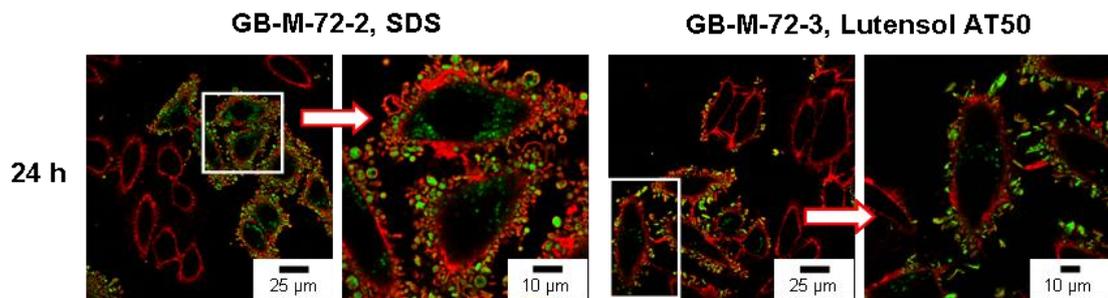


Abb. 4.42: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit GB-M-72-2-S und GB-M-72-3-L für 24 h (HS-Nanokapseln wurden vor der Zugabe zur Zellkultur permanent gerührt). Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask Orange) und die HS-Nanokapseln grün (CyTM5 Mono NHS-Ester).

Auffällig ist, dass HeLa-Zellen, die in Gruppen nebeneinander wachsen, entweder die HS-Nanokapseln gut aufnehmen und an ihren Zelloberflächen anlagern oder weder die HS-Nanokapseln internalisieren noch Anlagerungen der HS-Nanokapseln an der äußeren Zytoplasmamembranen zeigen (Abb. 4.42). Es ist davon auszugehen, dass die Zellen, die nebeneinander wachsen durch Zellteilung auseinander hervorgegangen sind und sich im gleichen Zellzyklusstadium befinden. Die Zugabe der Nanokapseln erfolgte erst 15 – 18 h nach der Zellaussaat; während dieser und der anschließenden Inkubationszeit mit den Nanokapseln haben die

Zellen ausreichend Zeit zum Anwachsen und der Aufnahme ihren Stoffwechselfunktionen. Die Verdopplungszeit der HeLa-Zellen beträgt durchschnittlich ca. 48 h^[297]. Diese benachbarten Zellen sollten ähnliche Eigenschaften, Oberflächenmerkmale oder Zellzyklusstadien aufweisen und aufgrund dessen die HS-Nanokapseln in gleicher Weise intrazellulär aufnehmen oder nicht.

Die bisherigen Zellexperimente wurden mit drei verschiedenen HS-Nanokapseln (GB-M-57, GB-M-59 und GB-M-72) durchgeführt und dabei reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

Eine weitere HS-Nanokapsel (GB-M-87) wurde von Frau Dr. Grit Baier in der Versuchsreihe zur Kopplung eines Folsäure-Konjugates verwendet. Diese HS-Nanokapsel ohne Folsäure-Kopplung (GB-M-87 R) zeigt dieselben Eigenschaften bezüglich der zellulären Aufnahme, wie die in diesem Abschnitt aufgeführten HS-Nanokapseln (siehe Abschnitt 4.4.3.1 b.)). Der hydrophile Fluoreszenzfarbstoff dieser Nanokapsel ist Sulforhodamin 101 (SR 101).

GB-M-87 R wurde auch bei den Zellexperimenten des folgenden Abschnitts verwendet.

Bei manchen HeLa-Zellen ist diese Anlagerung der Kapseln an die Membranen sehr stark ausgeprägt, bei anderen hingegen nicht oder nur gering (vgl. Abb. 4.36, 4.38, 4.39 und 4.42). Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine Wechselwirkung mit dem Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 auf den Zelloberflächen sein, der unter anderem auf diversen Krebszellen lokalisiert ist (siehe oben), so auch auf HeLa-Zellen. CD44 ist ebenfalls ein Oberflächenmerkmal von MSC^[270, 324-325] und wird für deren Charakterisierung verwendet. CD44 konnte auch bei den folgenden Experimenten mit MSC nachgewiesen werden. Es wurden durchflusszytometrische Zellexperimente und CLSM-Aufnahmen mit HeLa-Zellen und MSC durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von CD44 und der intrazellulären Aufnahme von HS-Nanokapseln nachzuweisen.

Die Zellen wurden für die durchflusszytometrischen Experimente mit GB-M-87 R inkubiert ($75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (redispergiert in 0,1 Gew.-%-SDS-Lösung, Kapseldispersion permanent gerührt) und nach 24 h analysiert (Abb. 4.43a)). Zusätzlich wurden die Ansätze mit einem Fluoreszenz-markiertem Antikörper CD44-FITC (siehe Tabelle 3.10) angefärbt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.43 b) dargestellt. HeLa-Zellen zeigen eine schwache zelluläre Aufnahme von GB-M-87 R, ebenso die MSC (Abb. 4.43 a)). Aufgrund der ungleichmäßigen zellulären Aufnahme weichen arithmetisches Mittel (liniert) und Median (flächig) der Fluoreszenzintensität voneinander ab.

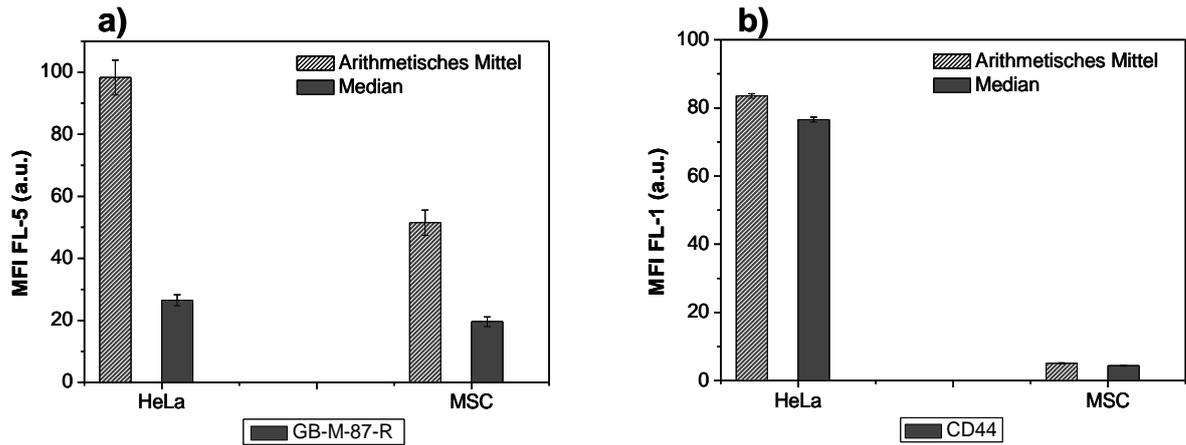


Abb. 4.43: Durchflusszytometrische Analyse einer Inkubation (24 h) mit GB-M-87 R mit HeLa-Zellen und MSC. a): Quantitative Analyse der Aufnahme von GB-M-87 R, b): quantitative Analyse der CD44-Expression auf den Zelloberflächen. Arithmetisches Mittel (liniert) und Median (flächig) der Fluoreszenzintensität (MFI) sind dargestellt, Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachansätzen sind gezeigt.

Die intrazelluläre Lokalisation der HS-Nanokapseln sowie die Anlagerung auf den Zelloberflächen der HeLa-Zellen wird durch CLSM-Experimente (Abb. 4.44 (HeLa-Zellen) und Abb. 4.45 (MSC) bestätigt. Beide Zelllinien zeigen eine Expression von CD44 (Abb. 4.43 b)). Bei den HeLa-Zellen ist die Expression von CD44 deutlich, bei den MSC nur sehr schwach ausgeprägt. Arithmetisches Mittel und Median der Fluoreszenzintensität sind nahezu gleich. Dies deutet auf eine gleichmäßige Expression von CD44 auf der Zelloberflächen hin, eine ungleichmäßige Expression dieses Rezeptors, der eine ungleichmäßige intrazelluläre Aufnahme der HS-Nanokapseln zur Folge haben könnte, ist somit nicht gegeben. Die CLSM-Aufnahmen (Abb. 4.44 und 4.45) belegen dies.

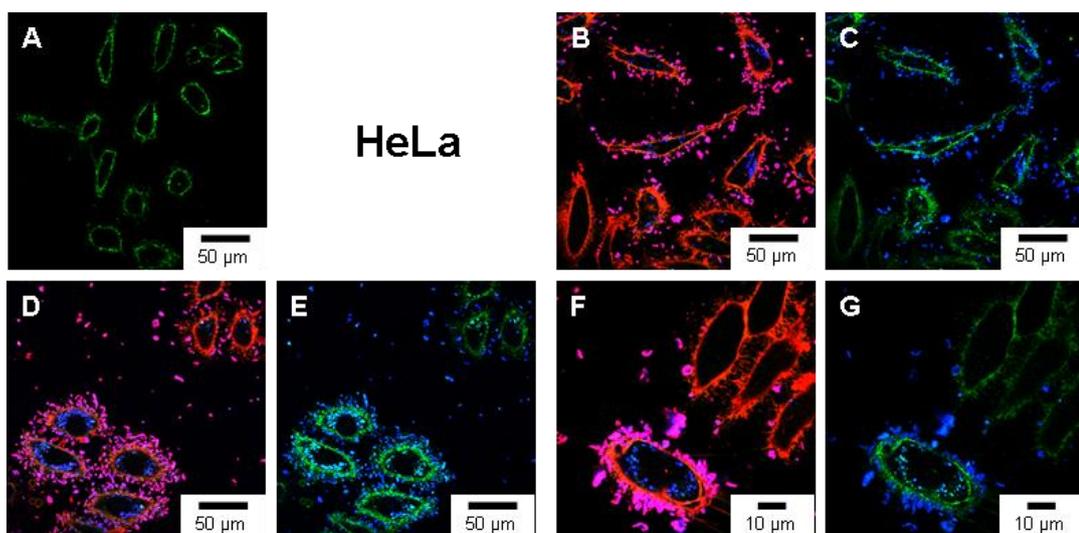


Abb. 4.44: CLSM-Analysen von HeLa-Zellen nach einer Inkubation mit GB-M-87 für 24 h. Fluoreszenzmarkierter CD44-Antikörper ohne Membranfarbstoff (A), sowie Aufnahmen jeweils mit und ohne Detektionskanal des Membranfarbstoffs: (B) und (C), (D) und (E), (F) und (G). Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask deep Red), die HS-Nanokapsel blau (SR 101) und der Fluoreszenz-markierte CD44-Antikörper grün (CD44-FITC).

Bei HeLa-Zellen ist eine gleichmäßige Markierung mit CD44-FITC gegeben (Abb. 4.44, grün dargestellt).

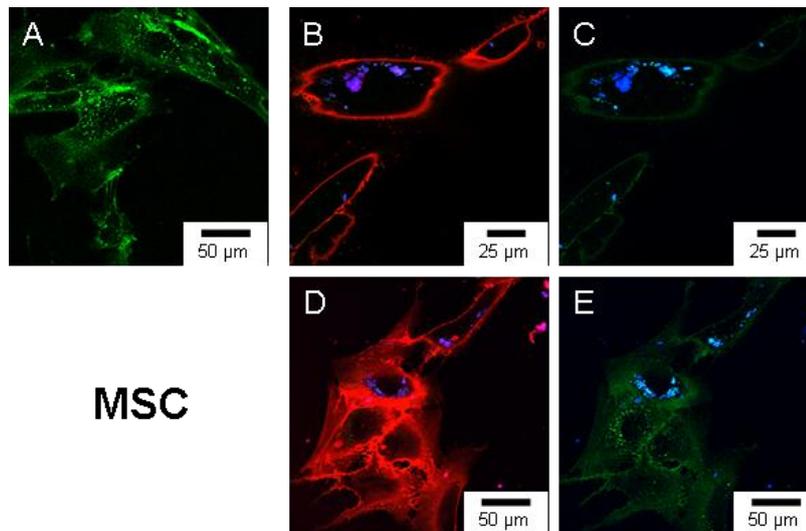


Abb. 4.45: CLSM-Analysen von MSC nach einer Inkubation mit GB-M-87 für 24 h. Fluoreszenz-markierter CD44-Antikörper ohne Membranfarbstoff (A) sowie Aufnahmen jeweils mit und ohne Detektionskanal des Membranfarbstoffs: (B) und (C), (D) und (E). Die Zellmembran ist rot dargestellt (CellMask deep Red), die HS-Nanokapsel blau (SR 101) und der Fluoreszenz-markierte CD44-Antikörper grün (CD44-FITC).

Bei den MSC ist ebenfalls eine gleichmäßige Detektion des membranständigen CD44-Rezeptors zu detektieren (Abb. 4.45).

4.4.1.2 Aufnahme von Hyaluronsäure-Nanokapseln in Leukozyten

Nanokapseln eignen sich insbesondere durch deren Möglichkeit einer Beladung mit Arzneistoffen als Wirkstofftransportsysteme. Als Wirkstofftransportsysteme können sie durch verschiedene Applikationswege (i.v., per oral, etc.) in die Blutbahn gelangen und sind dort den Blutbestandteilen und –zellen ausgesetzt. Im Folgenden sind erste Versuche beschrieben, die das in Abschnitt 4.2 etablierte System zur durchflusszytometrischen Analyse in peripherem Vollblut (*ex vivo*) für Inkubationsexperimente mit Nanokapseln anwenden.

Die Hyaluronsäure-Nanokapsel GB-M-59-2S A wurde mit 0,1% wässriger SDS-Lösung redispersiert, GB-M-59 3L A mit 0,1% wässriger Lutensol® AT50-Lösung. Die Hyaluronsäure-Nanokapseln wurden vor der Zugabe in die Blutentnahmeröhrchen permanent auf der Rührplatte gerührt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse in peripherem Blut sind in Abb. 4.46 für CD14+ Monozyten, CD16+ Neutrophile und CD3+ T-Zellen gezeigt. Antikoaguliert wurden die Proben mit Li-Heparin und mit K₃EDTA.

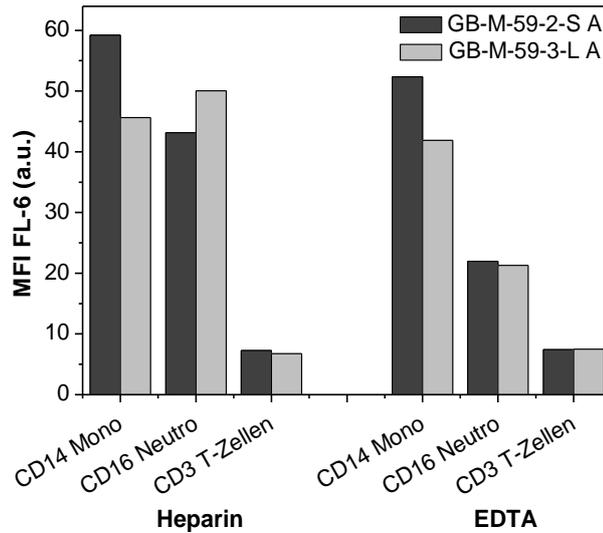


Abb. 4.46: Durchflusszytometrische Analyse von Hyaluronsäure-Nanokapseln: GB-M-59-2S A (redispersiert mit SDS, dunkelgrau) und GB-M-59-3L A (redispersiert mit Lutensol® AT50, hellgrau). Die Nanokapseln wurden in Konzentrationen von $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ eingesetzt. Die zelluläre Aufnahme in CD14+ Monozyten, CD16+ Neutrophile und CD3+ T-Zellen wurde nach 8 h untersucht (Einfachansätze). Die links dargestellten Messwerte wurden in mit Li-Heparin antikoagulierten Proben aufgenommen, die rechts dargestellten Messwerte in mit K_3EDTA antikoagulierten Blut (siehe Beschriftungen). Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt.

Die zelluläre Aufnahme nach 8 h ist in beiden antikoagulierten Proben sehr schwach. In den mit Li-Heparin antikoagulierten Proben ist die Aufnahme nur leicht höher, als in den mit K_3EDTA antikoagulierten Proben. Die Unterschiede durch den Einfluss der Antikoagulanzen sind nicht so drastisch wie bei den Experimenten mit den funktionalisierten Nanopartikeln ASS5 und NSC5 (vgl. 4.2.2.1). Die phagozytoseaktiven Zellen CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophile zeigen die stärkste Aufnahme. CD3+ T-Zellen zeigen nur einen marginalen Anstieg der Fluoreszenzintensität.

4.4.1.3 Zusammenfassung der Zellexperimente mit HS-Nanokapseln

Zur Validierung wurden die gezeigten Ergebnisse mit vier verschiedenen HS-Nanokapseln, in zeitlichem Abstand mit drei verschiedenen Chargen HeLa-Zellen und zwei verschiedenen Chargen MSC reproduziert. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente mit HS-Nanokapseln erlauben folgende Schlussfolgerungen:

- Von den verwendeten Tensiden (0,1 Gew.-%) zur Redispergierung der HS-Nanokapseln sind in Bezug auf die zelluläre Aufnahme und dem Einfluss auf die Zelltoxizität CTMA-Cl nicht, SDS und Lutensol® AT50 hingegen gut geeignet.
- Der Median der Fluoreszenzintensität ist ein besseres Maß zur Quantifizierung bei durchflusszytometrischen Analysen aufgrund der ungleichmäßigen zellulären Aufnahme. Die Ausreißer, Zellen mit sehr starker Aufnahme bzw. mit starker Anlagerung der HS-Nanokapseln an den Membranen, werden dabei nicht so stark gewichtet wie bei einer Auswertung der Messwerte mit dem arithmetischen Mittel.
- Eine ungleichmäßige zelluläre Aufnahme findet sowohl in HeLa-Zellen als auch in MSC statt. Bei HeLa-Zellen sind Anlagerungen der HS-Nanokapseln auf der Zelloberfläche zu beobachten, die auch nach 48 h noch vorhanden sind. Bei mit Lutensol® AT50 stabilisierten HS-Nanokapseln sind diese Anlagerungen nach 48 h reduziert. MSC zeigen keine Anlagerungen der HS-Nanokapseln an den Zellmembranen.
- HeLa-Zellen, die eine zelluläre Aufnahme der HS-Nanokapseln aufweisen, zeigen in diesen Zellen auch eine sehr starke intrazelluläre Aufnahme.
- Der Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 wird auf HeLa-Zellen und auf MSC gleichmäßig exprimiert. Wechselwirkungen der HS-Nanokapseln mit diesem Rezeptor sind nicht als ausschlaggebender Punkt für die ungleichmäßige zelluläre Aufnahme, bedingt durch Wechselwirkungen der HS-Nanokapseln mit CD44 an der Zelloberfläche, zu betrachten, da eine gleichmäßige Expression auf HeLa-Zellen und auf MSC detektiert wurde.
- In verschiedenen CLSM-Aufnahmen erscheinen die HS-Nanokapseln intrazellulär und an den Zellmembranen etwas aufgequollen (aufgrund ihrer Größe und Morphologie). Dieser Effekt könnte bedingt durch die hohe Wasserbindungsfähigkeit von Hyaluronsäure auftreten.
- CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophile zeigen in durchflusszytometrischen Analysen eine quantitative Aufnahme im Gegensatz zu CD3+ T-Lymphozyten. Eine Bestätigung der intrazellulären Lokalisation mittels CLSM ist noch durchzuführen.

4.4.2 Heparin-Nanokapseln

Heparin stellt ebenso wie Hyaluronsäure als körpereigene Substanz, ein Glykosaminoglykan dar. Heparin besteht aus Disaccharideinheiten mit unterschiedlichen Anzahlen von Sulfatgruppen, die Heparin eine hohe negative Ladungsdichte geben. Heparin wird in Granula von Mastzellen gespeichert. Die physiologische Wirkung des Heparins ist noch nicht vollständig erforscht, es wird von Mastzellen vorwiegend bei Gewebsverletzungen und Entzündungen freigesetzt. Therapeutisch wird Heparin (unfraktioniert oder fraktioniert) zur Prophylaxe oder Therapie von Thrombosen eingesetzt (siehe 2.1.4.2), nach parenteraler Gabe wird Heparin durch Aufnahme in Zellen des MPS, durch Spaltung in der Leber (Heparinasen) und durch Ausscheidung über den Urin überwiegend als depolymerisiertes, inaktiviertes Heparin eliminiert^[326].

Neben der bekannten und umfassend analysierten antikoagulierenden Wirkung von Heparin, werden des Weiteren Wechselwirkungen von Heparinen mit Proteinen untersucht^[327-328]. Für Heparine werden antineoplastische Eigenschaften durch eine Hemmung der Angiogenese bei metastasierenden Tumoren kontrovers diskutiert^[329]. Heparin kann eine Komplementaktivierung verhindern^[330-331]. *Jaulin et al.* konnten *in vitro* nachweisen, dass Heparin funktionalisierte PMMA-Nanopartikel von Makrophagen schwächer internalisiert werden als un-funktionalisierte PMMA-Nanopartikel^[332]; *Passirani et al.*^[333] zeigten diesen Effekt *in vivo*. Heparin zeigt somit hinsichtlich der Verbesserung der Blutzirkulationszeit interessante Eigenschaften für nanopartikuläre Wirkstofftransportsysteme. Von *Socha et al.* wurden Heparin-bedeckte Nanopartikel entwickelt, die *in vivo* länger in der Blutbahn zirkulieren und die Elimination durch Zellen des MPS reduzieren^[334]. *Chung et al.* zeigten durch eine Heparin-Funktionalisierung der PLGA-Nanopartikel eine Verbesserung des zielgerichteten Wirkstofftransports in Tumoren *in vivo*. Die Anreicherung in der Leber war allerdings nicht geringer wie die der unfunktionalisierten PLGA-Nanopartikel^[335]. Heparin eignet sich somit als biokompatibles, körpereigenes, wasserlösliches Molekül ausgezeichnet als Material für Nanokapseln, welche als Wirkstofftransportsysteme eingesetzt werden.

Frau Dr. Grit Baier verwendete zur Synthese unfraktioniertes Na-Heparin aus der Schweinedarmmukosa (mittleres Molekulargewicht: 13 – 15 kDa)^[326]. Die Zellexperimente wurden mit zwei identisch hergestellten Heparin-Nanokapseln, GB-Sacch-6 und GB-Sacch-14, durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit zu sichern. Der Fluoreszenzfarbstoff SR 101 wurde eingekapselt und dient zur Detektion. Für die Zellexperimente wurden Konzentrationen von 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ausgewählt.

4.4.2.1 Aufnahme von Heparin-Nanokapseln in diverse immortalisierte Zelllinien

Erste Zellexperimente (Durchflusszytometrie und CLSM) in HeLa-Zellen ergaben eine gute zelluläre Aufnahme für beide Heparin-Nanokapseln und keine Auswirkung auf deren Viabilität. Die Zellviabilität wurde mittels MTS-Assay nach 24-stündiger Inkubation überprüft und zeigte bei allen Proben Absorptionswerte $> 90\%$ im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Aufgrund der hohen negativen Ladungsdichte bedingt durch die Sulfatgruppen des Heparins wird eine gute zelluläre Aufnahme der Heparin-Nanokapseln erwartet. CLSM-Aufnahmen nach einer Inkubationszeit von 20 h sind in Abb. 4.47 gezeigt.

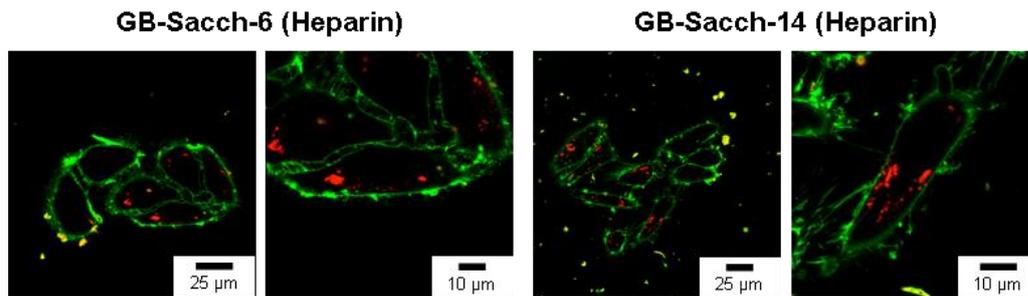


Abb. 4.47: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen mit GB-Sacch-6 (links) und GB-Sacch-14 (rechts) sind nach 20-stündiger Inkubationszeit gezeigt. Die Zellmembran ist grün dargestellt (Cell Mask Deep Red) und die Heparin-Nanokapseln rot (SR 101).

Nach bestätigter Eignung der Heparin-Nanokapseln für Zellaufnahmeexperimente wurden Experimente mit weiteren Zelllinien durchgeführt. Es wurden neben HeLa-Zellen HepG2-Zellen (Leberkarzinom-Zelllinie), MCF-7-Zellen (Brustkrebs-Zelllinie) und PC-3-Zellen (Prostatakrebs-Zelllinie) bezüglich ihres zellulären Aufnahmeverhaltens untersucht, um die Effizienz der zellulären Aufnahme von Heparin-Nanokapseln in diversen Tumorzelllinien zu vergleichen.

In Abb. 4.48 sind die Resultate der durchflusszytometrischen Analysen nach Inkubationszeiten von 4 h (dunkelgrau) und 24 h (hellgrau) mit GB-Sacch-6 und GB-Sacch-14 dargestellt. Bei zeitgleich durchgeführten MTS-Assays zeigten alle Zelllinien mit beiden Heparin-Nanokapseln bei Konzentrationen von $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ keine zytotoxischen Effekte; die Absorption betrug bei allen Ansätzen $> 90\%$ im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.

Ein direkter Vergleich zwischen den beiden Nanokapseln GB-Sacch-6 und GB-Sacch-14 (Abb. 4.48 (A) und (B)) ist möglich, da die Fluoreszenzintensität der Nanokapseln auf die Anzahl der Nanokapseln $\cdot\text{mL}^{-1}$ normiert ist. Es zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit mit beiden Heparin-Nanokapseln bei allen eingesetzten Zelllinien.

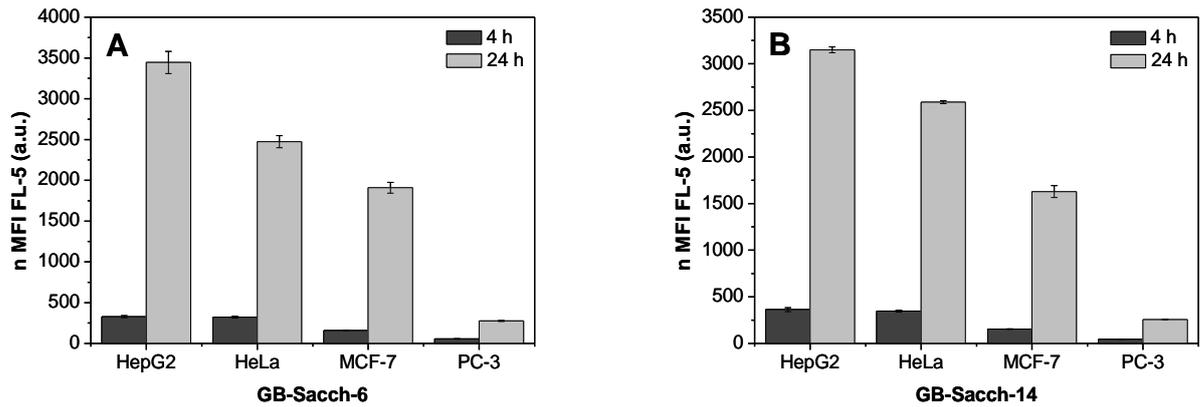


Abb. 4.48: Durchflusszytometrische Analyse von HepG2-, HeLa-, MCF-7- und PC-3-Zellen nach 4 h (dunkelgrau) und 24 h (hellgrau). GB-Sacch-6 (A) und GB-Sacch-14 (B). Der normierte Median (Nanokapseln·mL⁻¹) der Fluoreszenzintensität (n MFI) ist aufgetragen. Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachansätzen sind gezeigt.

Alle Zelllinien zeigen eine gute zelluläre Aufnahme (Abb. 4.48) und eine deutliche Steigerung der zellulären Aufnahmerate zwischen 4 und 24 h um ein Vielfaches. Hep G2 (Verdopplungszeit: 48 h^[336]) zeigen die stärkste Aufnahme, gefolgt von HeLa-Zellen (Verdopplungszeit: 48 h^[297]) vor MCF-7-Zellen (Verdopplungszeit: 30-72 h^[337]) und PC-3-Zellen (Verdopplungszeit: 33 h^[266]). Die Literaturwerte der angegebenen Verdopplungszeiten sind Durchschnittswerte und von vielen Faktoren abhängig. In den durchgeführten Experimenten zeigten MCF-7- und PC-3-Zellen das niedrigste Zellwachstum.

CLSM-Aufnahmen sind in Abb. 4.49 (Negativ-Kontrollen der diversen Zelllinien) und in Abb. 4.50a (HepG2-Zellen), 4.50b (HeLa-Zellen), 4.50c (MCF-7-Zellen) und 4.50d (PC-3-Zellen) gezeigt. Für GB-Sacch-6 und GB-Sacch-14 konnte in allen Zelllinien eine gleichmäßige intrazelluläre Lokalisation der Nanokapseln sowie vereinzelte Anlagerungen bzw. Assoziationen der Nanokapseln an den Zellmembranen festgestellt werden. Die Anlagerungen sind in gelb als Überlagerung von grün dargestellter Zellmembran und rot abgebildeten Nanokapseln zu sehen.

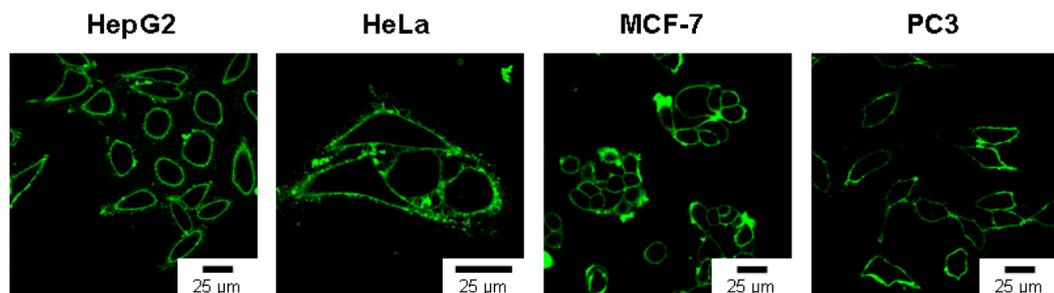


Abb. 4.49: CLSM-Aufnahmen der Negativ-Kontrollen (ohne Nanokapseln) von HepG2-, HeLa-, MCF-7- und PC-3-Zellen nach 24 h. Die Zellmembran ist grün (CellMask Deep Red) dargestellt.

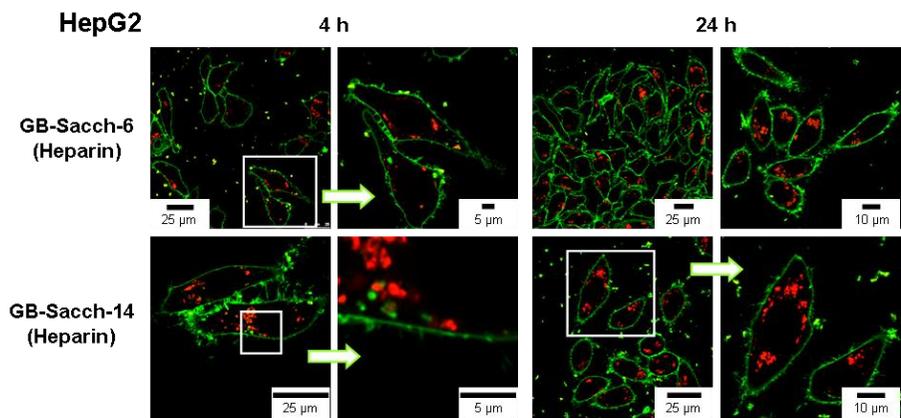


Abb. 4.50a

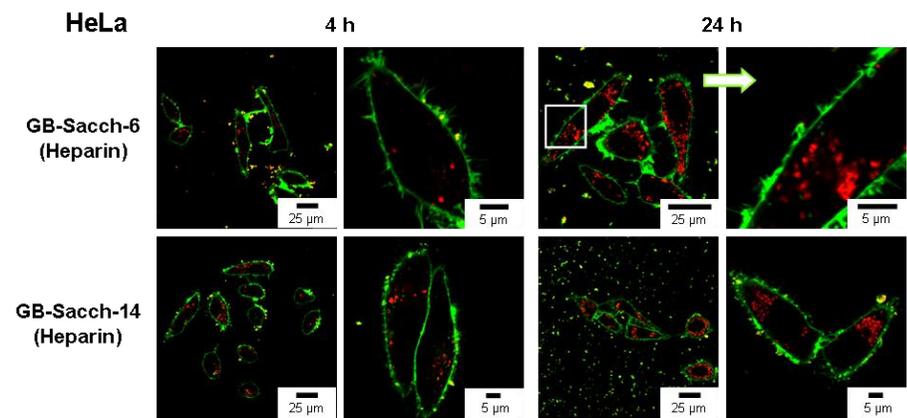


Abb. 4.50b

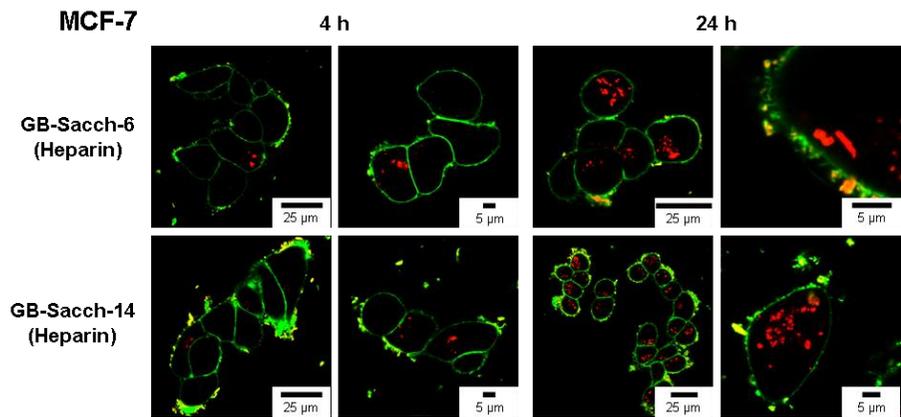


Abb. 4.50c

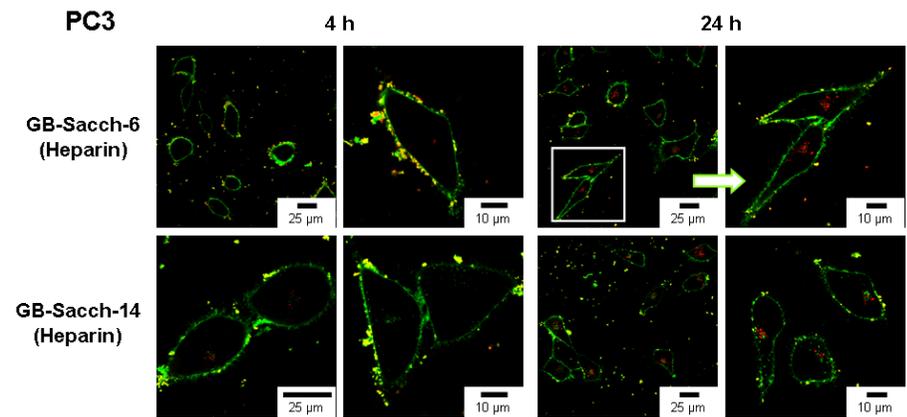


Abb. 4.50d

Abb. 4.50a-d: CLSM-Aufnahmen von HepG2-Zellen (a), HeLa-zellen (b), MCF-7-Zellen (c) und PC-3-Zellen (d) nach Inkubation mit GB-Sacch-6 und GB-Sacch-14 (siehe Beschriftungen) nach 4 h (jeweils die beiden linken Spalten) und 24 h (jeweils die beiden rechten Spalten). Die Zellmembran ist grün (CellMask deep Red) und die Heparin-Nanokapseln sind rot (SR 101) dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Heparin-Nanokapseln eine gute zelluläre Aufnahme in allen Zelllinien, insbesondere nach einer Inkubationszeit von 24 h, verzeichnen. Die stärkste Aufnahmerate innerhalb dieser Versuchsreihe weisen die HepG2-Zellen auf. HepG2-Zellen zeigen somit ein Potential für einen Wirkstofftransport mit Heparin-Nanokapseln. Eine mögliche Spaltbarkeit der Nanokapseln sowie deren Verhalten im Blutstrom (vgl. oben und siehe nachfolgender Abschnitt) müssen hierzu noch weiterführend untersucht werden.

4.4.2.2 Aufnahme von Heparin-Nanokapseln in Leukozyten

Die Heparin-Nanokapseln GB-Sacch-6 und GB-Sacch-14 wurde in mit Li-Heparin antikoagulierten peripheren Vollblut analysiert und zeigten dort eine zelluläre Aufnahme in CD14+ Monozyten und CD16+ neutrophile Granulozyten. Die Nanokapseln wurden rührend gelagert. Ein quantitative durchflusszytometrische Analyse der zellulären Aufnahme von GB-Sacch-14 durch die phagozytierenden CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophilen ist nach 2 und 8 h in Abb. 4.51 gezeigt (eingesetzte Konzentration $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

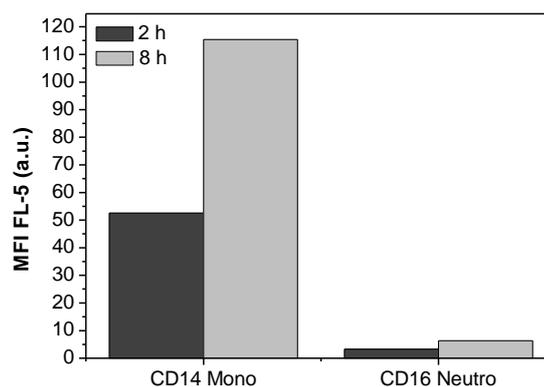


Abb. 4.51: Durchflusszytometrische Analyse von Heparin-Nanokapseln (eingesetzte Konz.: $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$): GB-Sacch-14 (redispersiert mit SDS) nach 2 h (hellgrau) und 8 h (dunkelgrau). Die zelluläre Aufnahme in CD14+ Monozyten und CD16+ Neutrophile wurde in mit Li-Heparin antikoaguliertem peripherem Vollblut analysiert (Einfachansätze). Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ist dargestellt.

In Abb. 4.51 ist zu sehen, dass CD14+ Monozyten nach 2 h eine zelluläre Aufnahme zeigen, die nach 8 h ca. verdoppelt ist. CD16+ Neutrophile zeigen weder nach 2 h noch nach 8 h eine nennenswerte Aufnahme. Li-Heparin wurde als Antikoagulans verwendet. Allerdings wurde die Zellzahl sowohl der Monozyten, als auch der Neutrophilen nach 8 h deutlich reduziert, so dass deutlich weniger Zellen detektiert werden konnten als nach 2-stündiger Inkubationszeit. Dies könnte einen Hinweis auf eine mögliche Zytotoxizität der Heparin-Nanokapseln liefern. Des Weiteren muss die intrazelluläre Lokalisation mittels CLSM-Aufnahmen noch bestätigt werden.

4.4.3 Diverse Nanokapseln vor und nach Folsäure-Kopplung

Im Folgenden wird die Eignung von Folsäure als Ligand von diversen Nanokapseln aus biokompatiblen Monomeren und Makromolekülen für einen gezielten Transport in FR α -positive HeLa-Zellen untersucht^[338].

Viele Tumore exprimieren FR α ; hingegen ist in vielen gesunden Geweben, mit wenigen Ausnahmen, beispielsweise der Niere, dieser Rezeptor nicht exprimiert (siehe 2.1.3.4).

Des Weiteren werden A549-Zellen und MSC hinsichtlich ihres zellulären Aufnahmevermögens für diese Folsäure-gekoppelten Nanokapseln getestet. Die A549-Zellen sind literaturbekannt FR α -negativ^[262, 327, 338], die in diesen Versuchsreihen eingesetzten MSC sind ebenfalls FR α -negativ. Für alle Zelllinien wurde die FR α -Expriemierung bzw. nicht-Expriemierung mit FOLR1-Antikörpern (gegen FR α gerichtet) bestätigt.

Die für diese Zellkulturexperimente von Frau Dr. Grit Baier synthetisierten Nanokapseln^[339] wurden nach Redispersierung (R) in wässriger SDS-Lösung (0,1 Gew.-%) mittels EDC-Kopplung entweder direkt an die γ -ständige Carboxylgruppe der Folsäure (Experiment 1) oder an ein NH₂-ständiges Folsäure-Konjugat (Experiment 2) gekoppelt. Herr Dr. Jörg Max Siebert synthetisierte das Folsäure-Konjugat. Die Kopplung der Folsäure an den aminofunktionalisierten Linker erfolgt an der γ -ständigen Carboxylgruppe (Abb. 4.52).

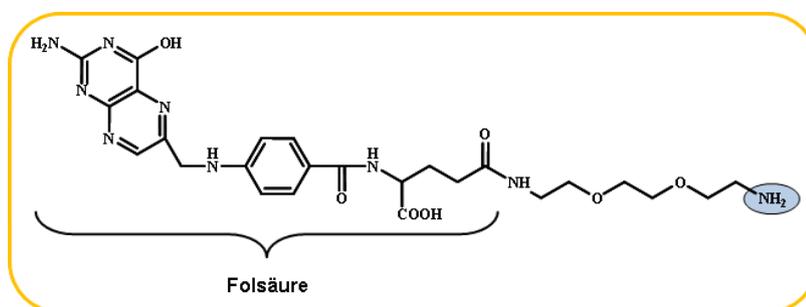


Abb. 4.52: NH₂-terminiertes Folsäure-Konjugat.

Die Carboxylgruppen der Folsäure (Experiment 1) werden mit N-Ethyl-N'-dimethylaminopropylcarbodiimid (EDC) aktiviert, danach erfolgt die Anbindung an die auf den Kapseloberflächen vorhandenen Aminogruppen. Als Katalysator dient N-Hydroxysulfo-succinimid (Sulfo-NHS).

Im Falle von Experiment 2 ist eine Überführung der redispersierten Nanokapseln (R) in eine carboxymethylierte Zwischenstufe (CM) nötig, um die Kopplung mit dem aminofunktionalisierten Folsäure-Konjugat (Abb. 4.52) zu ermöglichen. Eine schematische Darstellung des Syntheseprozesses ist in Abb. 4.53 gezeigt. Aufgrund dieser Synthesewege

bleibt die Folsäure physiologisch aktiv (Kopplung an der γ -ständigen Carboxylgruppe) und behält ihre Affinität zu FR α bei^[173] (vgl. 2.1.3.4).

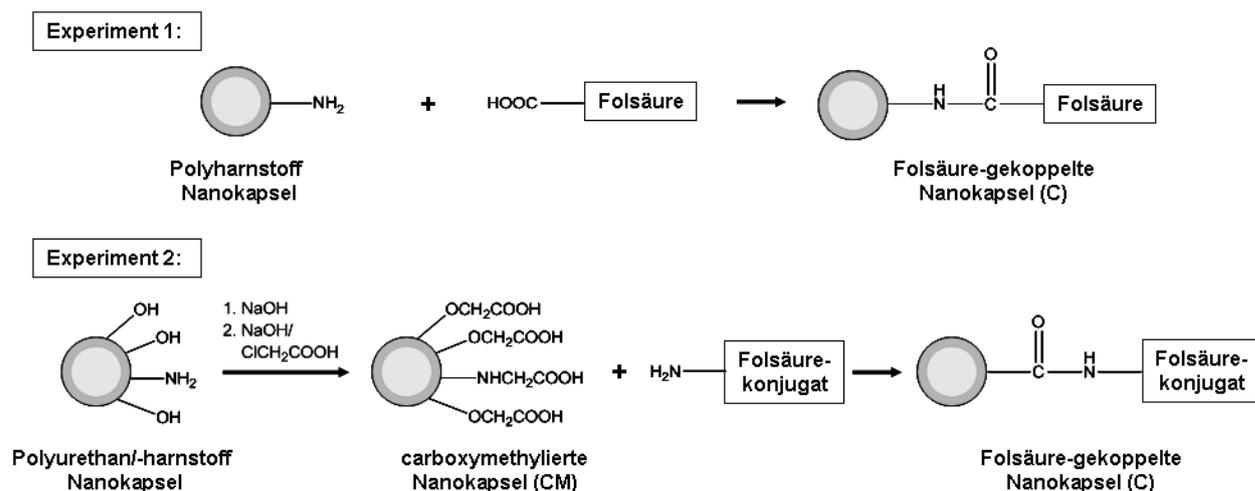


Abb. 4.53: Schematische Darstellung der Ankopplung von Folsäure (Experiment 1) und des Folsäure-Konjugates an carboxymethylierte Nanokapseln (Experiment 2).

In Tabelle 4.4 wird eine Übersicht über die Nanokapseln, die für die Zellkulturexperimente eingesetzt wurden, gegeben und das jeweilige Syntheseverfahren, das zur Ankopplung der Folsäure bzw. des Folsäure-Konjugates an Polyharnstoff- bzw. Polyurethan/-harnstoff-Nanokapseln erforderlich ist, genannt.

Tabelle 4.4: Übersicht der Nanokapseln mit Bezeichnung des Syntheseverfahrens für die Folsäure-Kopplung.

Art des Polymers	Probenbezeichnung	Monomer/Makromolekül	Folsäure-Kopplung
Polyharnstoff	GB-M-77	Triethylentetramin (TET)	Experiment 1:
Polyharnstoff	GB-M-80	Diaminohexan (DH)	Direkte Kopplung an
Polyharnstoff	GB-M-92	Diethylentriamin (DET)	Folsäure
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-85	Milchsäure (MS)	
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-86	Mannitol (MA)	Experiment 2:
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-87	Hyaluronsäure (HS)	Kopplung des
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-88	Kartoffelstärke (KS)	Folsäure-Konjugats an
Polyurethan/-harnstoff	GB-M-90	Hydroxyethylstärke (HES 200)	carboxymethylierte Zwischenstufe (CM)

Weitere Eigenschaften der redispergierten (R), carboxymethylierten (CM) und Folsäuregekoppelten Nanokapseln werden in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die Analysen der nachfolgenden Zellkulturexperimente werden wie folgt durchgeführt: Die quantitativen (Durchflusszytometrie) und qualitativen (CLSM) Analysen wurden entsprechend den beschriebenen Zellkulturexperimenten durchgeführt. Für allgemeine Versuche wurden HeLa-Zellen und MSC verwendet. Es wurde DMEM mit 10 Vol.-% FCS und Penicillin/Streptomycin eingesetzt, sowie eine Konzentration von $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ zur Inkubation der Zellen mit den Nanokapseln verwendet. Die Nanokapseln wurden bis zur Zugabe permanent gerührt und alle wurden mit wässriger SDS-Lösung (0,1 Gew.-%) redispergiert. Die Zellviabilität wurde für HeLa und MSC mittels MTS-Assay und anschließender Absorptionmessung am Microplate-Reader untersucht. Für alle Nanokapseln wurde ermittelt, dass deren Viabilität und Stoffwechselaktivität im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nicht beeinträchtigt ist.

4.4.3.1 Zelluläre Aufnahme von redispergierten und Folsäure-gekoppelten Nanokapseln aus verschiedenen Monomeren und Makromolekülen in HeLa-Zellen

Anhand der nachfolgenden Experimentreihe werden Nanokapseln aus diversen Monomeren und biokompatiblen Makromolekülen, die in Tabelle 4.4 aufgeführt sind in Bezug auf deren zelluläre Aufnahme in HeLa-Zellen untersucht. Um eine gezielte Folsäure-vermittelte zelluläre Aufnahme zu erreichen ist es bedeutsam, dass die unfunktionalisierten, redispergierten Nanokapseln (R) vor der Folsäure-Konjugation keine bzw. nur eine geringe zelluläre Aufnahme aufweisen. Eine gezielte Untersuchung des Einflusses der Funktionalisierung durch Folsäure ist darauffolgend möglich. In der beschriebenen Experimentreihe werden anhand dieses Kriteriums redispergierte Nanokapseln (R) ausgewählt, die im Vergleich zu carboxymethylierten (CM) und Folsäure gekoppelten (C) Nanokapseln eine sehr geringe zelluläre Aufnahme zeigen.

a.) Polyharnstoff-Nanokapseln ohne carboxymethylierte Zwischenstufe:

In Abb. 4.54 sind durchflusszytometrische Analysen (Inkubationsdauer 24 h, $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in HeLa-Zellen für folgende Nanokapseln aus Monomeren, die keine Carboxymethylierung als Zwischenstufe für die Folsäure-Kopplung benötigen, dargestellt: Triethylentetramin (GB-M-77 (TET)), Diaminohexan (GB-M-80 (DH)) und Diethylentriamin (GB-M-92 (DET)). Bei GB-M-80 (DH) und GB-M-92 (DET) zeigen die redispergierten Nanokapseln (R) eine schwächere zelluläre Aufnahme als die Folsäure-gekoppelten Nanokapseln (C).

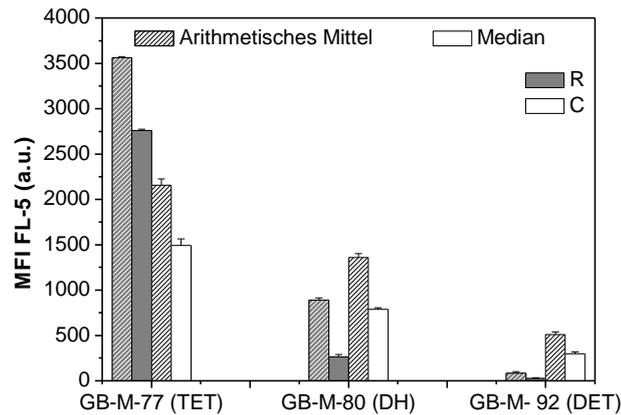


Abb. 4.54: Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit GB-M-77 (TET), GB-M-80 (DH) und GB-M-92 (DET), jeweils redispersiert (R) (dunkelgrau) und nach Folsäure-Kopplung (C) (weiß). Das arithmetische Mittel (liniert) und der Median (flächig) der Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind gezeigt. Die Mittelwerte aus Dreifachansätzen mit Standardabweichungen sind dargestellt.

Bei GB-M-77 (TET) ist die zelluläre Aufnahme der redispersierten (R) Nanokapsel größer als die der Folsäure-gekoppelten (C) (Abb. 4.54). Des Weiteren ist ein deutlicher Unterschied der Fluoreszenzintensitäten bei allen Proben ((R) und (C)) zwischen arithmetischen Mittel und Median gegeben, der auf eine ungleichmäßige zelluläre Aufnahme hinweist. Die CLSM-Aufnahmen in Abb. 4.55 bestätigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse.

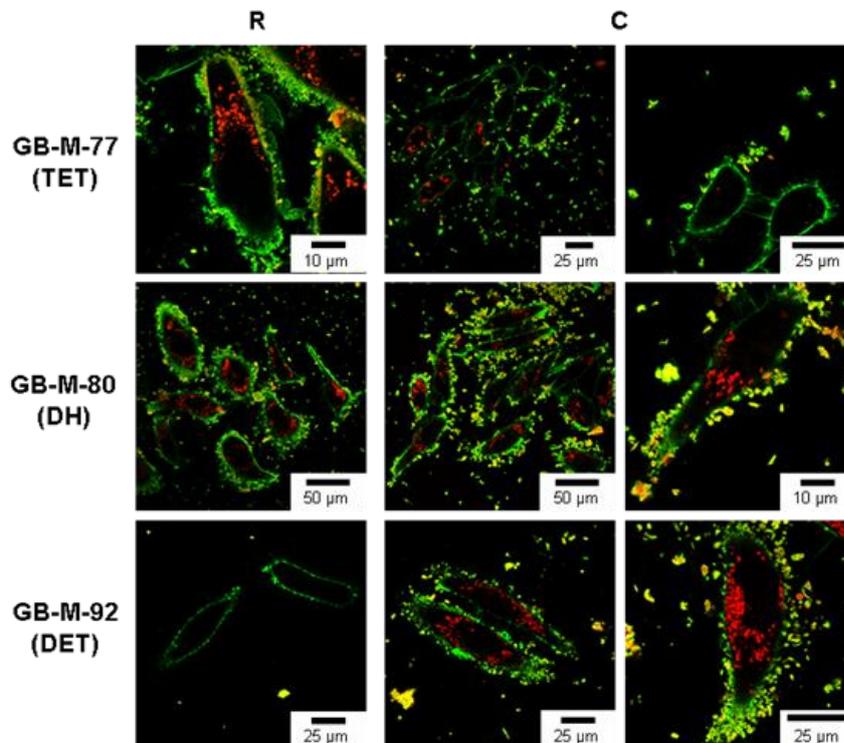


Abb. 4.55: CLSM-Aufnahmen mit HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit GB-M-77 (TET), GB-M-80 (DH) und GB-M-92 (DET), jeweils redispersiert (R) (linke Spalte) und nach Folsäure-Kopplung (C) (mittlere und rechte Spalte). Die Zellmembranen sind grün (CellMask Deep Red) und die Nanokapseln rot (SR 101) dargestellt.

Anlagerungen der Nanokapseln an den Zellmembranen sind zu beobachten (Abb. 4.55), allerdings sind diese auf allen HeLa-Zellen gleichmäßig verteilt und nicht selektiv auf bestimmten HeLa-Zellen, wie es bei den HS-Nanokapseln zu beobachten ist (siehe 4.4.1).

Diverse Vorversuche mit HeLa-Zellen (Standard DMEM enthält 9,1 μ M Folsäure) zeigten, dass die Aufnahme von Folsäure-gekoppelten Nanokapseln (C) aus unterschiedlichen Monomeren mehrfach höher ist als die der ungekoppelten Nanokapseln (R).

b.) Polyurethan/-harnstoff-Nanokapseln mit carboxymethylierter Zwischenstufe:

Die Ankopplung des Folsäure-Konjugates erfordert bei Polyurethan/-harnstoff-Nanokapseln einen Carboxymethylierungsschritt (siehe Abb. 4.53). Diese carboxymethylierten Nanokapseln (CM) werden ebenfalls hinsichtlich der zellulären Aufnahme untersucht. Ebenso wie die redispergierten Nanokapseln nach der Kapselsynthese (R) sollen die carboxymethylierten Nanokapseln keine bzw. eine geringe intrazelluläre Aufnahme aufweisen, damit ein die zelluläre Aufnahme steigender Effekt durch die Carboxymethylierung weitestgehend ausgeschlossen werden kann. In Abb. 4.56 sind Resultate von durchflusszytometrischen Experimenten mit Nanokapseln, die eine Carboxymethylierung als Zwischenstufe vor der Folsäurekopplung benötigen, dargestellt.

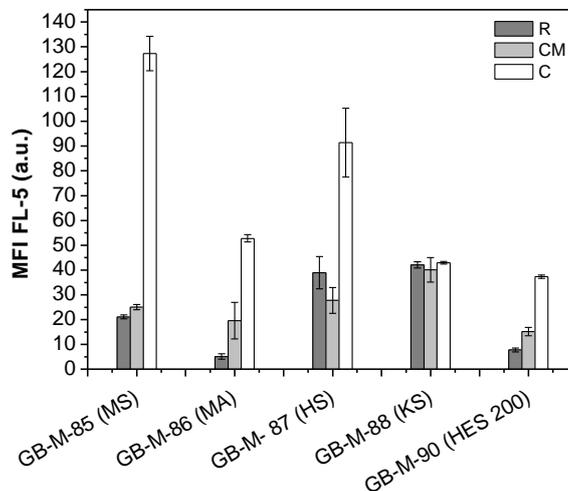


Abb. 4.56: Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit GB-M-85 (MS), GB-M-86 (MA), GB-M-87 (HS), GB-M-88 (KS) und GB-M-90 (HES 200), jeweils redispergiert (R) (dunkelgrau), carboxymethyliert (CM) (hellgrau) und nach Folsäure-Kopplung (C) (weiß). Der Median der Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind gezeigt. Die Mittelwerte aus Dreifachansätzen mit Standardabweichungen sind dargestellt.

Es wurden biokompatible und bioabbaubare Monomere wie Milchsäure (GB-M-85 (MS)) und Mannitol (GB-M-86 (MA)), das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure (GB-M-87 (HS)) und die Polysaccharide Kartoffelstärke (GB-M-88 (KS)) und Hydroxyethylstärke mit einer molaren

Masse von $200\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (GB-M-90 (HES 200)) eingesetzt. Meist zeigen die Nanokapseln nach Folsäure-Kopplung (C) eine deutlich höhere Aufnahme als nach Redispersierung (R) oder Carboxymethylierung (CM) (Abb. 4.56). GB-M-88 (KS) zeigt keine Aufnahmesteigerung bedingt durch eine Folsäure-Kopplung. Das arithmetische Mittel zeigt im Vergleich zum Median Abweichungen zu leicht höheren Fluoreszenzintensitäten, insbesondere bei Proben, die mit GB-M-87 (HS) inkubiert wurden (aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur den Median gezeigt). Die Standardabweichungen zeigen bei GB-M-87 (HS) ebenfalls die größten Werte. Damit werden die Ergebnisse aus Abschnitt 4.4.1 für HS-Nanokapseln bestätigt. Abb. 4.57 zeigt entsprechende CLSM-Aufnahmen.

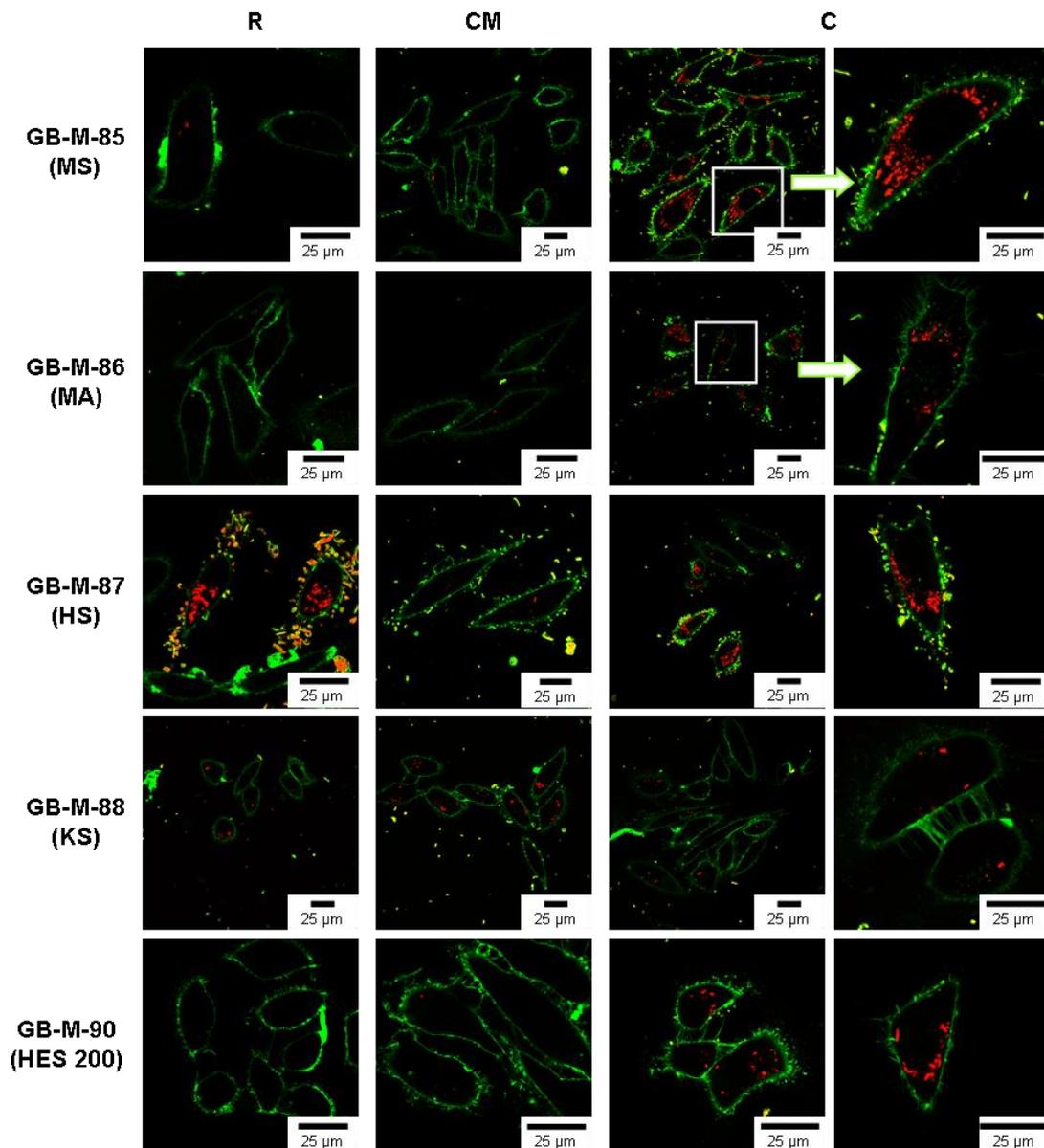


Abb. 4.57: CLSM-Aufnahmen mit HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit GB-M-85 (MS), GB-M-86 (MA), GB-M-87 (HS), GB-M-88 (KS) und GB-M-90 (HES 200), jeweils redispersiert (R) (erste Spalte), carboxymethyliert (CM) (zweite Spalte) und nach Folsäure-Kopplung (C) (dritte und vierte Spalte). Die Zellmembranen sind grün (CellMask Deep Red) und die Nanokapseln rot (SR 101) dargestellt.

Die durchflusszytometrischen Analysen werden durch CLSM-Aufnahmen in Abb. 4.57 belegt. Diese Experimente mit HeLa-Zellen (in Standard DMEM) zeigten, dass die intrazelluläre Aufnahme von Folsäure-gekoppelten Nanokapseln (C) mehrfach höher ist, mit Ausnahme von GB-M-88 (KS), als die der ungekoppelten Nanokapseln nach Redispergierung (R) und nach Carboxymethylierung (CM).

4.4.3.2 Zelluläre Aufnahme einer redispergierten und einer Folsäure-gekoppelten Nanokapsel in MSC

In nachfolgenden Experimenten wurden durchflusszytometrische Analysen mit MSC mit ausgewählten Nanokapseln, mit und ohne carboxymethylierter Zwischenstufe, durchgeführt, um die Auswirkungen einer Folsäure-Kopplung auf die zelluläre Aufnahme zu untersuchen. Für diese Experimente wurden aufgrund der in HeLa-Zellen erzielten Ergebnisse die Nanokapseln GB-M-92 (DET) und GB-M-90 (HES 200) ausgewählt. Die Inkubationsdauer betrug für die durchgeführten Versuche jeweils 8 h. Diese Versuche wurden in Folsäure-haltigen Standard-Medien (für MSC α -MEM 2,3 μ M Folsäure) durchgeführt.

In Abb. 4.58 sind die Resultate der durchflusszytometrischen Analyse von GB-M-92 (DET) (A) und GB-M-90 (HES 200) (B) in MSC dargestellt.

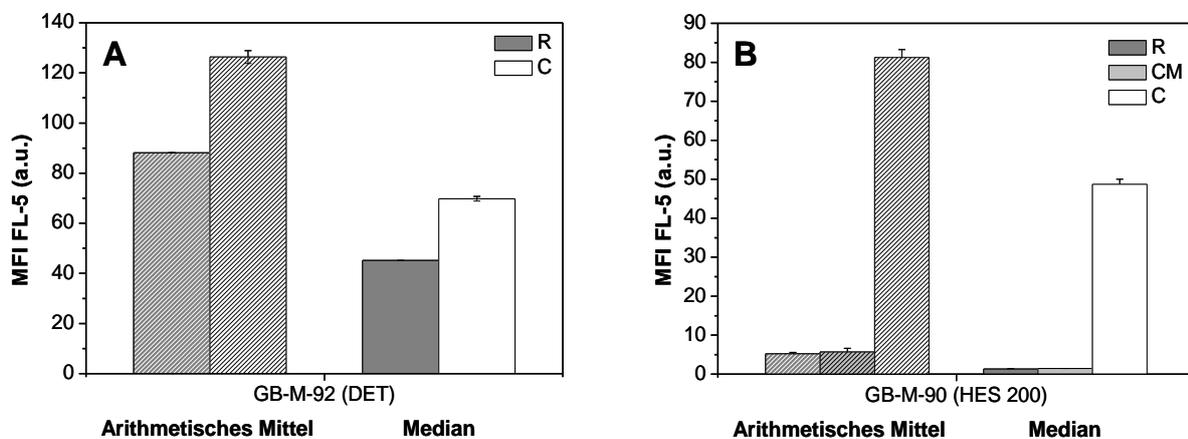


Abb. 4.58: Durchflusszytometrische Analyse von MSC nach 8-stündiger Inkubation mit GB-M-92 (DET) (Diagramm (A)) und GB-M-90 (HES 200) (Diagramm (B)), jeweils redispergiert (R) (dunkelgrau) und nach Folsäure-Kopplung (C) (weiß). Die carboxymethylierte Zwischenstufe (CM) der Nanokapsel GB-M-90 (HES 200) ist in Diagramm (B) hellgrau dargestellt. Das arithmetische Mittel (liniert) und der Median (flächig) der Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind gezeigt. Die Mittelwerte aus Dreifachansätzen mit Standardabweichungen sind dargestellt.

Das arithmetische Mittel (liniert) und der Median (flächig) sind vergleichend dargestellt und zeigen einen Unterschied bezüglich der Fluoreszenzintensitäten, sowohl für redispergierte (R), als auch für Folsäure-gekoppelte Nanokapseln (C) (Abb. 4.58). Die zelluläre Aufnahme von GB-M-90 (CM) ist vergleichbar schwach wie die von GB-M-90 (R).

In Abb. 4.59 sind CLSM-Aufnahmen von MSC nach 8-stündiger Inkubation mit GB-M-90 (HES 200) dargestellt.

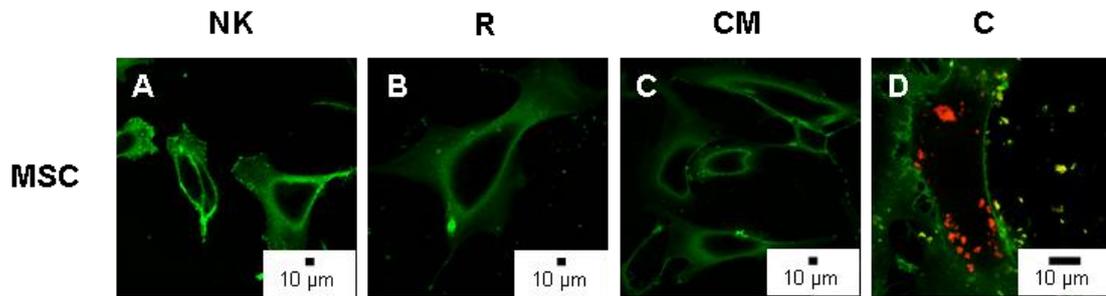


Abb. 4.59: CLSM-Aufnahmen von MSC nach 8-stündiger Inkubation mit GB-M-90 (HES 200). Die Negativkontrollen (NK) (erste Spalte), redispergiert (R) (zweite Spalte), carboxymethyliert (CM) (dritte Spalte) und nach Folsäure-Kopplung (C) (vierte Spalte) sind gezeigt. Die Zellmembranen sind grün (CellMask Deep Red) und die Nanokapseln rot (SR 101) dargestellt.

Die MSC zeigen für (C) (Abb. 4.59, Aufnahme D) eine deutliche zelluläre Aufnahme, für (R) eine sehr geringe und insgesamt wenige Anlagerungen der Nanokapseln an den Zellmembranen. Diese Anlagerungen sind in gelb abgebildet, verursacht durch Überlagerung von grün dargestellter Zellmembran und rot dargestellten Nanokapseln.

Für MSC sind die gleichen Effekte wie bei der Inkubation von HeLa-Zellen für GB-M-92 (DET) und GB-M-90 (HES 200) zu beobachten. (R) und respektive (CM) zeigen keine bis eine sehr geringe zelluläre Aufnahme, hingegen für (C) eine deutliche Aufnahmesteigerung.

4.4.4 Folsäure-gekoppelte Hydroxyethylstärke-Nanokapseln: Untersuchungen zur zielgerichteten Folsäure-Rezeptor α vermittelten Zellaufnahme

Durch gezielte Zellexperimente in Folsäure-freiem und Folsäure-haltigem Zellkulturmedium (DMEM) wurden Folsäure-Rezeptor vermittelte Zellaufnahmen untersucht.

Diese Zellversuche wurden mit den HES-Nanokapseln (HES 200) durchgeführt (Abb. 4.60), weil diese Nanokapseln den in den vorausgehenden Experimenten beschriebenen Unterschied in der zellulären Aufnahme zwischen der redispergierten (R) und der Folsäure-gekoppelten (C) Nanokapsel zeigen. Redispergierte (R) und carboxymethylierte (CM) HES-Nanokapseln zeigten in mehrfach wiederholten Experimenten mit HeLa-Zellen eine sehr geringe Aufnahme. Darüber hinaus verfügt dieses Polysaccharid über interessante Eigenschaften für therapeutische Anwendungen. HES wird durch Hydroxyethylierung von Kartoffelstärke synthetisiert (Abb. 4.60); je höher der Substitutionsgrad, desto besser ist die Wasserlöslichkeit und desto langsamer erfolgt der Abbau durch Amylasen.

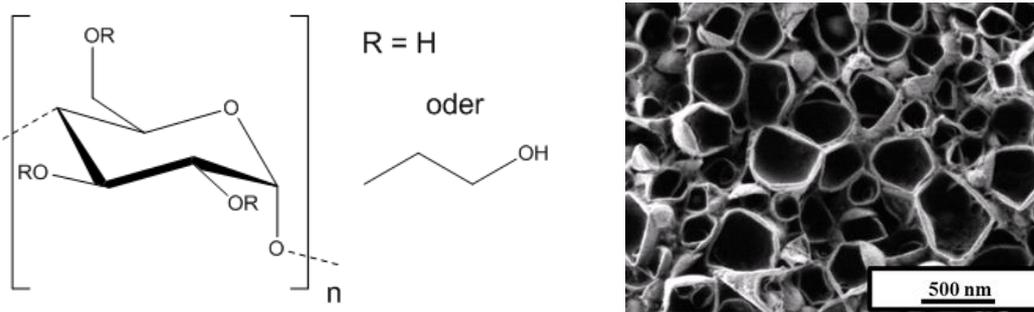


Abb. 4.60: Strukturformel von Hydroxyethylstärke und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von HES-Nanokapseln (Frau Dr. Grit Baier).

HES wird im Gefäßsystem und in Zellen des MPS zurückgehalten. Die Verweildauer von HES im Blutplasma im Vergleich zu nativer Stärke ist höher und HES kann als kolloid-osmotisch wirksames Agens die Blutviskosität erniedrigen und so die Mikrozirkulation im Gefäßsystem verbessern. Wegen dieser Eigenschaften wird HES therapeutisch als Blutersatzmittel verwendet sowie bei verschiedenen Krankheitsbildern mit Durchblutungsstörungen^[187].

HES-Nanokapseln erlauben die Einkapselung von hydrophilen Wirkstoffen und sollten aufgrund des biokompatiblen und enzymatisch spaltbaren Polysaccharids auch die Möglichkeit der Freisetzung des inkorporierten Wirkstoffes besitzen^[340]. Des Weiteren zeigen Polysaccharide ähnlich wie PEG eine erniedrigte Proteinadsorption aufgrund der flexiblen Ketten, die gut hydratisiert werden und dadurch die Proteine abgestoßen^[85-87]. Diese positiven Eigenschaften zusammen mit der verlängerten Verweildauer im Gefäßsystem machen HES zu einem hervorragenden Material für die Synthese von Nanokapseln als Wirkstofftransporter. Es wurden FR α exprimierende HeLa-Zellen^[338, 341], sowie A549-Zellen^[262, 338] (Humane Alveolare Epithel-Adenokarzinom-Zellen), welche diesen Folsäure-Rezeptor nicht tragen, verwendet. Mit diesen beiden Zelllinien sollte näher untersucht werden, ob zu einem gewissen Anteil eine FR α -vermittelte (spezifische) oder eine überwiegende nicht-spezifische zelluläre Aufnahme bei der Internalisierung von Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln (C) im Vergleich zu den redispergierten HES-Nanokapseln (R) vorliegt.

Die Expression des FR α auf HeLa-Zellen bzw. dessen Depletion auf A549-Zellen wurde durchflusszytometrisch mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper gegen FR α (FOLR1-APC, Maus anti-human) und entsprechenden Isotypkontrollen überprüft (Abb. 4.61).

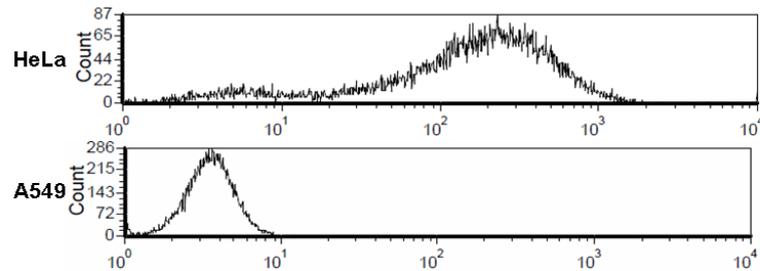


Abb. 4.61: Histogramme (FL-5) der durchflusszytometrischen Analysen von HeLa-Zellen und A549-Zellen nach Färbung mit Fluoreszenz-markiertem FR α -Antikörper (FOLR1-APC).

Die HES-Nanokapseln GB-M-90 und GB-Sacch-30 (redispergierte (R), carboxymethylierte (CM) und Folsäure-gekoppelte (C)) wurden nach Bestätigung der Zellviabilität mittels MTS-Assays für Zellversuche eingesetzt. Die Ergebnisse der Zellviabilitätsexperimente waren in allen Fällen positiv; d.h. die Stoffwechselaktivität der mit HES-Nanokapseln inkubierten Zellen betrug mehr als 90% der Stoffwechselaktivität der Negativ-Kontrolle. Alle HES-Nanokapseln lagen in einer wässrigen SDS-Lösung (0,1 Gew.-%) redispergiert vor.

Die Normierung für diese Versuche erfolgte auf die Anzahl der HES-Nanokapseln pro mL Kapseldispersion.

4.4.4.1 Zellaufnahme in DMEM (in Folsäure-haltigem Standardmedium)

In Abb. 4.62 ist eine durchflusszytometrische Analyse von GB-M-90 redispergiert (R) und Folsäure-gekoppelt (C) dargestellt. Nach 2, 8, und 20 h ist jeweils eine Zunahme der zellulären Aufnahme zu beobachten sowohl für (R) als auch für (C).

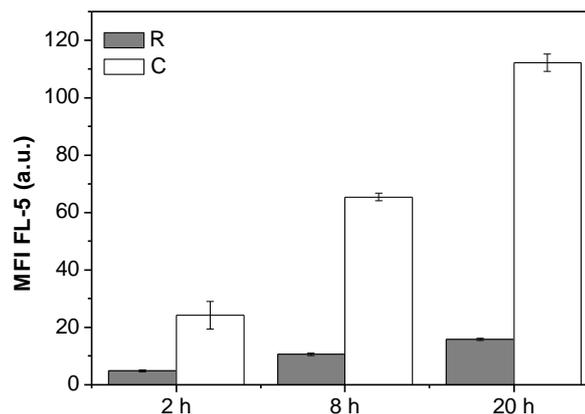


Abb. 4.62: Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen nach Inkubation mit GB-M-90 (HES 200) nach 2, 8 und 20 h, redispergiert (R) (dunkelgrau) und nach Folsäure-Kopplung (C) (weiß). Der Median (flächig) der Fluoreszenzintensität (MFI) ist gezeigt. Die Mittelwerte aus Dreifachansätzen mit Standardabweichungen sind dargestellt.

Die Aufnahmesteigerung von (R) ist nach den einzelnen Inkubationszeiten sehr gering und insgesamt auf einem deutlich niedrigeren Niveau als die von (C) (Abb. 4.62).

4.4.4.2 Zellaufnahmeexperimente mit additiver Folsäure in DMEM (in Folsäure-haltigem Standardmedium und PBS⁻)

Im weiteren Verlauf der Experimente mit HeLa-Zellen wurden Ansätze mit Standard-DMEM (M) (9,1 μ M) sowie Ansätze mit supplementierter Folsäure in Standard-DMEM (M FS) durchgeführt, so dass Konzentrationen von 1 mM im Zellkulturmedium erreicht wurden. Weiter wurden Ansätze in PBS⁻ (P), sowie in PBS⁻ supplementiert mit 1 mM Folsäure (P FS) für die durchflusszytometrische Experimente (Abb. 4.63) angesetzt.

Die HeLa-Zellen wurden alle in Standard-DMEM kultiviert, unmittelbar vor der Zugabe der HES-Nanokapseln wurde auf das entsprechende Medium gewechselt, eine Präinkubation mit Folsäure vor der Zugabe der HES-Nanokapseln, wie sie in den Experimenten in Abschnitt 4.4.4.4 durchgeführt wurde, fand bei diesen Experimenten nicht statt.

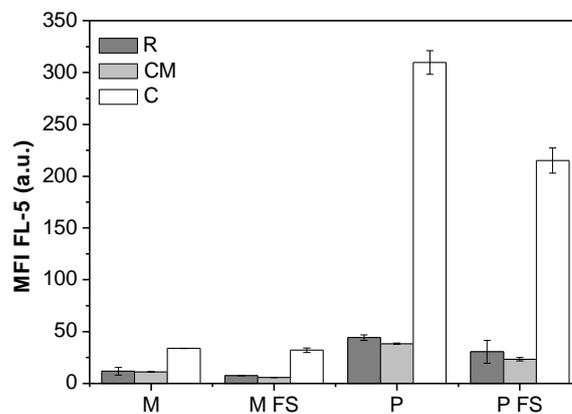


Abb. 4.63: Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen nach 8-stündiger Inkubation mit GB-M-90 (HES 200), jeweils redispergiert (R) (dunkelgrau), carboxymethyliert (CM) (hellgrau) und nach Folsäure-Kopplung (C) (weiß). Die Inkubation erfolgte in verschiedenen Zellkulturmedien: DMEM (M), DMEM mit additiver Folsäure (1 mM, M FS), PBS⁻ (P) und PBS⁻ mit additiver Folsäure (1 mM, P FS). Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ist gezeigt. Die Mittelwerte aus Dreifachansätzen mit Standardabweichungen sind dargestellt.

Auch hier ist bei allen Ansätzen eine deutlich größere Aufnahme der Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln (C) im Vergleich zu den redispergierten (R) und carboxymethylierten (CM) Nanokapseln zu beobachten (Abb. 4.63). Zwischen den Ansätzen, die in Standard-DMEM (M) und Standard-DMEM mit additiver Folsäure (1 mM) inkubiert wurden (M FS), zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede. Bei den Ansätzen, die in PBS⁻ mit additiver Folsäure (P FS) inkubiert wurden, zeigt sich im Vergleich zu den Ansätzen, die ohne additive Folsäure inkubiert wurden, eine niedrigere zelluläre Aufnahme von (C). Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche kompetitive Hemmung von Folsäure auf das zelluläre Aufnahmeverhalten von (C) sein. Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, wurden alle

folgenden Experimente mit Folsäure-freiem DMEM durchgeführt und entsprechend dann mit Folsäure supplementiert.

4.4.4.3 Analyse des zellulären Aufnahmeweges (mit und ohne additiver Folsäure in DMEM)

Die Folsäure-Aufnahme über den FR α erfolgt durch Caveolin-vermittelte-Endozytose (siehe 2.1.2.1 a.), 2.1.3.4, vgl. 4.4.4.5). Dieser Prozess ist Dynamin-abhängig. Mit 80 μ M Dynasore[®] wird Dynamin vollständig gehemmt^[342]. Dynasore[®] wurde in dieser Konzentration den Ansätzen für 30 min (in PBS⁺), zugegeben; die Inkubation mit den Nanokapseln erfolgte anschließend für 1 h in Folsäure-freiem DMEM (- FS) und in Folsäure-supplementiertem DMEM (1 mM, + FS) (Medien enthalten jeweils 10 Vol.-% FCS). Die Inkubation der HeLa-Zellen in Folsäure-freiem Medium erfolgt wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben. Die redispergierten (R) und die carboxymethylierten (CM) HES-Nanokapseln zeigen mit Dynasore[®], sowohl bei Ansätzen mit als auch ohne additiver Folsäure im Medium, keine Aufnahmehemmung (Abb. 4.64). Die Ansätze, die mit (C) inkubiert wurden, zeigen mit Dynasore[®], sowohl in Folsäure-freiem wie auch in Folsäure-haltigem DMEM, eine deutliche Hemmung der zellulären Aufnahme.

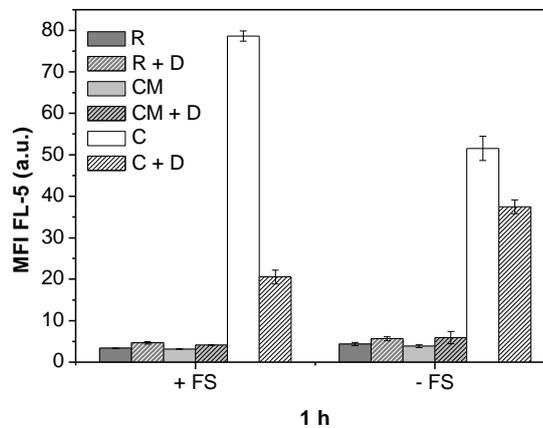


Abb. 4.64: Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit GB-M-90 (HES 200) in Folsäure-freiem DMEM (- FA) und Folsäure-haltigem DMEM (1 mM, + FA) in Gegenwart von Dynasore[®] 80 μ M. Die Ansätze der redispergierten (R) (dunkelgrau), carboxymethylierten (CM) (hellgrau) und Folsäure-gekoppelten (C) (weiß) Nanokapsel sind jeweils mit Dynasore[®] (liniert, + D) und ohne Dynasore[®] (flächig, - D) dargestellt. Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ist gezeigt. Die Mittelwerte aus Dreifachansätzen mit Standardabweichungen sind dargestellt.

Diese Ergebnisse deuten verstärkt darauf hin, dass Caveolin oder Clathrin bzw. Dynamin an der zellulären Aufnahme beteiligt sind und somit ein FR α -vermittelter Aufnahmeweg für (C) eine Rolle spielt. Für (R) und (CM) lässt sich dies anhand der Ergebnisse, die in Abb. 4.64 dargestellt sind, ausschließen.

4.4.4.4 Zellaufnahmeexperimente mit HeLa- und A549-Zellen in Folsäure-freiem DMEM mit und ohne additiver Folsäure

Mit der Folsäure-gekoppelten Nanokapsel GB-Sacch-30 wurde untersucht, ob durch additive Folsäure im Zellkulturmedium eine Hemmung der FR α -vermittelten Aufnahme bzw. Endozytose beobachtet werden kann. Die einzelnen Schritte, die von den routinemäßigen Zellversuchen abweichen, werden im Folgenden kurz beschrieben.

Die Expression von FR α wird neben anderen Faktoren durch eine Senkung des extrazellulären Folsäure-Spiegels gesteigert^[152]. Konventionelles DMEM enthält mit Konzentrationen von 9,1 μ M (siehe 4.4.4.2) ca. das 1000-fache der physiologischen Folat-Konzentrationen in humanem Serum (5-Methyltetrahydrofolat, 5-50nM)^[165]. Durch diese hohen Konzentrationen ist neben der Senkung der FR α -Expression ein Konkurrieren der gelösten Folsäure um die Folat-Rezeptoren mit den Folsäure-gekoppelten Nanokapseln zu erwarten. Additive Folsäure im Zellkulturmedium kann kompetitiv eine Folsäure-Rezeptor-vermittelte zelluläre Aufnahme von nanoskalierten, Folsäure-gekoppelten Formulierungen inhibieren^[262, 341, 343]. Aufgrund dessen wurden die Zellen insgesamt für 5 Tage (2 aufeinanderfolgende Passagen) in Folsäure-freiem DMEM kultiviert. Am dritten Tag erfolgte die Zellaussaat, am vierten Tag die Zugabe der Nanokapseln für die 24-stündige Inkubation und am fünften Tag die Zugabe für die 2 h-stündige Inkubationszeit sowie die Analysen (analog zu den routinemäßigen Zellexperimenten). Es sei noch erwähnt, dass durch FCS (10 Vol.-%), die für das Zellwachstum ausreichende Konzentrationen an Folaten enthalten sind^[174]; eine absolut Folat-freie Inkubation findet daher nicht statt. Dialysiertes Serum enthält 0,6-1 nM Folsäure^[344]. Die Entscheidung für eine 5-tägige Kultivierung in Folsäure-freiem DMEM wurde in Abwägung von Literaturangaben gewählt. Ähnliche Experimente wurden ohne^[262, 345], für mindestens zwei aufeinander folgende Passagen^[346] oder für 8-tägige^[174] vorausgehende Kultivierung in Folsäure-freiem Medium durchgeführt. Andere Arbeitsgruppen wählten ein Folsäure-freies Medium, gaben aber keine Kultivierungszeiten dazu an^[343]. In Zellkultur ist die Zellteilungsrate proportional zum intrazellulären Folat-Pool^[347].

Die Inkubationszeiten mit den Nanokapseln wurden auf 24 h, respektive zusätzlich 2 h für HeLa-Zellen, festgelegt. Oft werden kürzere Inkubationszeiten gewählt^[343], da bei kürzeren Intervallen auch eine Inkubation ohne FCS möglich ist. Ohne zusätzliche Serumproteine sind die Wechselwirkungen der Oberflächenstrukturen (gekoppelte Folsäure) mit den Zelloberflächen erleichtert. In den nachstehend beschriebenen Experimenten wurde aber immer mit einer 10%igen FCS-Konzentration (Vol.-%) gearbeitet, da Serumproteine realistischere Bedingungen in Bezug auf eine physiologische Umgebungen darstellen (siehe 4.1.2 und 4.2).

FR α -spezifische und -unspezifische Aufnahmemechanismen laufen zeitgleich ab. Eine Inkubationszeit von 24 h ermöglicht die maximale unspezifische Zellaufnahme^[262]. Kürzere Inkubationszeiten könnten eine FR α -vermittelte Aufnahme begünstigen. Deshalb wurden noch Inkubationsexperimente von 2 h mit HES-Nanokapseln durchgeführt. Generell läuft eine rezeptorabhängige Endozytose schneller ab als rezeptorunabhängige makropinozytisch bzw. „lipid raft“-vermittelte Prozesse^[348]. Folat-Rezeptoren werden schnell internalisiert und recycelt, so dass aber bereits nach 30 min die zelluläre Aufnahme abnimmt^[349-350].

Experimente, die Aufschluss über eine kompetitive/konkurrierende Aufnahme zwischen Folsäure und den Folsäure-gekoppelten Nanokapseln geben sollen, wurden durch Zugabe von diversen additiven Folsäure-Konzentrationen im Zellkulturmedium durchgeführt. Additive Folsäure besetzt die Folat-Rezeptoren bzw. wird zusammen mit den Folat-Rezeptoren endozytiert und inhibiert somit einem FR α -vermittelten Transport für Folsäure-gekoppelte Nanokapseln. Die additive Folsäure wurde 1 h vor der Nanokapselzugabe zur Zellkultur zugegeben. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur additiven Folsäure-Zugabe, von 30 min^[174, 343] bis zu 2 h^[262] und „über Nacht“^[345]. Letzteres ist aus vorausgehend beschriebenen Fakten nicht sinnvoll, zudem diese Versuche noch in konventionellem DMEM (mit Folsäure) durchgeführt wurden und additive Folsäure-Konzentrationen von 1-3 mM verwendet werden. In den Zellkulturexperimenten mit Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind maximale Konzentration von 1 mM Folsäure eingesetzt worden; dabei konnte beobachtet werden, dass eine 1mM Lösung der Folsäure nur bei RT und im Inkubator bei 37°C erzielt werden konnte. Mit dieser Konzentration ist nahezu die Sättigung erreicht, eine 3 mM Lösung in DMEM ist somit sehr fragwürdig. *Zhang et al.* beschrieben schon ab Konzentrationen von 20 μ M additiver Folsäure einen Hemmeffekt der Aufnahme von Folsäure-gekoppelten Nanodiamanten (140 nm). *Eisele et al.* verwendeten 0,2 μ M additive Folsäure.

Die Zellkulturexperimente mit FR α -positiven HeLa-Zellen (Abb. 4.65 (A)) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Folsäure im Zellkulturmedium durchgeführt (0,0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM) für 2 h und 24 h, die Experimente mit den FR α -negativen A549-Zellen als Vergleichsexperiment nach 24 h (Abb. 4.65 (B)). Die Normierung erfolgte bei diesen Experimenten auf die Anzahl der Nanokapseln pro mL.

Schließlich wurden noch, um eine größenabhängige zelluläre Aufnahme der HES-Nanokapseln mit einzubeziehen, zwei Fraktionen mit unterschiedlicher Größe der Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln separiert (durch Zentrifugation): (C1) mit einer durchschnittlichen Größe von 307 nm und (C2) mit einer durchschnittlichen Größe von 174 nm.

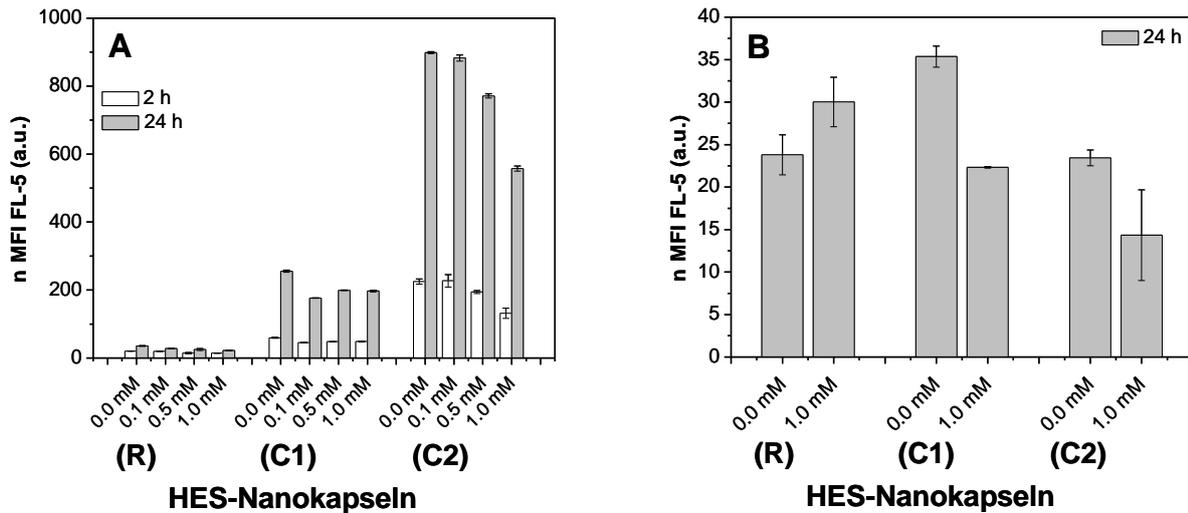


Abb. 4.65: Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen (A) und A549-Zellen (B) nach Inkubation mit GB-Sacch-30_R (R), GB-Sacch-30_C1 (C1) und GB-Sacch-30_C2 (C2). HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlichen Folsäure-Konzentrationen im Zellkulturmedium inkubiert: 0,0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM, jeweils für 2 h (weiß) und 24 h (hellgrau). Die Inkubation der A549-Zellen erfolgte in Folsäure-freiem Medium (0,0 mM) und 1,0 mM Folsäure-haltigem Medium für 24 h (hellgrau). Normierte Median (Nanokapseln·mL⁻¹) der Fluoreszenzintensität (n MFI) ist gezeigt. Die Mittelwerte aus Dreifachansätzen mit Standardabweichungen sind dargestellt.

Die Experimente mit HeLa-Zellen (Abb. 4.65 (A)) zeigen sowohl nach 2 h als auch nach 24 h eine sehr schwache zelluläre Aufnahme der redispergierte HES-Nanokapsel (R). Die Folsäure-gekoppelte HES-Nanokapsel der größeren „Fraktion“ (C1) zeigt nach 2 h, respektive nach 24 h eine deutliche Aufnahmesteigerung. Die additive Folsäure zeigt nur geringe Auswirkungen auf die zelluläre Aufnahme, jedoch ist die Aufnahmerate für alle Folsäure-supplementierten Ansätze etwas geringer im Vergleich zu dem Ansatz, der ohne Folsäure im Zellkulturmedium inkubiert wurde. Die Folsäure-gekoppelte HES-Nanokapsel der kleineren Kapsel-Fraktion (C2, 174 nm) zeigt im Vergleich zu (C1, 307 nm) eine deutliche Aufnahmesteigerung (um das 3-4fache) nach 2 und 24 h. Nach 2 h ist ein Rückgang der zellulären Aufnahmerate zu verzeichnen (bei Konzentrationen von 0,5 und 1,0 mM Folsäure). Nach 24 h ist ebenso ein deutlicher Rückgang der zellulären Aufnahmerate zu beobachten. Der Rückgang der zellulären Aufnahme zwischen dem Ansatz ohne additive Folsäure (0,0 mM) und dem Ansatz mit 1,0 mM Folsäure beträgt das 1,71-fache nach 2 h und das 1,61-fache nach 24 h.

Eine Größenabhängigkeit der zellulären Aufnahme von Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln ist sowohl für die Quantität gegeben (deutlich stärkere Aufnahme von (C2) mit einem mittleren Durchmesser von 174 nm im Vergleich zu (C1) mit einem mittleren Durchmesser von 307 nm), als auch für die kompetitive Hemmung der FR α -vermittelten zellulären Aufnahme durch additive Folsäure im Zellkulturmedium. Die durchflusszytometrischen Experimente mit A549-Zellen (Abb. 4.65 (B)) zeigen nach 24 h eine sehr schwache zelluläre

Aufnahme sowohl für (R) als auch für (C1) und (C2). Ein Einfluss der 1 mM Folsäure ist nicht zu beobachten.

In Abb. 4.66 sind die zu diesen durchflusszytometrischen Analysen gehörenden CLSM-Aufnahmen für HeLa-Zellen gezeigt.

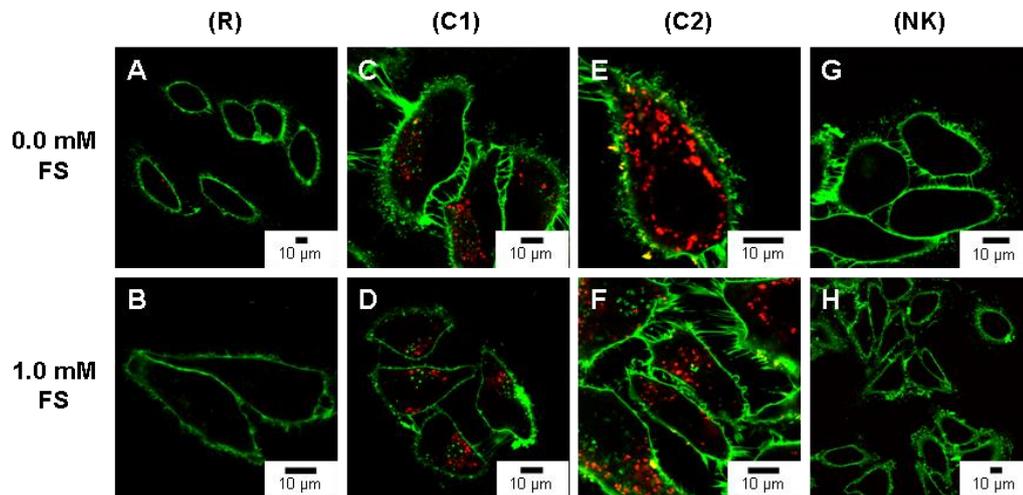


Abb. 4.66: CLSM-Analysen von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit GB-Sacch-30_R (R), GB-Sacch-30_C1 (C1) und GB-Sacch-30_C2 (C2) ohne additive Folsäure (0,0 mM FS, obere Reihe) und mit 1,0 mM (1,0 mM FS, untere Reihe) Folsäure im Zellkulturmedium. Die Zellmembran ist grün (CellMask Deep Red) und die HES-Nanokapsel rot (SR 101) dargestellt.

HeLa-Zellen in Abb. 4.66 zeigen eine geringe zelluläre Aufnahme für (R) eine gute zelluläre Aufnahme von (C1) und (C2) und nur wenige Anlagerungen an den Zellmembranen (gelb dargestellt). Alle Beobachtungen wurden mit und ohne additiver Folsäure (1 mM) gemacht.

In Abb. 4.67 sind die CLSM-Aufnahmen der A549-Zellen zu sehen.

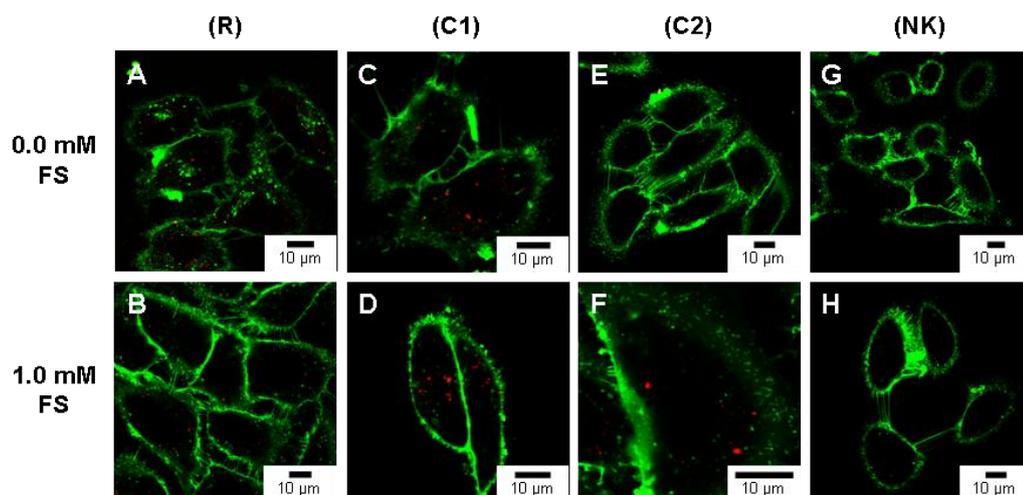


Abb. 4.67: CLSM-Aufnahmen von A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit GB-Sacch-30_R (R), GB-Sacch-30_C1 (C1) und GB-Sacch-30_C2 (C2) ohne additive Folsäure (0,0 mM FS, obere Reihe) und mit 1,0 mM (1,0 mM FS, untere Reihe) Folsäure im Zellkulturmedium. Die Zellmembran ist grün (CellMask Deep Red) und die HES-Nanokapsel rot (SR 101) dargestellt.

Sowohl (R), als auch (C1) und (C2) zeigen eine sehr geringe zelluläre Aufnahme in A549-Zellen (Abb. 4.67), jeweils mit und ohne additive Folsäure (1 mM) im Zellkulturmedium. Anlagerungen von GB-Sacch-30 an die Zellmembranen von A549-Zellen sind nicht zu beobachten.

4.4.4.5 CLSM-Experimente zur Lokalisation der Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln

Wie in den vorausgehenden CLSM-Experimenten gezeigt werden konnte, führt die zelluläre Aufnahme von HES-Nanokapseln nicht zu morphologischen Veränderungen der Zellen. Folsäure-gekoppelte Substrate können über einen FR α -vermittelten Endozytosemechanismus intrazellulär aufgenommen und in Endosomen gebracht oder im Zytoplasma freigesetzt werden (siehe 2.1.3.4 und vgl. 4.4.4.3). Um die intrazelluläre Lokalisation der Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapsel in HeLa-Zellen näher zu untersuchen, wurden Kolokalisationsexperimente durchgeführt und hierzu das endoplasmatische Retikulum (ER-TrackerTM Green dye Ex/Em 504/511 nm (300 nM)) und die Lysosomen (LysoTracker[®] green DND-26 Ex/Em 504/511 (100 nM)) angefärbt.

Wie in Abb. 4.68 und in den Querschnittsdarstellungen in Abb. 4.69 ((B)-(D)) zu sehen, zeigt die Folsäure-gekoppelte HES-Nanokapsel eine bevorzugte Lokalisation in der Nähe des ER. Dabei berühren sie aber nicht direkt den Zellkern, der vom ER umrandet wird. Möglicherweise stellt die Größe der Nanokapseln bzw. die Größe der zusammengelagerten Nanokapseln den Grund dafür dar.

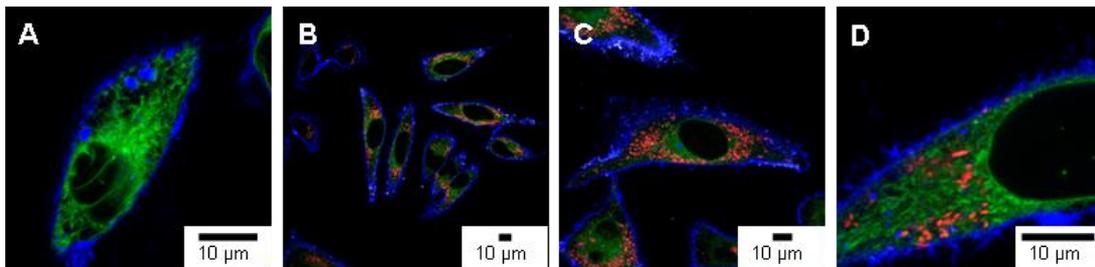


Abb. 4.68: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit der Folsäure-gekoppelten Nanokapsel GB-Sacch-30_C2 (HES 200) und angefärbtem ER: HeLa-Zelle mit angefärbtem ER (A), HeLa-Zelle mit angefärbtem ER und Folsäure-gekoppelter Nanokapsel (B)-(C). Die Zellmembran ist blau (CellMask Deep Red), das ER (grün) und die Nanokapsel rot (SR 101) dargestellt.

Eine Kolokalisation von rot dargestellten Nanokapseln und grün dargestelltem ER würde in gelben Überlagerungen erscheinen. Dies wurde nicht beobachtet (Abb. 4.68 und 4.69). Die Kolokalisationsexperimente mit dem angefärbten ER geben jedoch Aufschluss über die Lokalisierung der Nanokapseln in Bezug zum Zellkern.

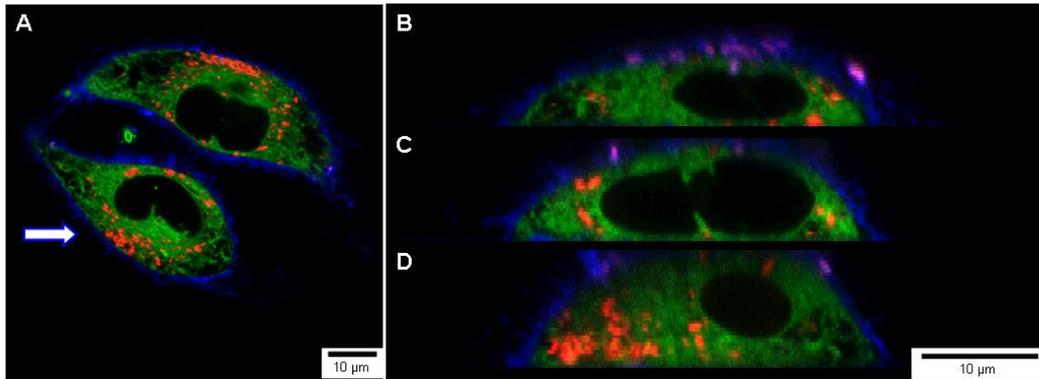


Abb. 4.69: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit der Folsäure-gekoppelten Nanokapsel GB-Sacch-30_C2 (HES 200) und angefärbtem ER: Konfokale Aufnahme der HeLa-Zelle mit angefärbtem ER und Folsäure-gekoppelter Nanokapseln (A). Konfokale Querschnitte (in y-Ebene) in Höhe des weißen Pfeiles (C), etwas oberhalb (B) und etwas unterhalb (D) sind dargestellt. Die Zellmembran ist blau (CellMask Deep Red), das ER (grün) und die Nanokapsel rot (SR 101) dargestellt.

Die Kolokalisationsexperimente mit den angefärbten Lysosomen sind in Abb. 4.70 gezeigt. Eine Kolokalisation der rot dargestellten Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln mit den grün dargestellten Lysosomen würde gelb erscheinen. Eine Gelbfärbung ist aber nicht zu erkennen. Dies zeigt, dass die Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln nicht in die Lysosomen gelangen. In Abb. 4.70 (B) ist eine 20-stündige und in Abb. 4.70 (C) eine 40-stündige Inkubationsdauer gezeigt.

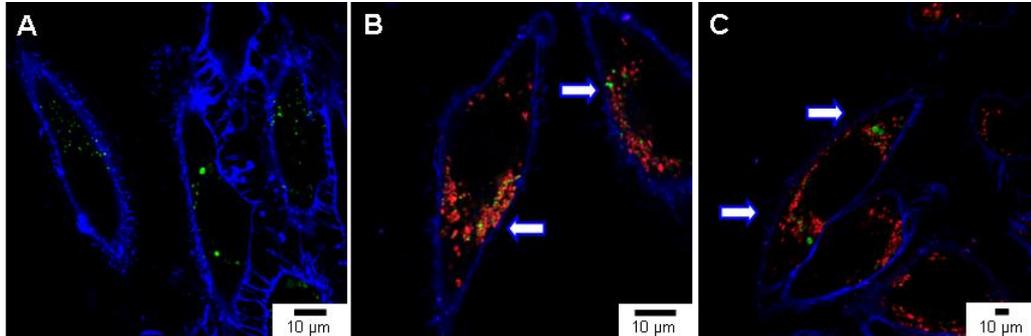


Abb. 4.70: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 20- (B) und 40-stündiger Inkubation mit der Folsäure-gekoppelten Nanokapsel GB-Sacch-30_C2 (HES 200) und angefärbten Lysosomen: HeLa-Zellen mit angefärbten Lysosomen (A), HeLa-Zellen mit angefärbten Lysosomen und Folsäure-gekoppelter Nanokapsel (B) nach 20 h und (C) nach 40 h. Die Zellmembranen sind blau (CellMask Deep Red), die Lysosomen (grün) und die Nanokapsel rot (SR 101) dargestellt.

Aufgrund der oben beschriebenen Kolokalisationsexperimente ist ein Verbleib der Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln in intrazellulären Vesikeln oder der Verbleib in Endosomen bzw. endozytotischen Kompartimenten, in denen sie nach $FR\alpha$ -vermittelter Aufnahme eingeschlossen werden, erwiesen, da sie keine Kolokalisation mit Lysosomen zeigen.

Diskussion der CLSM-Ergebnisse:

Die Folat-Aufnahme über den $FR\alpha$ erfolgt durch Endozytose. Folsäure bzw. Folate sind für die Zellen essentiell und werden deshalb nicht in Lysosomen zum weiteren Verdau gebracht.

Folsäure-gekoppelte Wirkstofftransportsysteme können einen endozytotischen Aufnahmeweg nehmen, der die Wirkstoffkonjugate zum größten Teil in Endosomen bringt und nicht in Lysosomen^[14, 182]. Folsäure-gekoppelte Wirkstofftransportsysteme werden somit vermehrt in endozytotische Kompartimente gebracht und können in das Zytoplasma freigesetzt werden^[182]. Zu bedenken gilt für einen möglichen Wirkstofftransport bzw. eine Wirkstofffreisetzung, dass in Endosomen ein höherer pH-Wert von 6,8 im Vergleich zu Lysosomen mit pH 5 vorliegt^[351].

Die genauen Aufnahmewege sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt. *Rothberg* et al. nahmen an, dass FR α als Cluster in Einstülpungen der Zellmembranen vorliegen, den sogenannten Caveolae, und dort der gesamte Rezeptor-Membran-Komplex internalisiert wird^[352]. Darauf folgende Studien widerlegten die Caveolae-Hypothese und zeigten, dass GPI-verankerte Proteine ubiquitär auf der Zellmembran vorkommen und nach einer Vernetzung (engl. *cross-linking*) der FR α -Rezeptoren eine Bedingung für die Clusterbildung in Caveolae sind und zeigten, dass diese Vernetzung nicht durch Folat hergestellt werden kann^[353]. Neuere Entwicklungen diskutieren eine Lipid-Raft-abhängige Endozytose. Lipid-Rafts sind Mikrodomänen in der Zellmembran, die reich an Cholesterin-, Glykosphingolipiden- und Glykosylphosphatidylinositol-verankerten (GPI) Proteinen sind (siehe 2.1.2.1 a.)). Diese Lipid-Rafts können größere Cluster bilden und Membrankomponenten abschnüren und regulierend in verschiedene Zellstoffwechselprozesse eingreifen^[354-355]. Die Rolle von Lipid-Rafts wurde in verschiedenen Studien belegt^[178, 356]. Das Recycling des FR α im Zytosol bzw. in den Endosomen muss noch aufgeklärt werden^[354, 357]. In frühen Endosomen können Wirkstoffe, die über Disulfidbrücken an Folat gebunden sind, gespalten werden^[177]. Diese frühen Endosomen verweilen nicht lange an der Zellperipherie, sondern wandern in die Nähe des Zellkerns, wo sie recycelt werden^[177, 356] und das Folat vom Wirkstoff gespalten wird. Der Wirkstoff gelangt in ein Endosom und der Rezeptor wird in einem separaten Endosom recycelt und wieder zurück an die Zelloberfläche gebracht^[177, 356].

In der Literatur wird diskutiert, dass multivalente Folat-Konjugate, wie Folat-gekoppelte Liposomen, nicht dem endosomal Aufnahmeweg folgen, sondern direkt in Lysosomen gebracht werden, wo sowohl der Rezeptor, als auch das multivalente Folat-Konjugat mit lysosomale Enzymen konfrontiert und verdaut werden^[154, 351, 358].

Wie in der Abb. 4.70 gezeigt, sind die Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln nicht in Lysosomen lokalisiert, auch nicht nach einer längeren Inkubationszeit von 40 h.

4.4.4.6 Eigenschaften und Nutzen der Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln als Wirkstofftransporter

Nanokapseln und Liposomen bieten den großen Vorteil, dass eine große Anzahl an Wirkstoffmolekülen in deren Inneren transportiert werden können; es konnten 10^3 bis 10^4 Wirkstoffmoleküle beispielsweise in Liposomen eingeschlossen werden^[14]. Somit können therapeutisch wirksame Konzentrationen im Zellinneren weitaus schneller erreicht werden. Mit Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln als Wirkstofftransportern müssen hohe Wirkstoffdosen in Zielzellen eingebracht werden, da die meisten Krebsarten nur 1-3 Millionen FR-Rezeptoren pro Zelle exprimieren^[155-156] und somit die möglichen Kontaktstellen für Wechselwirkungen mit den Folsäure-gekoppelten Nanokapseln nicht sehr vielfältig sind.

All diese Voraussetzungen werden mit den von Frau Dr. Grit Baier synthetisierten Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln erreicht. Eine Verringerung der Proteinadsorption und dadurch eine Verlängerung der Zirkulation im Blutstrom könnte zusätzlich durch die Variation bzw. Verlängerung der PEG-Einheit des Folsäure-Konjugates erreicht werden. Eine dadurch verminderte Oponisierung der HES-Nanokapseln reduziert die Phagozytose durch Zellen des MPS und verlängert die Zirkulationsdauer im Blutstrom für die Anreicherung im Zielgewebe.

4.4.4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Eine FR α -vermittelte zelluläre Aufnahme ist abhängig von der Größe der HES-Nanokapseln. Die Folsäure-gekoppelten Nanokapseln der kleineren Größenfraktionen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 174 nm (GB-Sacch-30_C2) werden stärker als die größere Fraktion (GB-Sacch-30_C1, 307 nm) aufgenommen und zeigen einen Hemmeffekt durch additive Folsäure. Möglicherweise interagieren kleinere Nanokapseln besser mit den FR α -Rezeptoren auf der Zelloberfläche, da sie bedingt durch ihre Größe weniger Proteine auf der Nanokapseloberfläche adsorbieren. An der zellulären Aufnahme der Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln müssen verschiedene Aufnahmemechanismen beteiligt sein, da keine vollständige Blockade der Aufnahme durch additive Folsäure in Zellkulturmedien beobachtet wird.

Untersuchungen in konventionellem, Folsäure-haltigem DMEM (vgl. 4.4.4.1) zeigen ebenfalls eine gesteigerte zelluläre Aufnahme der Folsäure-gekoppelten Nanokapseln. Dieser Effekt muss in erster Linie auf die Funktionalisierung durch die Folsäure-Kopplung auf der Nanopartikeloberfläche zurückzuführen sein. Zusätzlich wäre es möglich, dass durch die

konjugierte Folsäure Wechselwirkungen mit den Proteinen des FCS stattfinden und die Nanokapseln eine veränderte Proteinkorona tragen bzw. weniger stark auf der Kapseloberfläche adsorbieren (vgl. PEG-Effekt). Dies kann zu einer veränderten bzw. stärkeren zellulären Aufnahme führen. Des Weiteren ist es auch möglich, dass durch die Proteinkorona eine Stabilisierung der Folsäure-gekoppelten Nanokapseln stattfindet (vgl. 2.1.3.3). Diese weisen dann eine geringere Tendenz zur Aggregation im Zellkulturmedium auf und werden infolgedessen leichter, im Vergleich zu großen Agglomeraten, aufgenommen.

Weitere Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung sind nötig, beispielsweise mit Zelllinien die Amylase produzieren und HES-Nanokapseln potentiell abbauen können, um eine Applikation für Folsäure-gekoppelte HES-Nanokapseln als Wirkstofftransportsysteme zu entwickeln.

4.5 Zellexperimente mit Poly(5,6-Benzo-2-methylen-1,3-dioxepan)-Nanopartikeln

In diesem Kapitel werden Zellaufnahmeexperimente mit abbaubaren Nanopartikeln in HeLa-Zellen beschrieben. Die bisher in dieser Arbeit verwendeten Polystyrol-Nanopartikel (Abschnitt 4.1, 4.2 und 4.3) zeigen sowohl eine gute Kompatibilität als auch eine zelluläre Aufnahme. Diese Aufnahme erfolgt in Abhängigkeit von Art und Anzahl der durch Copolymerisation eingeführten funktionellen Gruppen. Generell sind Polystyrol-Nanopartikel nicht abbaubar oder hydrolysierbar bzw. enthalten keine spaltbaren Bindungen. Die Freisetzung eines inkorporierten Wirkstoffes, insbesondere unter definierten bzw. kontrollierten Bedingungen, ist für ein therapeutisches System notwendig. (Co)Polyester stellen in Bezug auf eine mögliche Abbaubarkeit durch Hydrolyse eine interessante Substanzklasse dar (siehe 2.1.3.5 a.)). Normalerweise erfordert eine Synthese von Polyestern hohe Temperaturen, die von Nachteil bei der Verkapselung von temperaturempfindlichen biologischen Wirkstoffen (beispielsweise als Arzneistoffe, engl. *drug load*) sind. Außerdem muss die Synthese oft wasserfrei erfolgen, was wiederum für medizinische Anwendungen in wässrigen Systemen, wie beispielsweise der Blutbahn, ungünstig ist, da ein Redispergierungsschritt mit Tensiden erforderlich ist^[359].

Von Herrn Dr. Jörg Max Siebert wurden durch freie radikalische Polymerisation von 5,6-Benzo-2-methylen-1,3-dioxepan (BMDO) in direkter Miniemulsionstechnik abbaubare Nanopartikel synthetisiert.

BMDO, das erstmals von *Baily et al.* 1982 erwähnt wurde^[360], polymerisiert durch eine radikalische Ringöffnung zu einem Polymer mit Estergruppen in der Hauptkette. Es können konventionelle Radikalstarter wie Azobis(isobutyronitril) (AIBN) verwendet werden; dies führt aber allerdings nur zu geringen Molekulargewichten mit weniger als $10000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. In den Synthesen wurde BMDO rein bzw. mit Styrol oder MMA als Comonomer eingesetzt, um hydrolytisch spaltbare Estergruppen in Polymere aus verschiedenen Vinyl-Polymeren einzuführen^[361]. Das so erhaltene Copolymer (biokompatibel und abbaubar) konnte aufgrund dieser Eigenschaften für biologische Applikationen eingesetzt und getestet werden.

Zytotoxizitätstests zeigten keine negativen Auswirkungen von Homopolymeren und diversen Copolymeren mit BMDO^[362]. Von *Lutz et al.* wurde gezeigt, dass Terpolymere aus BMDO, 2-(2-Methoxyethoxy)ethylmethacrylat (MEO₂MA) und Oligo(ethylenglykol)methacrylat (OEGMA) nur eine sehr geringe Zytotoxizität gegenüber humanen Leberzellkarzinomzellen (HepG₂) aufweisen^[363], ebenso wie Copolymere aus BMDO und N-Isopropylacrylamid gegenüber C₂C₁₂-Zellen (murine Myeloblasten)^[364].

Herr Dr. Jörg Max Siebert synthetisierte die BMDO-Nanopartikel mit der Miniemulsions-technik unter Verwendung von Wasser als kontinuierlicher Phase; dies wiederum ermöglicht den Einsatz der durch dieses Verfahren erhaltenen Nanopartikel in biologischen Systemen erheblich. Neben dem Einsatz für medizinische Anwendungen sind auch mögliche materialwissenschaftliche Anwendungen für diese P(BMDO)-Nanopartikel denkbar, wie beispielsweise die gezielte Freisetzung von Kunstdüngern und Pestiziden.

Des Weiteren wurden von Herrn Dr. Jörg Max Siebert Nanopartikel aus Copolymeren von BMDO mit Methylmethacrylat (MMA) und Styrol (S) in unterschiedlichen molaren Verhältnissen unter Verwendung von verschiedenen Tensiden hergestellt. Für die beschriebenen Zellversuche wurden diverse P(BMDO)-Nanopartikel, die mit verschiedenen Tensiden hergestellt wurden und Nanopartikel aus BMDO, die mit Styrol copolymerisiert wurden (P(BMDO/S)), eingesetzt, um das zelluläre Aufnahmeverhalten dieser Nanopartikel in HeLa-Zellen sowie deren Auswirkung auf die Zellviabilität in Abhängigkeit der zur Synthese verwendeten Tenside und des Copolymers Styrol zu untersuchen.

Zur Analyse der Eignung der P(BMDO)-Nanopartikel als Wirkstofftransportsysteme wird Paclitaxel (Abb. 4.71), ein hydrophobes, schlecht wasserlösliches Zytostatikum, während der Nanopartikelsynthese eingebettet. Paclitaxel hemmt den Abbau der Mikrotubuli und unter-

bindet dadurch die Zellteilung (siehe 4.5.1). Durch eine nachfolgende Detektion der Wirkung wird ein Beweis der Freisetzung des verkapselten Paclitaxels bzw. der Degradation der Nanopartikel erbracht.

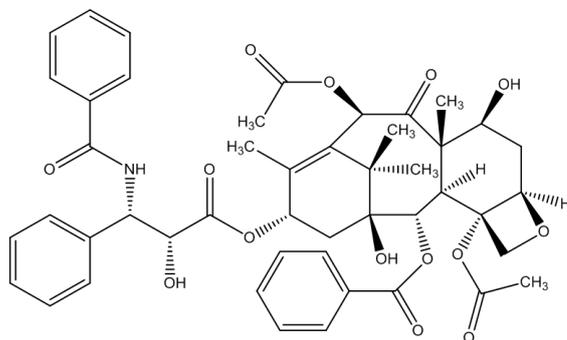


Abb. 4.71: Strukturformel von Paclitaxel.

Die mit Paclitaxel (Abb. 4.71) beladenen P(BMDO)-Nanopartikel (Pac-P(BMDO)-Nanopartikel) wurden mit den beiden kommerziell erhältlichen Paclitaxel-Formulierungen Paclitaxel Hospira (Pac-Hospira) (mizellare Lösung mit Macrogolglycerolricinoleat 35, Ethanol 49,7 Vol.-% und Zitronensäure) und Abraxane[®], der ersten marktreifen nanopartikulären Arzneistoffformulierung (globuläre Nanopartikel aus humanem Serumalbumin, die Paclitaxel eingelagert hat (siehe 4.5.1), eingesetzt.

4.5.1 Paclitaxel: Wirkmechanismus und pharmazeutische Formulierungen

Das pharmakologische Potential von vielen potentiellen Arzneistoffen wird limitiert von ihrer schlechten Wasserlöslichkeit. Paclitaxel wird in vielen Studien als Modellarzneistoff für diese Gruppe von problematisch zu applizierenden Wirkstoffen verwendet^[365-366]. Paclitaxel bindet an die β -Untereinheit von Tubulin^[367] und entfaltet dadurch seine Wirkung als mitotischer Spindelinhistor, der die Zusammenlagerung der Mikrotubuli aus Tubulidimeren fördert und die Mikrotubuli durch Hemmung ihrer Depolymerisation stabilisiert^[368]. Diese Stabilisierung führt zu einer Inhibierung einer normalen dynamischen Reorganisation des Mikrotubulsystems, welche wichtig ist, um eine vitale Interphase im Zellzyklus zu erreichen und somit die Fähigkeit der Zelle zur Mitose aufrechtzuerhalten. Zudem induziert Paclitaxel die Bildung einer abnormalen Bündelstruktur der Mikrotubuli während des Zellzyklusses und erzeugt multiple Aster in der Mitose. Paclitaxel ist bekannt für seine hochaktive Wirksamkeit gegen verschiedene solide Tumore^[369]. Paclitaxel wird als Mittel der ersten und zweiten Wahl (engl. *first- and second-line therapy*) zur Behandlung des Ovarialkarzinoms meist in Kombi-

nation mit Cisplatin angewandt sowie zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen, lymphknoten-positiven oder metastasierenden Mammakarzinoms in Kombination mit Anthracyclinen oder mit Trastuzumab, wenn die Tumore den humanen, epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor HER-2/neu überexprimieren. Des Weiteren wird zur Behandlung des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine Kombination mit Cisplatin angewandt und bei fortgeschrittenem AIDS-assoziiertem Karposi-Sarkom.

Paclitaxel gehört zur Substanzklasse IV im pharmazeutischen Klassifizierungssystem (engl. *biopharmaceutics classification system*, BCS), die auf oralem Applikationsweg eine geringe Löslichkeit und ein niedriges intestinales Permeationsvermögen besitzen. Somit ist eine Verabreichung von Paclitaxel in einer oralen Darreichungsform ausgeschlossen und infolgedessen wurden intravenöse Applikationsformen entwickelt.

Wegen seiner Hydrophobizität wird es vorwiegend als Lösungsmittel-basierte Formulierung aus Cremophor EL (CAS: 61791-12-6) und Ethanol zur intravenösen Applikation verwendet. Cremophor EL ist polyethoxyliertes Rizinusöl, das Emulsionen von nichtpolaren Substanzen in wässrigem Milieu stabilisiert. Cremophor EL umschließt Paclitaxel durch die Bildung von Mizellen im Plasma, was wiederum den Wirkstoff daran hindert, den Wirkort (Tumor) zu erreichen und zu erniedrigten Wirkstoffkonzentrationen im Tumor führt^[370-371]. Die Mizellenbildung kann auch die fehlende Wirkverstärkung erklären (engl. *dose response*) bei der Verabreichung von höheren Dosen, bei gleichzeitig ansteigenden toxikologischen Effekten^[370]. Solche Formulierungen haben ein hohes allergenes Potential aufgrund der enthaltenen Hilfsstoffe und können ernsthafte Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Neurotoxizität und Kardiotoxizität^[372] und Neutropenie^[373] verursachen. Auch speziell der hohe Anteil von Ethanol (49,7 Vol.-% in der Stammlösung) führen zu einer schlechten Verträglichkeit bei den Patienten. Vor der Applikation ist eine Prämedikation mit Antihistaminen oder Kortikosteroiden aus diesen Gründen erforderlich. Die Entwicklung von lösungsmittelfreien Arzneistoffformulierungen für Paclitaxel wie Liposomen^[374] und Emulsionen mit Vitamin E^[375] oder nanopartikulären Formulierungen^[376] wird deshalb vorangetrieben.

Eine weitere kommerziell erhältliche Arzneistoffformulierung zur intravenösen Applikation ist das nanopartikuläre Albumin-gebundene Paclitaxel (engl. *nanoparticle albumin-bound (nabTM) paclitaxel*)^[373], das unter der Bezeichnung ABI-007 für die Anwendung im Menschen getestet wurde. Es ist die erste zu therapeutischen Zwecken eingesetzte nanopartikuläre

Formulierung, die erfolgreich klinische Studien durchlaufen und 2008 die Marktreife in Europa erlangt hat. Diese pharmazeutische Formulierung ist frei von konventionellen Tensiden; weitere Bestandteile neben humanem Albumin vom Menschen sind: Natrium-caprylat und N-Acetyltryptophan^[269]. Die Größe dieser negativ geladenen Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA), hergestellt mit einem Emulsions-Lösungsmittelverdampfungs-Quervernetzungs-Verfahren (engl. *emulsion-evaporation cross-link method*), beträgt durchschnittlich 100-200 nm^[373]. Paclitaxel wird in den hydrophoben Taschen/Bindungsstellen von HSA gebunden^[377]. Diskutiert wird auch ein Albuminrezeptor (gp 60)-vermittelter transendothelialer Transport^[378]. Die Bindung auf diesen für Albumin spezifischen Oberflächenrezeptoren aktiviert Caveolin-1, was zu einer Aufnahme des Albumin-Rezeptor-Komplexes durch Caveolae in den Endothelzellen der Tumorgefäße führt. Es wird angenommen, dass diesem Mechanismus sogar eine größere Bedeutung zukommt als der erhöhten Permeabilität durch das im Tumorgewebe fenestrierte Endothel^[379] (vgl. EPR-Effekt 2.1.3.3). Im Vergleich zu den lösungsmittelbasierenden Formulierungen wurde von *Desai et al.* an humanen vaskulären Endothelzellen aus der Nabelschnur gezeigt, dass nab-Paclitaxel überlegen ist, in Bezug auf die Transzytoserate^[379]. Des Weiteren wird ein zusätzlicher positiver Effekt durch die Wechselwirkung von HSA und dem von vielen Tumoren verstärkt sekretierten Protein SPARC (engl. *secreted protein acidic and rich in cysteine*) angenommen. Die Anlagerung von SPARC an Albumin führt zu einer Freisetzung des Paclitaxels im Interstitium und damit zu einer Erhöhung der Konzentration von Paclitaxel an und in den Tumorzellen^[380]. Abraxane[®] nützt somit die natürlichen Eigenschaften von Albumin, um den Wirkstofftransport zu verbessern und die Anreicherung von Paclitaxel im Tumorgewebe im Vergleich zu den lösungsmittelbasierenden Formulierungen zu erhöhen. Abraxane[®] ermöglicht den Verzicht auf den Einsatz von Lösungsmitteln und Hilfsstoffen wie Cremophor EL und reduziert somit die Nebenwirkungen, die durch diese Substanzen hervorgerufen werden.

4.5.2 Durchführung der Zellexperimente

Die Zellexperimente wurden mit HeLa-Zellen durchgeführt. Für diese Versuchsreihen wurden diverse in Tabelle 4.5 aufgeführte, dialysierte P(BMDO)-Nanopartikel, die den Fluoreszenzfarbstoff PMI enthalten, verwendet^[381].

Tabelle 4.5: Polymerisierte und copolymerisierte P(BMDO)-Nanopartikel.

Nanopartikel	Tensid, Konz. (Gew.-%) in Bezug zur kontinuierlichen Phase	BMDO, Konz. (Gew.-%) in Bezug zur Monomerphase	BMDO, Konz. (Gew.-%) im erhaltenen Polymer	Styrol, Konz. (Gew.-%) in Bezug zur Monomerphase
<u>P(BMDO)-Nanopartikel: stabilisiert mit verschiedenen Tensiden</u>				
P(BMDO)-CTMA-Cl	CTMA-CL, 0,4	100	100	-
P(BMDO)-SDS	SDS, 0,3	100	100	-
P(BMDO)-Tween 20	Tween [®] 20, 1,6	100	100	-
P(BMDO)-Tween 40	Tween [®] 40, 1,6	100	100	-
P(BMDO)-Tween 80	Tween [®] 80, 1,6	100	100	-
<u>P(BMDO/S)-Tw80-Nanopartikel: Copolymerisation von BMDO mit verschiedenen Anteilen Styrol</u>				
P(BMDO/S)-0/100-Tw80	Tween [®] 80 1,6	0	-	100
P(BMDO/S)-50/50-Tw80	Tween [®] 80 1,6	50	39	50
P(BMDO/S)-90/10-Tw80	Tween [®] 80 1,6	90	78	10
P(BMDO/S)-100/0-Tw80	Tween [®] 80 1,6	100	100	0
<u>P(BMDO)-Nanopartikel für Experimentreihe mit inkorporiertem Paclitaxel (Pac-P(BMDO)-Nanopartikel)</u>				
Pac-P(BMDO)-Tw80	Tween [®] 80 1,6	100	100	-
P(BMDO)-Tw80	Tween [®] 80 1,6	100	100	-

Die Durchführung und Vorbereitung der Zellkulturexperimente erfolgte wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben. Zur Untersuchung der Zellviabilität wurde bei allen Proben eine 7-AAD-Färbung durchgeführt. Die Anregung und die Detektion erfolgt in für PMI üblichen Detektionskanälen in FACS (FL1) und CLSM. Nach bekannten Verfahren erfolgte die Präparation der Proben für das Transmissionselektronenmikroskop (TEM)^[209]. Die Probenpräparation und die TEM-Aufnahmen (Zeiss EM912, 120 kV) wurden von Herrn Dr. Martin Dass durchgeführt (siehe Abb. 4.78).

4.5.3 Zelluläre Aufnahme von P(BMDO)-Nanopartikeln

P(BMDO)-Nanopartikel wurden mit verschiedenen Tensiden synthetisiert und mit HeLa-Zellen inkubiert. Folgende Tenside wurden eingesetzt: das anionischen Tensid SDS, das kationischen Tensid CTMA-Cl und die nicht-ionischen Tenside Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween[®] 20), Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonopalmitat (Tween[®] 40) und Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat (Tween[®] 80).

Generell zeigen HeLa-Zellen eine gute zelluläre Aufnahme von P(BMDO)-Nanopartikeln, die mit allen eingesetzten Tensiden stabilisiert wurden. Die Nanopartikel werden in sphärischen Vesikeln bei den CLSM-Aufnahmen im gesamten Zytoplasol lokalisiert. In einigen Fällen zeigt der hydrophobe Fluoreszenzfarbstoff PMI eine diffuse Lokalisation im Zytoplasma (Abb. 4.72 und 4.77). Dies führt zur Annahme, dass die Degradation der Nanopartikel bereits begonnen hat und PMI, das aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften an den hydrophoben Fragmenten des BMDO-Polymers angelagert ist, im Zytoplasol verteilt vorliegt.

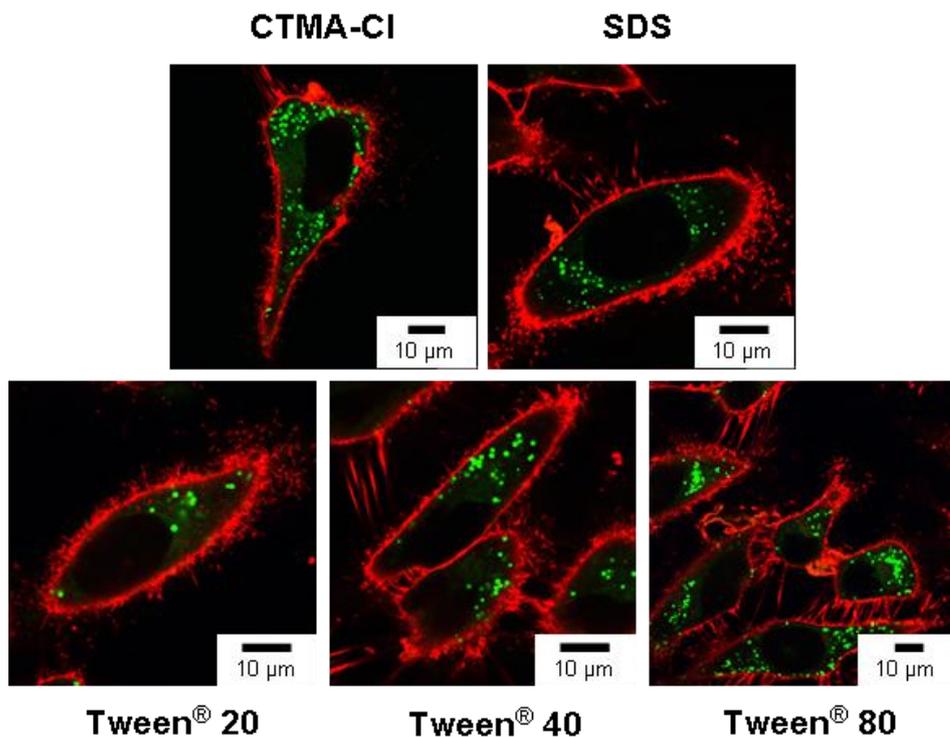


Abb. 4.72: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit P(BMDO)-Nanopartikeln, die unter Verwendung von unterschiedlichen Tensiden hergestellt wurden. Nanopartikel sind grün (PMI) und Zellmembranen rot (Cell Mask Orange) dargestellt.

Ein Anhaften der Nanopartikel an der Zellmembran, wie sie bei verschiedenen Nanopartikeln und -kapseln zu beobachten ist (vgl. Hyaluronsäure-Nanokapseln 4.4.1), ist bei Betrachtung der CLSM-Aufnahmen (Abb. 4.72) nicht zu erkennen (dies wäre als gelbe Überlagerung aus rot dargestellten Zellmembranen und grün abgebildeten Nanopartikeln zu erkennen). Die

Morphologie der HeLa-Zellen ist nicht verändert außer bei den Ansätzen, die mit CTMA-Cl stabilisierten P(BMDO)-Nanopartikeln inkubiert wurden.

Eine generell sehr gleichmäßige Aufnahme der Nanopartikel in alle Zellen bestätigen auch die Histogramme der FACS-Analysen (Abb. 4.76).

Die zelluläre Aufnahme von P(BMDO)-Nanopartikeln mit unterschiedlichen Tensiden wurde in HeLa-Zellen auf ihre Toxizität hin untersucht. CTMA-Cl stabilisierte Nanopartikel erwiesen sich als zytotoxisch nach einem Inkubationszeitraum von 24 h. Lichtmikroskopisch war ein Ablösen der Zellen bereits zu erkennen. 7-AAD-Färbungen ergaben nach 24 h, dass 8,5% der Zellen noch lebend/vital waren, die restlichen waren apoptotisch (91%) oder bereits tot (0,5%). Im Gegensatz dazu zeigen SDS-stabilisierte Nanopartikel keine Zytotoxizität; nach 24 h waren noch 98% der Zellen lebend. Jedoch zeigen die Nanopartikeldispersionen, bei denen SDS als Tensid eingesetzt wurde, nur eine geringe Stabilität bis hin zu wenigen Tagen. Als nicht-ionische Tenside wurde Tween[®] 20, 40 und 80 zur Synthese eingesetzt. Die mit Tween[®] 20, 40 und 80 stabilisierten Nanopartikel zeigten nicht nur eine sehr gute Stabilität der Dispersionen, sondern auch keinerlei zytotoxische Effekte, sogar nach 72 h waren mehr als 99% der HeLa-Zellen lebend. Mit Tween[®] 80 wurden die besten Ergebnisse erzielt (vgl. Abb. 4.73).

Daraus folgend und in Anbetracht der Tatsache, dass Tween[®] 80 im Europäischen Arzneibuch gelistet ist und die amerikanische „Food and Drug Administration“ (FDA) Tween[®] 80 für oralen und intravenösen Gebrauch zugelassen hat sowie für den Einsatz in Lebensmitteln, eignet sich Tween[®] 80 für den Einsatz in der Synthese von P(BMDO)-Nanopartikeln, die als Wirkstofftransportsysteme dienen sollen. Außerdem wird für Tween[®] 80 bzw. für Tween[®] 80 bedeckt Nanopartikel eine gewisse Bluthirnschrankgängigkeit diskutiert^[133, 359, 382]. Für alle weiteren Versuche, unter anderem für die Synthese der P(BMDO/S)-Tw80-Nanopartikel, des Paclitaxel-beladenen Pac-P(BMDO)-Tw80-Nanopartikels sowie dessen unbeladenen Referenznanopartikels wurde ausschließlich Tween[®] 80 als Tensid verwendet.

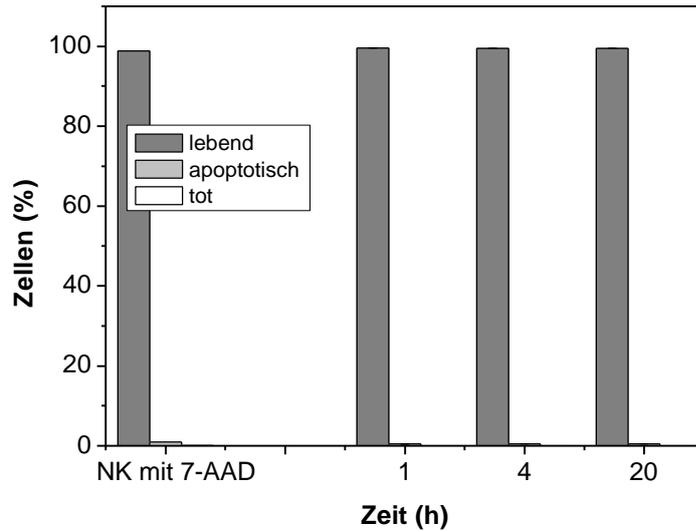


Abb. 4.73: 7-AAD-Färbung von HeLa-Zellen nach 1-, 4 und 20-stündiger Inkubation mit P(BMDO)-Tween 80-Nanopartikeln. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der lebenden (dunkelgrau), der apoptotischen (hellgrau) und der toten Zellen (weiß). Standardabweichungen sind zu gering um darstellbar zu sein. Negativ-Kontrolle (NK mit 7AAD) gezeigt nach 20 h.

Im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle (Abb. 4.73) zeigen sich nach 1-, 4- und 20-stündiger Inkubation keine Unterschied bezüglich des Anteils der lebenden Zellen (%). Die P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel zeigen keine negativen Einflüsse auf die Zellviabilität und ein gutes zelluläres Aufnahmeverhalten in HeLa-Zellen während den Inkubationsperioden von 1, 4 und 20 h (Abb. 4.74).

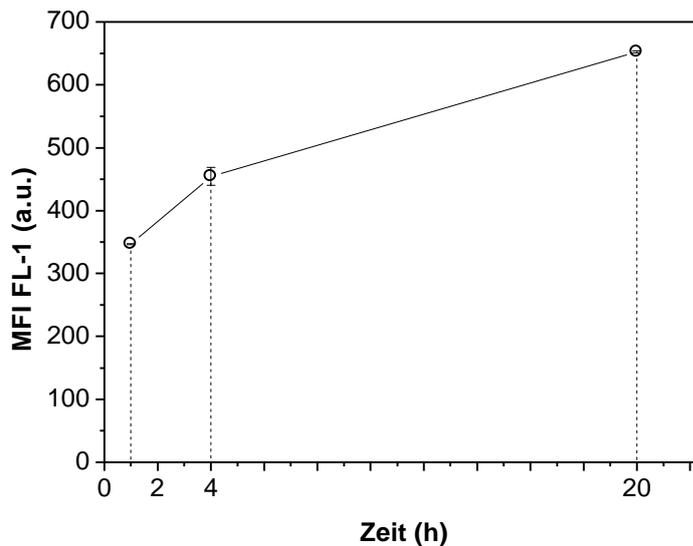


Abb. 4.74: Zelluläre Aufnahme (Durchflusszytometrie) nach 1, 4 und 20 h von P(BMDO)-Tween 80-Nanopartikeln in HeLa-Zellen. Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) ist nicht normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachansätzen sind gezeigt.

Die P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel werden vorwiegend innerhalb der ersten Stunde aufgenommen (Abb. 4.74); der Aufnahmeprozess ist aber über den gesamten Zeitraum von 20 h noch nicht abgeschlossen. Die CLSM-Aufnahmen (Abb. 4.75) belegen eine gleichmäßige intrazelluläre Aufnahme und schließen Anlagerungen der P(BMDO)-Nanopartikel an den Zellmembranen aus.

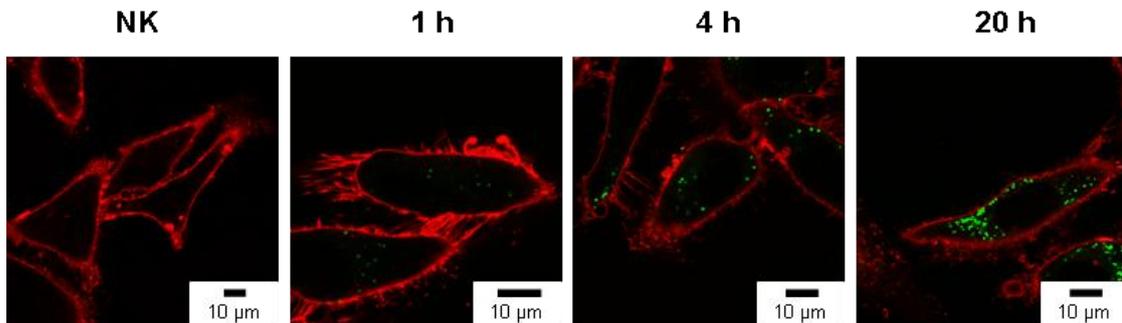


Abb. 4.75: Intrazelluläre Aufnahme von P(BMDO)-Tween 80-Nanopartikel in HeLa-Zellen, nach 1, 4 und 20 h. Die Nanopartikel sind in grün dargestellt (PMI), die Zellmembran in rot (Cell Mask Orange).

Die Darstellungen der Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen in Abb. 4.76 zeigen deutlich eine gleichmäßige zelluläre Aufnahme der P(BMDO)-Nanopartikel nach 1, 4 und 20 h durch eine symmetrische Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten. Arithmetisches Mittel und Median zeigen entsprechende Werte der Fluoreszenzintensitäten.

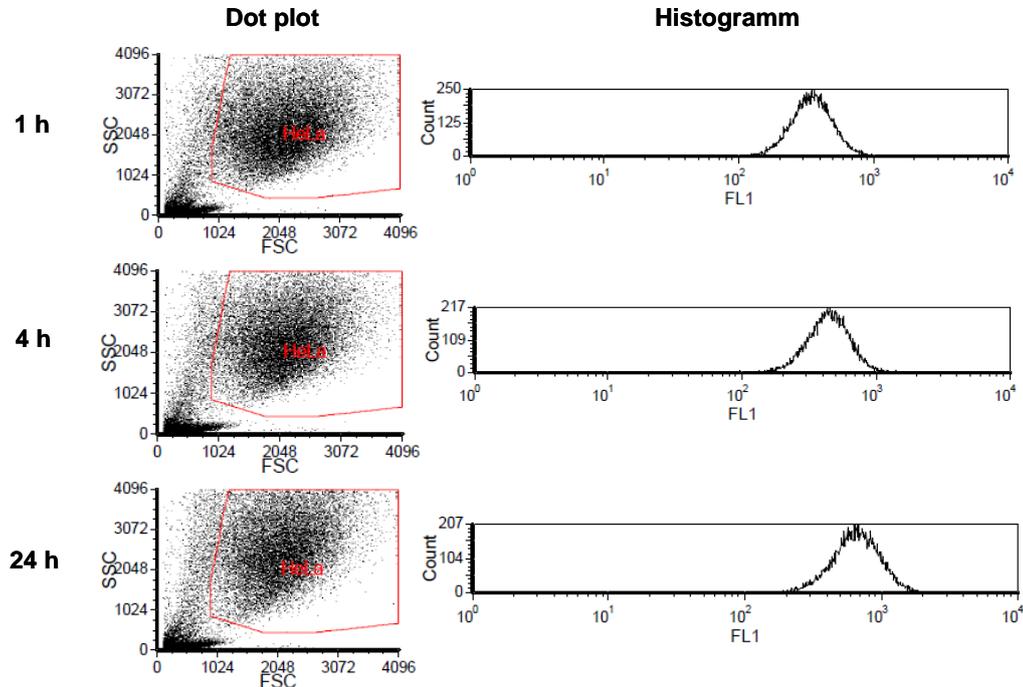


Abb. 4.76: Darstellung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen nach Inkubation von P(BMDO)-Tween 80-Nanopartikel in HeLa-Zellen nach 1, 4 und 20 h in HeLa-Zellen. Linke Spalte: „Dot Plot“-Diagramme (Punktauftragung der Ereignisse in FSC/SSC-Darstellung). Rechte Spalte: Histogramme (Auftragung der Anzahl der Ereignisse über der Fluoreszenzintensität im FL-1-Detektionskanal).

Mit zunehmender Dauer der Inkubationszeit mit den diversen P(BMDO)-Nanopartikeln in HeLa-Zellen verstärkt sich die diffuse Fluoreszenz des PMI im Zytoplasma. Dieser Effekt kann bei allen Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Tensiden hergestellt werden, in unterschiedlich starker Ausprägung beobachtet werden. Insbesondere die SDS-stabilisierten, aber auch beispielsweise die mit CTMA-Cl-stabilisierten Nanopartikel, zeigen in Abb. 4.72 nach zellulärer Aufnahme (24-stündige Inkubation) eine diffuse Fluoreszenz im Zytoplasma. Dies deutet auf einen möglichen Abbau der Nanopartikel durch Hydrolyse des Polymers hin. Untersuchungen von Herrn Dr. Jörg Max Siebert zum Abbauverhalten von P(BMDO/S)-Nanopartikeln weisen darauf hin^[381]. Dies ist sehr wahrscheinlich, da die Stabilität der Nanopartikeldispersionen je nach verwendetem Tensid nur wenige Tage bis Wochen beträgt. Die mit SDS-stabilisierten Nanopartikel zeigen die geringste Stabilität. Ob der offensichtliche Abbau, der in den Zellen zu erkennen ist, darauf begründet ist oder noch weitere „zelleigene“, möglicherweise enzymatische Abbauprozesse vorliegen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen werden in Abb. 4.77 nach einer Inkubationsdauer von 5 und 72 h mit den P(BMDO)-SDS-Nanopartikeln gezeigt.

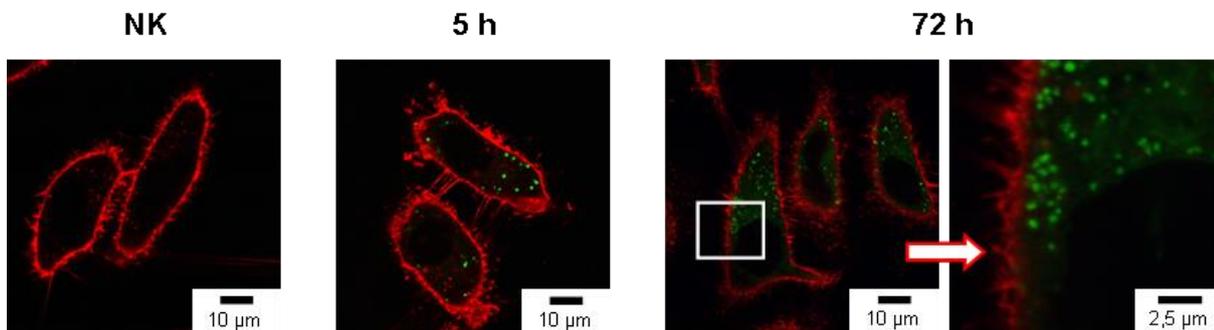


Abb. 4.77: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Nanopartikelinkubation mit P(BMDO)-SDS. HeLa-Zellen sind ohne Nanopartikel nach 72 h (links, Negativ-Kontrolle (NK)), mit Nanopartikeln nach 5 h (mittig) und nach 72 h (rechts) abgebildet. Von der Abbildung nach 72 h ist der weißumrandete Abschnitt rechts mit einer vergrößerten Aufnahme gezeigt. Zellmembranen sind rot (Cell Mask Orange), Nanopartikel grün (PMI) dargestellt.

Die diffuse Fluoreszenz, die nach längeren Inkubationsperioden auftritt (Abb. 4.77 nach 72 h und Vergrößerung), gibt einen starken Hinweis darauf, dass P(BMDO)-Nanopartikel im Zellinneren abgebaut werden.

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen und der CLSM-Aufnahmen wurden mit dem P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel Aufnahmen mit dem TEM durchgeführt, um Informationen über die intrazelluläre Lokalisation der P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel zu erhalten. Wie in Abb. 4.78 (TEM-Aufnahmen) gezeigt wird, können die Nanopartikel nach 20-stündiger Inkubation in den Zellen einzeln oder in der Gruppe von

einigen wenigen Nanopartikeln im Zellinneren detektiert werden. Die Nanopartikel sind noch nicht sichtbar abgebaut und gelangen in das Zellinnere, wie es auch für Polyisopren-Nanopartikel^[209] beobachtet wurde und werden in Endosomen aufgenommen. Die Morphologie und die Größe der Nanopartikel sind konsistent mit den Resultaten, die bei den rasterelektronenmikroskopischen-Aufnahmen von Herrn Dr. Jörg Max Siebert erhalten worden sind.

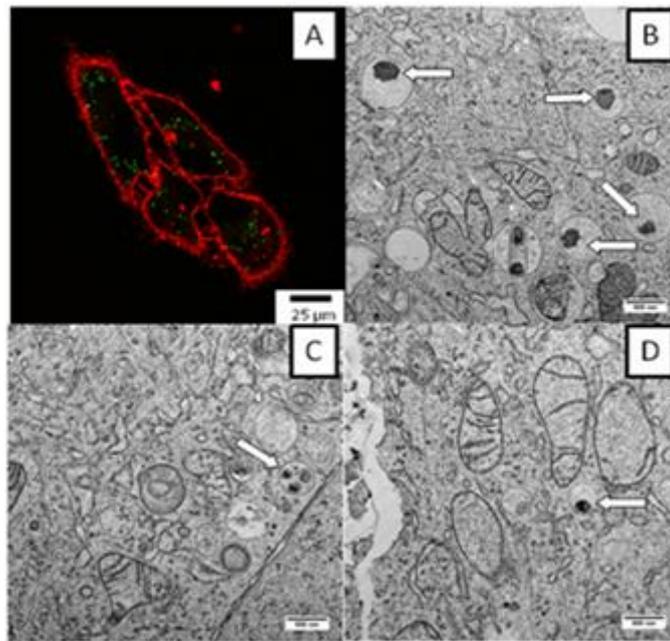


Abb. 4.78: HeLa-Zellen nach intrazellulärer Aufnahme von P(BMDO)-Tween 80 nach 20 h. CLSM-Aufnahme (A) mit Nanopartikeln in grün (PMI). TEM-Aufnahmen (B,C,D) zeigen Nanopartikel einzeln oder zu mehreren in Vesikeln im Zytoplasma (weiße Pfeile); Größenbalken entsprechen 500 nm.

Das Vorhandensein von mehr als einem Nanopartikel in einem Endosom (Abb. 4.78) kann entweder verursacht werden durch eine Clusterung der Nanopartikel auf der Zellmembran und einer anschließenden gemeinsamen Zellaufnahme oder durch eine einzelne zelluläre Aufnahme der Nanopartikel und anschließender intrazellulärer Fusionierung der Nanopartikel in den Endosomen. Dies kann durch die erhaltenen Ergebnisse nicht einwandfrei geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen, wie beispielsweise durch „Sub-diffraction Fluorescence“ Live-Cell-Imaging-Verfahren wie der „Stimulated-Emission-Depletion“-Mikroskopie (STED)^[383].

4.5.4 Zelluläre Aufnahme der P(BMDO-*co*-Styrol)-Nanopartikel

In der folgenden Experimentreihe wird der Effekt einer Copolymerisation von BMDO mit unterschiedlichen prozentualen Anteilen an Styrol auf die Nanopartikelsynthese und deren zelluläre Aufnahme untersucht (vgl. Tabelle 4.5). P(BMDO/S)-0/100-Tw80 ist ein reiner Polystyrol-Nanopartikel und P(BMDO/S)-100/0-Tw80 ein reiner P(BMDO)-Nanopartikel. Der Nanopartikel P(BMDO/S)-50/50-Tw80 besteht aus 39 Gew.-% BMDO und P(BMDO/S)-90/10 aus 78 Gew.-% BMDO, wie durch $^1\text{H-NMR}$ -Analysen von Herrn Dr. Jörg Max Siebert bestimmt wurde^[381]. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen werden in Abb. 4.79 nach einer Inkubationszeit von 20 h gezeigt. Die Fluoreszenz der Nanopartikel wurde in einem Mikroplatten-Leser (engl. *microplate reader*) analysiert und entsprechend dem ermittelten Gehalt an Fluoreszenzfarbstoff (PMI) normiert.

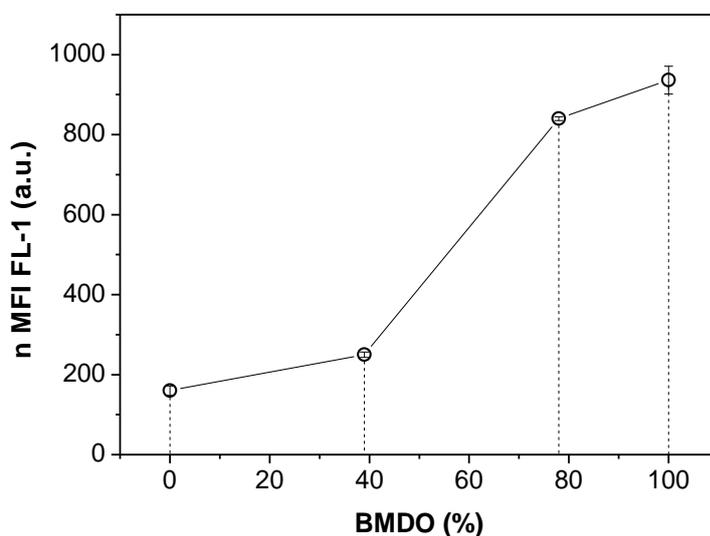


Abb. 4.79: Zelluläre Aufnahme (Durchflusszytometrie) von P(BMDO/S)-0/100-Tw80 (0 Gew.-% BMDO im erhaltenen Polymer), P(BMDO/S)-50/50-Tw80 (39 Gew.-% BMDO im erhaltenen Polymer), P(BMDO/S)-90/10-Tw80 (78 Gew.-% BMDO im erhaltenen Polymer) und P(BMDO/S)-100/0-Tw80 Nanopartikeln (100 Gew.-% BMDO im erhaltenen Polymer) über 20 h von P(BMDO)-Tween 80-Nanopartikeln in HeLa-Zellen. Der normierte Median (Nanopartikel·mL⁻¹) der Fluoreszenzintensität (n MFI) ist gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachansätzen sind gezeigt.

Nach einer Inkubationszeit von 20 h wird die Viabilität der HeLa-Zellen nicht beeinflusst, wie mit einer 7-AAD-Färbung nachgewiesen werden konnte. Eine drastische Zunahme der zellulären Aufnahme wird mit zunehmendem BMDO-Gehalt der Nanopartikel detektiert (Abb. 4.79). Möglicherweise ist dies auf die zunehmende Hydrophilie der Nanopartikel, bedingt durch die Polymerisation mit einem zunehmenden Anteil von BMDO (hydrophile Ester-Einheiten), zurückzuführen. Des Weiteren werden die Nanopartikel entsprechend ihres niedrigeren T_g -Wertes (Glasübergangstemperatur) und des niedrigeren Molekulargewichtes

ihres Copolymers besser intrazellulär aufgenommen (Abb. 4.79 und Tabelle 3.6). Von Lorenz et al. konnte in vorausgehenden Experimenten nachgewiesen werden, dass Nanopartikel aus Polymeren mit einem niedrigen T_g -Wert („weichere“ Nanopartikel) stärker von Zellen aufgenommen werden im Vergleich zu Nanopartikeln aus Polymeren mit einem höheren T_g („harte“ Nanopartikel)^[91].

Wie in Abb. 4.80 gesehen werden kann, führt die zelluläre Aufnahme zu keinen morphologischen Veränderungen der HeLa-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Negativ-Kontrolle, NK).

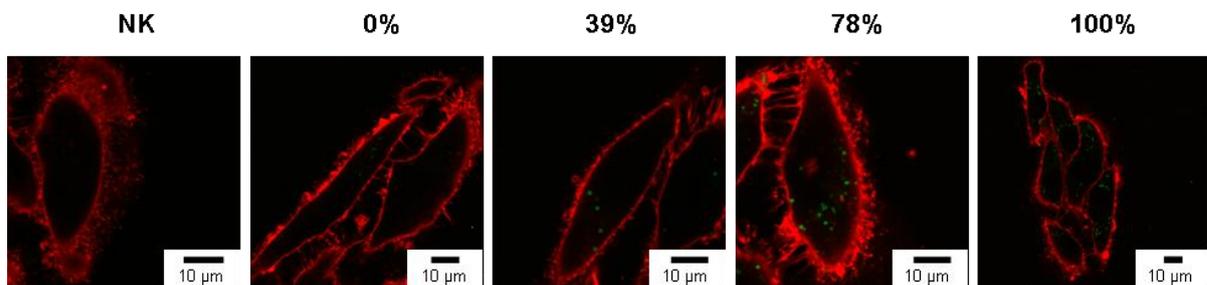


Abb. 4.80: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit den Nanopartikeln der P(BMDO/S)-Tw80 Reihe nach 20 h. Angabe der BMDO-Konzentration im erhaltenen Polymer in Gew.-%, links Abbildung der Negativ-Kontrolle (NK). Zellmembranen sind rot (Cell Mask Orange), Nanopartikel grün (PMI) dargestellt.

Alle Nanopartikel liegen verteilt in der Zelle vor, es gibt keine bedeutenden Anlagerungen an der Zellmembran oder an anderen Stellen in den HeLa-Zellen (Abb. 4.80). Der Zellkern ist nicht spezifisch angefärbt, wird aber von den Nanopartikeln umrandet, da diese nicht in den Zellkern gelangen. Zu sehen ist dies an der deutlichen Grenze von grüner Fluoreszenz der Nanopartikel zu schwarzer Fläche ohne Fluoreszenz (Zellkern).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein zunehmender Anteil an BMDO im Mengenverhältnis zu Styrol bzw. ein niedriger T_g -Wert des Copolymers zu einer schnelleren und stärkeren zellulären Aufnahme führt; der reine P(BMDO)-Nanopartikel zeigt die beste Aufnahme. Keiner der Nanopartikel zeigt eine Zytotoxizität.

4.5.5 Freisetzung von Paclitaxel aus P(BMDO)-Nanopartikeln

Für die Verwendung von Nanopartikeln als Wirkstofftransportsysteme müssen diese die Eigenschaft besitzen, den Wirkstoff gezielt und quantitativ freizusetzen. Wie beispielsweise in den CLSM-Aufnahmen in Abb. 4.72 und 4.77 gezeigt, ist bei P(BMDO) Nanopartikel mit zunehmender Inkubationsdauer in HeLa-Zellen eine diffuse Fluoreszenz im Zytoplasma zu beobachten, die auf einen Abbau des Polymers schließen lässt.

In diesem Abschnitt wurde die Eignung von P(BMDO)-Nanopartikeln als Wirkstofftransportsysteme überprüft. Dazu wurde das bereits oben beschriebene Zytostatikum Paclitaxel während der Nanopartikelsynthese dem Ansatz zugegeben. Wegen seiner Hydrophobizität wird Paclitaxel in die Matrix von P(BMDO) inkorporiert (Pac-P(BMDO)-Tw80). Die Nanopartikel wurden nach der Polymerisation dialysiert, um neben überschüssigem Tensid auch adsorbiertes Paclitaxel zu entfernen.

Das Ziel dieser Versuchsreihe war es durch die Inkorporation von Paclitaxel in die Pac-P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel die intrazelluläre Degradation der Nanopartikel nachzuweisen. Durch die Freisetzung von Paclitaxel und der Detektion der zytostatischen Wirkung, d.h. der Inhibition der Zellen in der Mitose und letztlich der Einleitung des programmierten Zelltodes, kann der Beweis der Degradation der Nanopartikel erbracht werden. Als Vergleich diente ein mit demselben Tensid synthetisierter P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel ohne inkorporiertes Paclitaxel. Zum Vergleich der zytostatischen Wirkung von Paclitaxel wurden als Positivkontrollen die kommerziellen Paclitaxelpräparate Paclitaxel Hospira (Pac-Hospira) und Abraxane® in äquivalenten Konzentrationen von 0,5 µM bezogen auf den Paclitaxelgehalt eingesetzt.

Die Zellkulturexperimente wurden für die Versuche mit Pac-P(BMDO)-Tw80 und der hierzu verwendeten Referenznanopartikel (P(BMDO)-Tw80)) abweichend vom Standard-Protokoll durchgeführt, weil für diese Versuchsreihe längere Partikelinkubationszeiten von 2, 4, 24, 48 und 72 h zum Nachweis der Wirksamkeit von Paclitaxel ausgewählt wurden. Die Zellzahl der HeLa-Zellen musste deswegen gegenüber der Standardanzahl von 200000 Zellen pro 6-Well (entspricht 50000 Zellen·cm⁻²) auf 12500 Zellen·cm⁻² reduziert werden. Diese Reduktion ist problemlos möglich und diese Aussaatdichte erlaubt es den Zellen noch ausreichend zu wachsen, damit nicht der Zelltod aufgrund einer Überpopulation der Zellen bei fortschreitender Experimentdauer eintritt. Dies wurde von Frau Dr. Julia Dausend getestet und durch Viabilitätsanalysen zu den entsprechenden Zeitpunkten mit einer 7-AAD-Färbung nachgewiesen^[384]. In Anlehnung an diese Zellkonzentrationen wurde die Zellaussaat für die CLSM-Experimente (10000 Zellen·cm⁻²) und den MTS-Test (5000 Zellen pro 96-Well) reduziert.

In Zellkultur entfaltet Paclitaxel seine zytostatische Wirkung bei niedrigen Konzentrationen und induziert im weiteren Verlauf den Apoptoseprozess^[376]. Bei Konzentrationen über 5 μM hat Paclitaxel einen direkten zytotoxischen Effekt (Zellnekrose) auf die kultivierten Zellen^[376, 385]. Pac-P(BMDO)-Tw80, das Paclitaxel in theoretischen Konzentrationen von 2 Gew.-% Paclitaxel in Bezug auf das Monomer enthält, und die Arzneistoffformulierungen Pac-Hospira und Abraxane[®] wurden in Konzentrationen von 0,5 μM Paclitaxel zu den kultivierten HeLa-Zellen gegeben^[365]. Inkubationszeiten von 2, 4, 24, 48 und 72 h wurden ausgewählt, um den zytostatischen Effekt mit der nachfolgenden Apoptoseprozess zu detektieren. Durchflusszytometrische Untersuchungen mit 7-AAD-Färbungen (Abb. 4.81 und 4.82) und CLSM-Aufnahmen (Abb. 4.85) wurden in bewährter Weise (siehe 3.1.4 und 3.1.5) durchgeführt. Zusätzlich wurde die Zellviabilität im Hinblick auf die metabolische Aktivität der HeLa-Zellen mit einem MTS-Assay überprüft (Abb. 4.84). Mit Trypanblau angefärbte HeLa-Zellen (Vitalfärbung, Zellen mit intakter Zellmembran werden nicht angefärbt; eine Unterscheidung von apoptotischen und toten Zellen ist nicht möglich) wurden mit einer *Neubauer*-Kammer gezählt, um die Anzahl an verbleibenden vitalen Zellen nach jeder entsprechenden Inkubationsperiode zu zählen (Abb. 4.83).

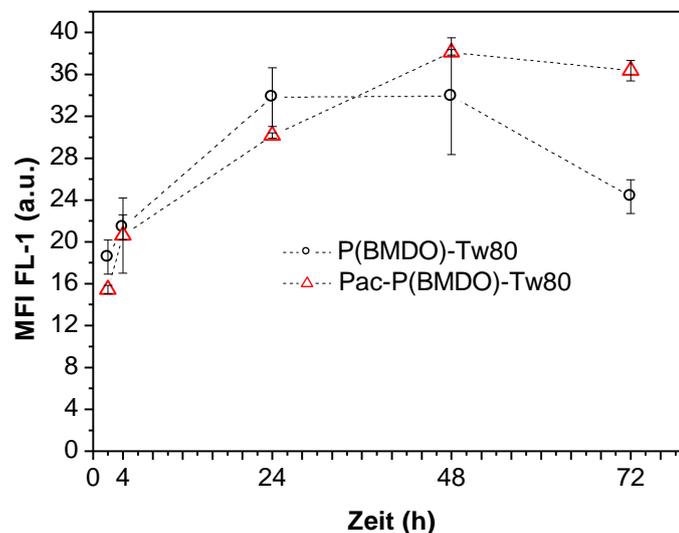


Abb. 4.81: Zelluläre Aufnahme (Durchflusszytometrie) von P(BMDO)-Tw80 und Pac-P(BMDO)-Tw80 nach 2, 4, 24, 48 und 72 h in HeLa-Zellen (Konzentrationen der paclitaxelhaltigen Proben: 0,5 μM bezogen auf Paclitaxel). Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI), Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachansätzen sind gezeigt.

Ein Absinken der Fluoreszenzintensitäten (Abb. 4.81) des P(BMDO)-Tw80-Nanopartikels nach 72 h bzw. ein Stagnieren nach 48 h (im Vergleich zu 24 h) ist bedingt durch die fortschreitende Zellteilung mit der eine Aufteilung der Nanopartikel einhergeht und die Fluoreszenz in den beiden resultierenden HeLa-Zellen reduziert wird.

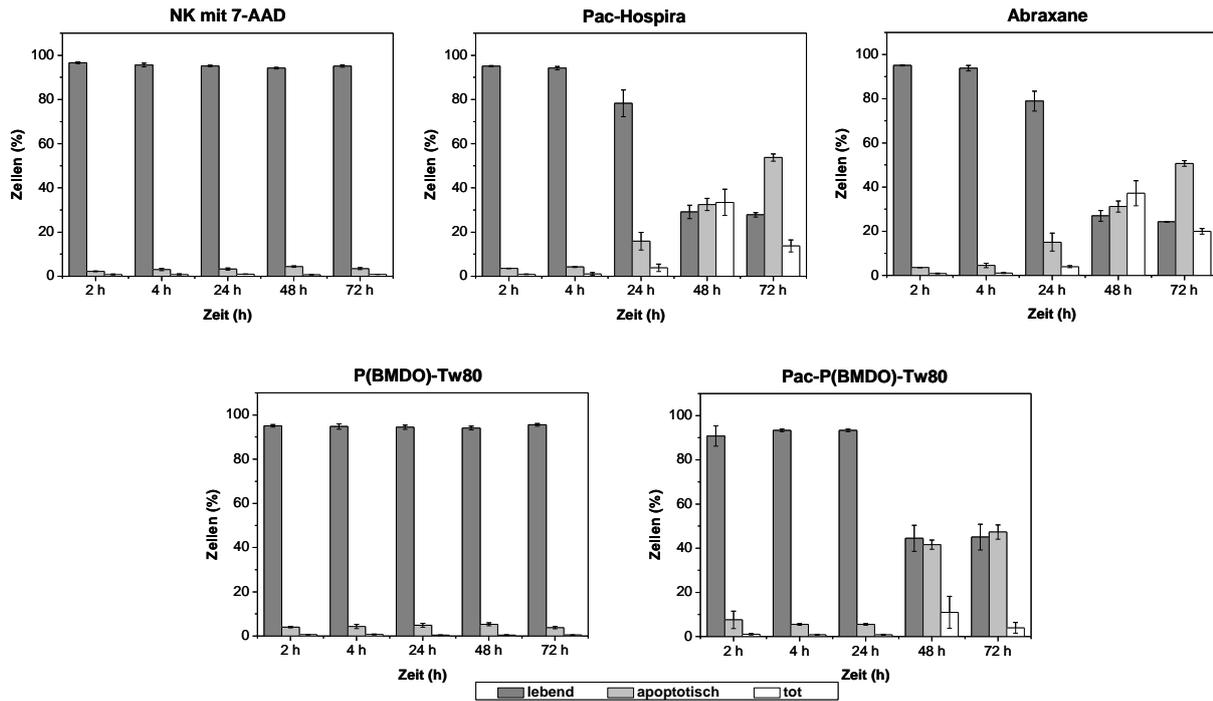


Abb. 4.82: Gezeigt werden Diagramme mit den Ergebnissen der 7-AAD-Färbungen aus durchflusszytometrischen Messungen der verschiedenen Versuchsansätze in HeLa-Zellen nach 2, 4, 24, 48 und 72 h: Negativ-Kontrolle (NK mit 7-AAD), sowie die Ansätze mit Pac-Hospira, Abraxane®, P(BMDO)-Tw80 und Pac-P(BMDO)-Tw80 (Konzentrationen der paclitaxelhaltigen Proben: 0,5 µM bezogen auf Paclitaxel). Der prozentuale Anteil der lebenden (dunkelgrau), apoptotischen (hellgrau) und toten Zellen (weiß) ist mit den Standardabweichungen aus den Dreifachansätzen angegeben.

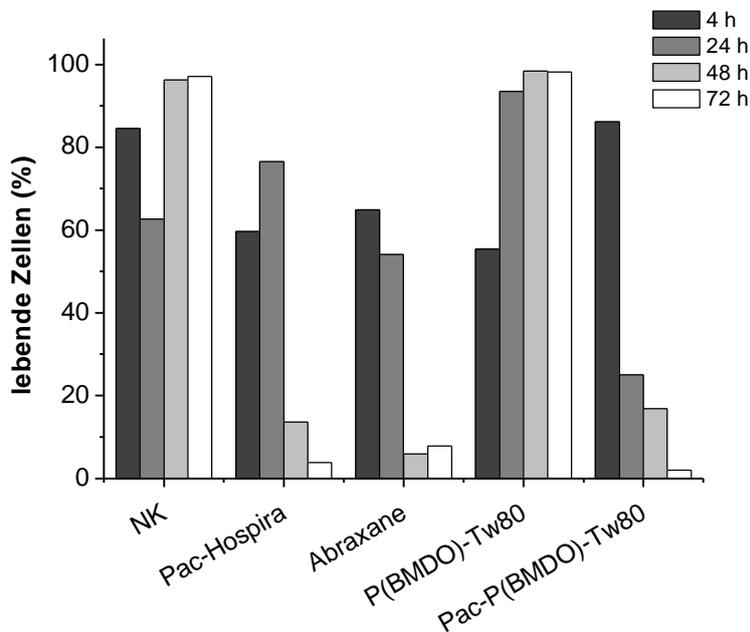


Abb. 4.83: Prozentualer Anteil der lebenden Zellen ermittelt durch Färbungen mit Trypanblau und anschließender lichtmikroskopischer Auszählung der HeLa-Zellen mit der Neubauer-Kammer nach 4, 24, 48 und 72 h (Konzentrationen der paclitaxelhaltigen Proben: 0,5 µM bezogen auf Paclitaxel). Dargestellt ist der Mittelwert aus Dreifachansätzen von der unbehandelten Negativ-Kontrolle (NK), sowie von Ansätzen mit Pac-Hospira, Abraxane®, P(BMDO)-Tw80 und Pac-P(BMDO)-Tw80.

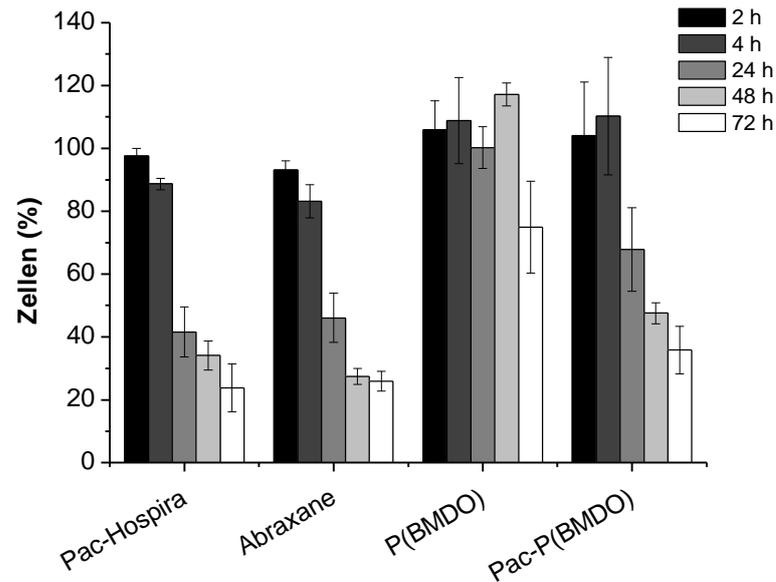


Abb. 4.84: Resultate des MTS-Assays (Absorptionsmessung durchgeführt mit Plate-Reader) nach Inkubation der HeLa-Zellen mit Pac-Hospira, Abraxane®, P(BMDO) und Pac-P(BMDO) nach 2, 4, 24, 48 und 72 h (Konzentrationen der paclitaxelhaltigen Proben: 0,5 µM bezogen auf Paclitaxel). Dargestellt ist die prozentuale Abweichung der entsprechenden Probe im Verhältnis zur Negativ-Kontrolle (entspricht 100%).

Die Resultate, die mit allen durchgeführten analytischen Methoden erhalten wurden, zeigen einen pharmakologischen Effekt der wirkstoffbeladenen Pac-P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel sowie der verwendeten kommerziell erhältlichen Arzneistoffformulierung (Pac-Hospira und Abraxane®), die als Positiv-Kontrollen eingesetzt wurden. Die toxikologischen Effekte der Pac-P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel zeigen nach 24, 48 und 72 h einen leicht geringeren wirkstoffbedingten Effekt und die Anzahl an lebenden Zellen ist nach den jeweiligen Inkubationsperioden etwas höher, als bei den HeLa-Zellen die mit den Positiv-Kontrollen inkubiert wurden (vgl. Abb. 4.82 und 4.83). Das kann dadurch erklärt werden, dass die Freisetzung von Paclitaxel aus den Pac-PBMDO-Tw80-Nanopartikeln langsamer stattfindet, als die Freisetzung aus den kommerziellen Formulierungen, weil bei den Pac-PBMDO-Tw80-Nanopartikeln der Abbau erst stattfinden muss. Ein zytotoxischer Effekt von dem in Pac-Hospira enthaltenen Ethanol ist definitiv auszuschließen, da die Konzentration (berechnet auf das Endvolumen des Zellkulturmediums) nur $3,375 \cdot 10^{-4}$ Gew.-% Ethanol beträgt.

Die Resultate des MTS-Assays (Abb. 4.84) sind konsistent mit den anderen Analysemethoden. Die Paclitaxel-haltigen Wirkstoffformulierungen Pac-Hospira und Abraxane®, sowie Pac-P(BMDO)-Tw80, zeigen einen fragmentierten Zellkern nach 24 und 48 h, wie in Abb. 4.85 gesehen werden kann. Diese Beobachtungen wurden auch von Zahr et al. nach 24 bzw. 48 h mit Paclitaxel-beladenen Nanoschalen beschrieben^[376]. Durch die Hemmung des Abbaus der Mikrotubuli wird infolgedessen die Zellteilung behindert.

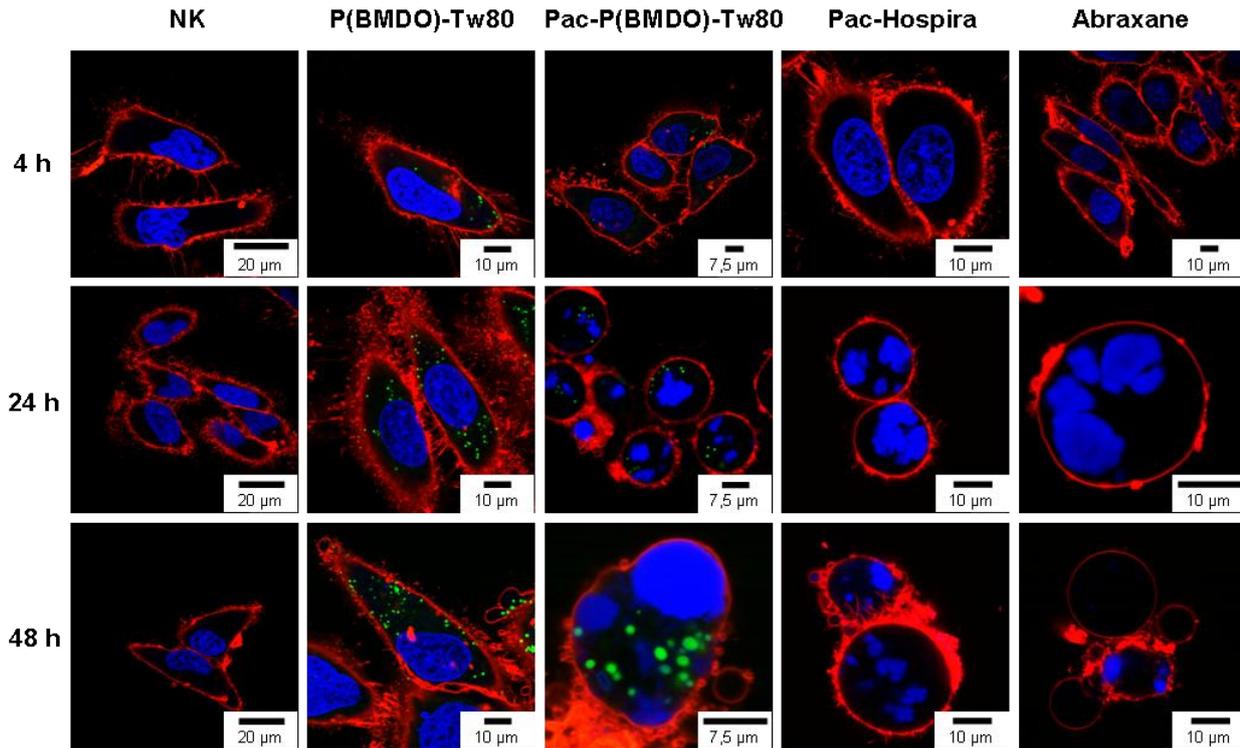


Abb. 4.85: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 4, 24 und 48 h: Negativ-Kontrollen (NK), sowie Ansätze nach Inkubation mit P(BMDO)-Tw80, Pac-P(BMDO)-Tw80, Pac-Hospira und Abraxane® (Konzentrationen der paclitaxelhaltigen Proben: 0,5 μ M bezogen auf Paclitaxel). Zellmembranen sind rot (Cell Mask Orange), Nanopartikel grün (PMI) und die Zellkernfärbung blau (DraQ5)dargestellt.

Die HeLa-Zellen werden im Ablauf ihrer mitotischen Zellteilung unterbrochen, verharren in der G2/M-Phase und die Interphase, bei der das Chromatin entspiralisiert vorliegt (flächige Färbung des Zellkerns wie bei Negativ-Kontrollen), kann nicht erreicht werden. Ein Verharren der Zellen in der G2/M-Phase wird durch defekte Strukturen im Zytoskelett der Mikrotubuli und des Aktins ausgelöst. Als Konsequenz wird die Apoptose induziert und die Anzahl an toten Zellen wächst an. Die Negativ-Kontrollen (NK) und die Zellen, die mit P(BMDO)-Tw80 Nanopartikeln ohne Paclitaxel inkubiert wurden (Abb. 4.85), zeigen dieses Stadium nicht, sondern sind nach allen Inkubationszeiten vital. Dasselbe trifft auch für 72 h zu, (Ergebnisse werden nicht gezeigt).

Es konnte gezeigt werden, dass mit Paclitaxel beladene Pac-P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel verwendet werden können, um zelluläre Barrieren zu überwinden und Paclitaxel im Zytoplasma freizusetzen. Pac-P(BMDO)-Tw80-Nanopartikel besitzen das Potential Tumorzellen zu adressieren und Nebenwirkungen zu reduzieren.

5. Anhang

5.1 Abkürzungen

AIDS	erworbene Immunschwäche-Syndrom (engl. <i>Aquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
Abb.	Abbildung
AT	Antithrombin
a.u.	willkürliche Einheiten (engl. <i>arbitrary units</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
CD	immunphänotypisches Oberflächenmerkmal (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
CLP	lymphoide Progenitorzelle
CLSM	konfokales Laser-Raster-Mikroskop
CMP	myeloische Progenitorzelle
DC	dendritische Zelle
DLS	dynamische Lichtstreuung (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Em.	Emission
Ex.	Exzitation, Anregung
EPR	Effekt der erhöhten Permeabilität und Retention (engl. <i>enhanced permeability and retention effect</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescenc- activated cell sorting</i>)
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FDA	Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FL	Fluoreszenzkanal
FR	Folsäure-Rezeptor
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FSG	Feststoffgehalt
Gew.	Gewicht
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
HES	Hydroxyethylstärke
HS	Hyaluronsäure
HSA	humanes Serumalbumin
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HLB	engl. <i>hydrophilic-lipophilic balance</i>
HI-Virus	humanes Immundefizienz-Virus
Ig	Immunglobulin
I _p	isoelektrischer Punkt
IR	Infrarotstrahlung
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Median der Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
NET	extrazelluläre Einschlüsse bei Neutrophilen (engl. <i>neutrophil extracellular traps</i>)

PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCD	Partikelladungsdetektion
PCFT	Folat-Transporter: engl. <i>proton-coupled folate transporter</i>
PEG	Polyethylenglykol
PMI	N-(2,6-diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarbonacidimid
PRR	Muster-Erkennungsrezeptoren (engl. <i>pattern recognition receptors</i>)
PS	Polystyrol
RES	retikuloendotheliales System
RFC	Folat-Transporter, engl. <i>reduced-folate carrier</i>
RNA	Ribonukleisäure
RT	Raumtemperatur
SR 101	Sulforhodamin 101
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. <i>T cell receptor</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
THF	Tetrahydrofolat
TTS	transdermale therapeutische Systeme
UV	ltraviolett
Vol.	Volumen
%	Prozent
°C	Grad-Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
L	Liter
m	Meter
r	Radius
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
T	Temperatur
V	Volt
W	Watt

5.2 Symbole

η	dynamische Viskosität ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
λ	Wellenlänge (nm)
ρ	Dichte ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
D_n	mittlerer Partikeldurchmesser (nm)
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)
M_W	Molekulargewicht ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
N_A	<i>Avogadro</i> -Konstante ($6,022\cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
Re	<i>Reynolds</i> -Zahl
T_g	Glasübergangstemperatur ($^{\circ}\text{C}$)
V	Volumen (L)

6. Zusammenfassung

Nanopartikuläre Wirkstofftransportsysteme besitzen ein großes Potential für therapeutische Anwendungen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene grundlegende Aspekte, die für das erweiterte biologische Verständnis und die Entwicklung weiterer zielgerichteter Strategien zur Pharmakotherapie mit Nanopartikeln und –kapseln notwendig sind, näher untersucht.

Experimente zur zellulären Aufnahmefähigkeit (*in vitro und ex vivo*) wurden mit verschiedenen Nanopartikeln und –kapseln aus diversen Monomeren und biokompatiblen Makromolekülen in immortalisierten Zellkulturlinien, humanen mesenchymalen Stammzellen und Leukozyten durchgeführt.

Die Einflüsse der Oberflächenfunktionalisierungen der nanopartikulären Systeme auf deren zelluläre Aufnahme wurden untersucht sowie deren toxikologische Effekte betrachtet.

Um die multiplen Wechselwirkungen der Nanopartikel mit Bestandteilen des humanen peripheren Vollblutes zu untersuchen, wurde ein durchflusszytometrisches Analyseverfahren (*ex vivo*) entwickelt, das eine Inkubation mit funktionalisierten und unfunktionalisierten Fluoreszenz-markierten Polystyrol-Nanopartikeln mit einheitlicher Oberflächenladung in diesem komplexen biologischen Milieu ermöglicht. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl in mit K_3EDTA , mit $Na_3Citrat$ als auch mit Li-Heparin antikoaguliertem peripherem Vollblut funktionalisierte Nanopartikel (im Vergleich zu den Nanopartikeln ohne Funktionalisierung) zu einer verstärkten zellulären Aufnahme in den phagozytierenden Zellen wie $CD14+$ Monozyten und $CD16+$ neutrophilen Granulozyten führen. Der carboxylfunktionalisierte Nanopartikel zeigt hierbei eine stärkere Aufnahmerate als der aminofunktionalisierte Nanopartikel. $CD14+$ Monozyten verzeichnen innerhalb der ersten Stunden einen Hauptteil der zellulären Aufnahme; $CD16+$ neutrophile Granulozyten zeigen eine kontinuierliche Aufnahmesteigerung über einen Inkubationszeitraum von 8 h. Die intrazelluläre Lokalisation in Vesikeln konnte durch CLSM-Analysen bestätigt werden. $CD3+$ und $CD19+$ Lymphozyten zeigen für alle getesteten Nanopartikel keine bis eine sehr geringe zelluläre Aufnahme; die unfunktionalisierten Nanopartikel zeigen hierbei eine leicht stärkere Tendenz. Probenansätze, die mit den Calcium-komplexierenden Agenzien K_3EDTA und $Na_3Citrat$ versetzt wurden, zeigen im Vergleich zu mit Li-Heparin antikoagulierten Proben insgesamt eine geringere zelluläre Aufnahme. Proben, die sowohl mit K_3EDTA als auch mit Li-Heparin versetzt wurden, zeigen eine zu reinen K_3EDTA -Proben vergleichbare geringere zelluläre Aufnahme. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der Einfluss von Calcium-komplexierenden Anti-

koagulanzen zu einer Verringerung der zellulären Aufnahme und nicht Li-Heparin zu einer Verstärkung führt.

Des Weiteren wurde mit HeLa-Zellen der Einfluss von Proteinen, die eine Adsorptionsschicht auf funktionalisierten Polystyrol-Nanopartikeln ausbilden, auf das zelluläre Aufnahmeverhalten untersucht. Hierzu wurde bovines Serumalbumin (BSA) als Modellprotein verwendet, das vor der Zugabe zu der Zellkultur auf den Nanopartikeln adsorbiert wurde. Es zeigte sich auch bei diesen Experimenten, dass carboxyl- und aminofunktionalisierte Nanopartikel besser aufgenommen werden als unfunktionalisierte. Eine BSA-Adsorptionsschicht auf den Nanopartikeln führt zu einer geringfügigen Verringerung der zellulären Aufnahme. Unterschiede werden insbesondere deutlich bei der Inkubation dieser BSA-bedeckten Nanopartikel mit und ohne additivem Kälberserum (FCS) im Zellkulturmedium. Dies kann auf die Ausbildung einer dynamischen Proteinkorona bzw. auf die Adsorption von weiteren Proteinen des FCS auf den Nanopartikeln zurückgeführt werden. Das Verhältnis der zellulären Aufnahmeraten von funktionalisierten und unfunktionalisierten Nanopartikeln ist in FCS-freiem Medium deutlich größer. Additive Proteine nivellieren die Effekte der Oberflächenfunktionalisierungen. Mittels CLSM-Analysen konnte intrazellulär die Adsorption von Fluoreszenz-markiertem BSA auf den Nanopartikeln bestätigt werden. Auch nach längeren Inkubationszeiten von 24 h ist noch BSA auf den intrazellulären Nanopartikeln adsorbiert.

In einer weiteren Experimentreihe wurden Nanokapseln (Synthese Frau Dr. Grit Baier) aus diversen Monomeren (Triethylentetramin, Diethylentriamin, Diaminohexan, Milchsäure und Mannitol) und Makromolekülen (Hyaluronsäure, Kartoffelstärke, Hydroxyethylstärke (HES)) hinsichtlich ihrer Eignung als Wirkstofftransportsysteme in diversen Zelllinien untersucht. Alle getesteten Nanokapseln sind nicht zytotoxisch. Hyaluronsäure-Nanokapseln zeigen reproduzierbar für einen Teil der HeLa-Zellen innerhalb der Zellkultur eine starke zelluläre Aufnahme. Zellen mit quantitativer Zellaufnahme weisen zusätzlich starke Anlagerungen der Hyaluronsäure-Nanokapseln an den Zellmembranen auf, welche auch nach Inkubationszeiten von 48 h erhalten bleiben. Andere HeLa-Zellpopulationen zeigen hingegen keinerlei Aufnahme und keine Anlagerungen an den Membranen. Eine unterschiedliche Expression des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44 auf den HeLa-Zellen konnte als Ursache für dieses ungleichmäßige Aufnahmeverhalten in CLSM-Analysen ausgeschlossen werden. Eine mögliche Abhängigkeit der selektiven zellulären Aufnahme von Hyaluronsäure-Nanokapseln vom Zellzyklusstadium der HeLa-Zellen muss weiterführend untersucht werden. Mit mesenchymalen Stammzellen wurden nahezu keine Adhäsionen der Hyaluronsäure-Nanokapseln an den

Zellmembranen beobachtet, allerdings wurde eine intrazelluläre Lokalisation in allen Zellen festgestellt.

Heparin-Nanokapseln werden von diversen immortalisierten Zelllinien gut aufgenommen. Nanokapseln aus weiteren biokompatiblen Monomeren und Makromolekülen zeigen keine Zytotoxizität und geringe zelluläre Aufnahmezeiten.

Insbesondere HES-, Milchsäure- und Diethylentriamin-Nanokapseln zeigen eine sehr geringe Zellaufnahme. Alle Nanokapseln dieser Versuchsreihe wurden mit biologisch aktiver Folsäure gekoppelt und hinsichtlich des zellulären Aufnahmeverhaltens untersucht. Folsäure bindet an den Folsäure-Rezeptor α (FR α), der von vielen Krebszellarten exprimiert wird (u.a. HeLa-Zellen). Ob durch diese Folsäure-Funktionalisierung ein selektiver Transport der Nanokapseln möglich ist, wurde mit FR α -positiven HeLa-Zellen und FR α -negativen A549-Zellen untersucht. Für diese Testreihe wurden HES-Nanokapseln ausgewählt, die unfunktionalisiert eine sehr geringe zelluläre Aufnahme aufweisen und nach Folsäure-Kopplung eine starke Aufnahmezeit verzeichnen. Hierfür wurde Folsäure-freies und mit verschiedenen Konzentrationen an Folsäure supplementiertes Medium verwendet, um einen kompetitiven Hemmeffekt der Folsäure für FR α zu erzeugen und damit eine mögliche FR α -vermittelte zelluläre Aufnahme der Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapsel zu unterdrücken. Solch ein Hemmeffekt konnte für eine Größenfraktion der Folsäure-gekoppelten HES-Nanokapseln mit einem mittleren Durchmesser von 174 nm nachgewiesen werden, hingegen nicht für eine Größenfraktion mit 307 nm. Dies weist auf eine Größenabhängigkeit der Folsäure-gekoppelten Nanokapseln für einen FR α -vermittelten zellulären Aufnahmeweg hin.

Hydrolysierbare Polyesterpartikel aus Poly(5,6-Benzo-2-methylen-1,3-dioxepan) (P(BMDO)) (Synthese Herr Dr. Jörg Max Siebert) wurden in HeLa-Zellen getestet. Diverse zur Synthese verwendete Tenside sowie der Einsatz von Styrol als Comonomer zeigten keine zytotoxischen Eigenschaften sowie eine starke zelluläre Aufnahme, bei der zu diversen Inkubationszeiten keine Anlagerungen an den Zellmembranen der HeLa-Zellen detektiert werden konnte. Das hydrophobe Zytostatikum Paclitaxel wurde erfolgreich in die Matrix der P(BMDO)-Nanopartikel eingebettet. Diese Nanopartikel zeigten nach zellulärer Aufnahme eine Hemmung der Mitose. Diese pharmakologische Wirkung, die auf die Degradation der mit Paclitaxel beladenen P(BMDO)-Nanopartikel zurückzuführen ist, wurde mit kommerziell erhältlichen Paclitaxel-Formulierungen (Paclitaxel Hospira und Abraxane[®]) verglichen und zeigte in diesem Zusammenhang den gleichen, aber leicht zeitverzögerten Effekt.

P(BMDO)-Nanopartikel sind nicht zytotoxisch und eignen sich potenziell als Wirkstofftransportsysteme für hydrophobe Arzneistoffe, da sie innerhalb von wenigen Stunden intrazellulär degradiert werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimentalreihen mit Nanopartikeln und Nanokapseln besitzen ein vielfältiges Potential als Wirkstofftransportsysteme. Es zeigte sich, dass Unterschiede bei der Größe, der Größenverteilung, des Polymers sowie der Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel bedeutende Unterschiede der Zellaufnahme in diversen Zellkulturlinien (*in vitro*) und Leukozyten in peripherem Vollblut (*ex vivo*) zur Folge haben. Bei den Nanopartikel-Inkubations-Experimenten in peripherem Vollblut sowie bei den einzelnen Experimentreihen von Nanopartikeln und Nanokapseln in Zellkultur zeigte sich, dass Oberflächenfunktionalisierungen jeglicher Art, entweder unspezifischer (Amino- und Carboxylfunktionalisierung) oder spezifischer Natur (Folsäure-Kopplung), zu einer deutlichen Steigerung der zellulären Partikel Aufnahme führen. Bei Inkubationsexperimenten in peripherem Vollblut sind die Nanopartikel dem biologischen Milieu ausgesetzt. Hier sind weiterführende Analysen der Nanopartikel-Proteinkorona (*ex vivo* bzw. *in vivo*) hinsichtlich der Proteinzusammensetzung notwendig, um die daraus resultierenden Einflüsse auf die Oberflächenfunktionalisierungen der Nanopartikel /-kapseln und deren intra- und extrazelluläre Wechselwirkungen zu verstehen, welche die zellulären Aufnahmewege beeinflussen.

Es gilt zukünftig den Fokus von einer wissenschaftlichen Testung der Nanopartikel (*in vitro*) und der Betrachtung von zytotoxischen Effekten hin auf das wissenschaftliche Verständnis der molekularen Wechselwirkungen mit Proteinen und den Interaktionen auf extra- und intrazellulärer Ebene zu richten, um die Ambitionen und das große Potential, welche die nanopartikulären Wirkstofftransportsysteme bieten, ausschöpfen zu können.

7. Conclusion

Innovative nanoparticles and nanocapsules have enormous potential to improve drug-delivery. In this thesis several fundamental aspects essential to the development and understanding of nanoparticulate drug-targeting systems were investigated. The cellular uptake (*in vitro*) of different functionalized nanoparticles and nanocapsules synthesized with different monomers and biocompatible macromolecules was analyzed in various immortalized cell lines, human mesenchymal stem cells and human peripheral blood (*ex vivo*). The focus was on the uptake behaviour of the nanoparticulate systems, the influence of their different surface functionalization and the toxicological effects to the analyzed cells.

To investigate the multiple interactions of nanoparticles with components of human peripheral blood, a flow cytometric analysis method has been developed. A set of unfunctionalized and functionalized (carboxyl and amino) fluorescent polystyrene nanoparticles was incubated in anticoagulated human peripheral blood for several hours and the cellular uptake in four different types of leucocytes was analyzed. CD3+ T lymphocytes, CD19+ B lymphocytes, CD14+ monocytes and CD16+ neutrophil granulocytes were selected by flow cytometric measurements and specific antibody labeling. Anticoagulation of blood samples was tested with three different anticoagulants. The results showed that with both calcium chelating agents (K₃EDTA and Na₃citrate) and with Li-heparin, a high cellular uptake of the functionalized nanoparticles and to a lower degree for the unfunctionalized nanoparticles was obtained in CD14+ monocytes and CD16+ neutrophil granulocytes. Unfunctionalized polystyrene nanoparticles were internalized to a lower extent by these phagocytic leucocytes. CD3+ T and CD19+ B lymphocytes showed a very low cellular uptake for all tested nanoparticles. The unfunctionalized nanoparticles actually showed in proportion to both lymphocytes a higher uptake. In general, leucocytes out of blood samples anticoagulated with Li-Heparin showed a higher uptake. Further experiments had proven that calcium chelating agents diminish cellular uptake and Li-heparin did not enhance it. CLSM-experiments confirmed the intracellular localization in the leucocytes.

Furthermore, the influence of adsorbed proteins was investigated by using bovine serum albumin (BSA) as model protein. Different functionalized polystyrene nanoparticles were precovered with bovine serum albumin before they were added to cell culture. Then, their cellular uptake behaviour was analysed. The BSA-coverage reduced the uptake marginally. Experiments were carried out in cell culture medium with and without supplemented foetal

calf serum (FCS). These additional proteins accentuated the proportions of uptake benefit by the functional groups. In a FCS-free cell culture medium, the uptake relation of the carboxyl functionalized nanoparticles increased significantly compared to the unfunctionalized polystyrene nanoparticle. The intracellular location was confirmed with fluorescent labeled BSA and it was shown that adsorbed BSA is colocalized with the nanoparticles even after incubation periods of 24 h.

Experimental series were performed with various fluorescent nanocapsules synthesized by Dr. Grit Baier. Nanocapsules composed of diverse monomers (triethylenetetramine, diethylenetriamine, diaminohexane, lactic acid, mannitol) and macromolecules (hyaluronic acid, potato starch and hydroxyethyl starch) were analysed regarding their applicability as drug-delivery systems and their potential to address different cell lines. All tested nanocapsules showed no cytotoxicity. Quantitative measurements were carried out by flow cytometry and qualitative measurements by confocal laser scanning microscopy.

Hyaluronic acid nanocapsules accumulated in HeLa-cells to a high extent and are also attached to the cell membrane. These attachments and accumulations are only seen in grouped HeLa-cells in adjacency. Other groups of HeLa-cells seeded in the same cell culture plates did not show any uptake or attachments of hyaluronic acid nanocapsules. It was found out that these differences in uptake behaviour are not caused by an inhomogeneous expression of the hyaluronic acid receptor CD44, but are assumed to be caused by different stages of the cell cycle of grouped HeLa-cells. With mesenchymal stem cells, an uptake was detected in all cells and no attachments were observed.

Heparin-nanocapsules were taken up in several tested immortalized cell lines. Furthermore, nanocapsules made from biocompatible monomers and macromolecules showed no or only marginal cellular uptake. In particular, diethylenetriamine-, lactic acid- and hydroxyethyl starch-nanocapsules showed a very low cellular uptake. All these nanocapsules were conjugated with biologically active folic acid to investigate the potential of folic acid-conjugated nanocapsules as active drug-targeting agents. Experiments with hydroxyethyl starch (HES)-nanocapsules were conducted with folate receptor α (FR α) expressing HeLa-cells and FR α non-expressing A549-cells. The cell culture medium was kept free of folic acid or was supplemented with different concentrations of folic acid to inhibit a folate receptor mediated uptake of folic acid-conjugated HES-nanocapsules. It was proven that a folic acid mediated uptake via the FR α depends on the size of the HES-nanocapsules. Folic acid-conjugated HES-nanocapsules of the smaller size fraction with a hydrodynamic radius of 174

nm showed an uptake inhibition when additional folic acid was added to the medium. The second fraction of 307 nm did not show any uptake inhibition with additional folic acid.

Hydrolyzable nanoparticles of poly(5,6-Benzo-2-methylene-1,3-dioxepan) (P(BMDO)) were synthesized by Dr. Jörg Max Siebert and tested in HeLa-cells. The use of different ionic and non-ionic surfactants during synthesis did neither influence the good cellular uptake nor the cytotoxicity. An increasing initial feed ratio of styrene copolymerized with BMDO extenuated the cellular uptake. Incorporated hydrophobic cytostatic drug paclitaxel in P(BMDO)-nanoparticles obtained intracellular cytotoxic effects which are comparable to commonly used drug formulations (Paclitaxel Hospira and Abraxane[®]). Inhibition of mitosis in HeLa-cells was detected using confocal laser scanning microscopy.

The nanocapsules and P(BMDO)-nanoparticles that have been tested in the course of this work are promising nanosized drug-delivery systems. It has been proven that differences in size, polymer properties and surface functionalizations play an important role in cellular uptake in cell cultures (*in vitro*) and leucocytes (*ex vivo*). In experiments with peripheral blood the nanoparticles are exposed to the biological environment. Further investigations are required regarding the adsorbed proteins on the nanoparticle surface and the subsequent interactions with the cells. In the future the focus has to be shifted from pure scientific nanoparticle testing to a detailed understanding of molecular interactions among nanoparticles, proteins and cells to convey the high ambition and high potential of nanopharmaceuticals.

8. Literaturverzeichnis

- [1] M. Ferrari, *Nature Reviews Cancer* **2005**, 5, 161.
- [2] R. Duncan, *Nature Reviews Cancer* **2006**, 6, 688.
- [3] V. Mailänder, K. Landfester, *Biomacromolecules* **2009**, 10, 2379.
- [4] J. Kreuter, *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 331, 1.
- [5] P. Ehrlich, *Internationale Wochenschrift für Wissenschaft, Kunst und Technik* **1907**, 1, 125.
- [6] D. Frank F, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 457.
- [7] H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, 403.
- [8] I. Lynch, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat Nano* **2009**, 4, 546.
- [9] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *Journal of Controlled Release* **2000**, 65, 271.
- [10] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Research* **1986**, 46, 6387.
- [11] S. K. Sahoo, V. Labhasetwar, *Molecular Pharmaceutics* **2005**, 2, 373.
- [12] A. M. Wu, P. D. Senter, *Nature Biotechnology* **2005**, 23, 1137.
- [13] R. M. Schiffelers, G. A. Koning, T. L. M. ten Hagen, M. Fens, A. J. Schraa, A. Janssen, R. J. Kok, G. Molema, G. Storm, *Journal of Controlled Release* **2003**, 91, 115.
- [14] A. Gabizon, H. Shmeeda, A. T. Horowitz, S. Zalipsky, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56, 1177.
- [15] E. M. Pridgen, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Nanomedicine* **2007**, 2, 669.
- [16] M. R. Lorenz, V. Holzapfel, A. Musyanovych, K. Nothelfer, P. Walther, H. Frank, K. Landfester, H. Schrezenmeier, V. Mailänder, *Biomaterials* **2006**, 27, 2820.
- [17] M. Kourti, N. Vavatsi, N. Gombakis, V. Sidi, G. Tzimagiorgis, T. Papageorgiou, D. Kolioukas, F. Athanassiadou, *International Journal of Hematology* **2007**, 86, 166.
- [18] K. Landfester, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, 48, 4488.
- [19] O. Zupke, E. Distler, D. Baumann, D. Strand, R. G. Meyer, K. Landfester, W. Herr, V. Mailänder, *Biomaterials* **2010**, 31, 7086.
- [20] A. Musyanovych, R. Rossmanith, C. Tontsch, K. Landfester, *Langmuir* **2007**, 23, 5367.
- [21] G. Baier, C. Costa, A. Zeller, D. Baumann, C. Sayer, P. H. H. Araujo, V. Mailänder, A. Musyanovych, K. Landfester, *Macromolecular Bioscience* **2011**, 11, 628.
- [22] R. C. Pasquali, M. P. Taurozzi, C. Bregni, *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 356, 44.
- [23] B. Derjaguin, L. Landau, *Progress in Surface Science* **1993**, 43, 30.
- [24] O. J. T. G. Verwey E.J.W., *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids.*, Amsterdam: Elsevier, **1948**.
- [25] T. P. Hoar, J. H. Schulman, *Nature* **1943**, 152, 102.
- [26] T. G. Mason, J. Bibette, *Langmuir* **1997**, 13, 4600.
- [27] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, M. Antonietti, *Macromolecules* **1999**, 32, 5222.
- [28] K. Landfester, *Macromolecular Rapid Communications* **2001**, 22, 896.
- [29] Elias H.G., *Makromoleküle, Band 2, Physikalische Strukturen und Eigenschaften, Vol. 6*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **1999**.
- [30] T. Cserhádi, E. Forgács, G. Oros, *Environment International* **2002**, 28, 337.
- [31] E. K. Anderberg, C. Nyström, P. Artursson, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1992**, 81, 879.
- [32] A. Ziegler, K. Landfester, A. Musyanovych, *Colloid and Polymer Science* **2009**, 287, 1261.

- [33] X. E. Jiang, J. Dausend, M. Hafner, A. Musyanovych, C. Rucker, K. Landfester, V. Mailander, G. U. Nienhaus, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 748.
- [34] V. Holzappel, A. Musyanovych, K. Landfester, M. R. Lorenz, V. Mailander, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, *206*, 2440.
- [35] F. Tiarks, K. Landfester, M. Antonietti, *Langmuir* **2001**, *17*, 908.
- [36] C. Scott, D. Wu, C.-C. Ho, C. C. Co, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 4160.
- [37] C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary, P. Couvreur, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 519.
- [38] D. Crespy, M. Stark, C. Hoffmann-Richter, U. Ziener, K. Landfester, *Macromolecules* **2007**, *40*, 3122.
- [39] L. Torini, J. F. Argillier, N. Zydowicz, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3225.
- [40] U. Paiphansiri, P. Tangboriboonrat, K. Landfester, *Macromolecular Bioscience* **2006**, *6*, 33.
- [41] G. Baier, A. Musyanovych, K. Landfester, A. Best, S. Lorenz, V. Mailänder, *Macromolecular Bioscience* **2011**, *11*, 1099.
- [42] H. Hillaireau, P. Couvreur, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, *66*, 2873.
- [43] T.-G. Iversen, T. Skotland, K. Sandvig, *Nano Today* **2011**, *6*, 176.
- [44] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, *422*, 37.
- [45] J. A. Swanson, C. Watts, *Trends in Cell Biology* **1995**, *5*, 424.
- [46] T. Kanaseki, K. Kadota, *The Journal of Cell Biology* **1969**, *42*, 202.
- [47] S. Saffarian, E. Cocucci, T. Kirchhausen, *Plos Biology* **2009**, *7*.
- [48] L. A. Bareford, P. W. Swaan, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 748.
- [49] S. Mayor, R. E. Pagano, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 603.
- [50] J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailänder, *Macromolecular Bioscience* **2008**, *8*, 1135.
- [51] A. Aderem, D. M. Underhill, *Annual Review of Immunology* **1999**, *17*, 593.
- [52] M. Rabinovitch, *Trends in Cell Biology* **1995**, *5*, 85.
- [53] D. E. Owens, N. A. Peppas, *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *307*, 93.
- [54] M. Bartneck, H. A. Keul, S. Singh, K. Czaja, J. r. Bornemann, M. Bockstaller, M. Moeller, G. Zwadlo-Klarwasser, J. r. Groll, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3073.
- [55] E. Caron, A. Hall, *Science* **1998**, *282*, 1717.
- [56] S. Marion, J. Mazzolini, N. Kambou-Pene, C. Lebugle, P. Bourdoncle, F. Herit, M. Thome, F. Niedergang, *European Journal of Clinical Investigation* **2011**, *41*, 51.
- [57] V. Claus, A. Jahraus, T. Tjelle, T. Berg, H. Kirschke, H. Faulstich, G. Griffiths, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 9842.
- [58] E. D. Korn, R. A. Weisman, *Journal of Cell Biology* **1967**, *34*, 219.
- [59] V. Schäfer, H. von Briesen, R. Andreesen, A.-M. Steffan, C. Royer, S. Tröster, J. Kreuter, H. Rübsamen-Waigmann, *Pharmaceutical Research* **1992**, *9*, 541.
- [60] Y. Tabata, Y. Ikada, *Biomaterials* **1988**, *9*, 356.
- [61] S. M. Moghimi, J. Szebeni, *Progress in Lipid Research* **2003**, *42*, 463.
- [62] T. D. Heath, N. G. Lopez, D. Papahadjopoulos, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1985**, *820*, 74.
- [63] T. M. Allen, G. A. Austin, A. Chonn, L. Lin, K. C. Lee, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1991**, *1061*, 56.
- [64] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. C. Leroux, J. P. Benoit, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006**, *78A*, 620.
- [65] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.-P. Benoit, *Biomaterials* **2006**, *27*, 4356.
- [66] J. C. Leroux, F. Dejaeghere, B. Anner, E. Doelker, R. Gurny, *Life Sciences* **1995**, *57*, 695.
- [67] T. M. Göppert, R. H. Müller, *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, *302*, 172.

- [68] M. Roser, D. Fischer, T. Kissel, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **1998**, *46*, 255.
- [69] S. M. Moghimi, I. S. Muir, L. Illum, S. S. Davis, V. Kolb-Bachofen, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1993**, *1179*, 157.
- [70] A. Rigotti, S. L. Acton, M. Krieger, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 16221.
- [71] G. V. Betageri, C. D. V. Black, J. Szebeni, L. M. Wahl, J. N. Weinstein, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1993**, *45*, 48.
- [72] L. Kole, K. Sarkar, S. B. Mahato, P. K. Das, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, *200*, 351.
- [73] M. E. Norman, P. Williams, L. Illum, *Biomaterials* **1992**, *13*, 841.
- [74] J.-C. Leroux, F. De Jaeghere, B. Anner, E. Doelker, R. Gurny, *Life Sciences* **1995**, *57*, 695.
- [75] F. Esmaeili, M. H. Ghahremani, B. Esmaeili, M. R. Khoshayand, F. Atyabi, R. Dinarvand, *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *349*, 249.
- [76] I. Bertholon, C. Vauthier, D. Labarre, *Pharmaceutical Research* **2006**, *23*, 1313.
- [77] D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, K. A. Dawson, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 5761.
- [78] A. Gessner, R. Waicz, A. Lieske, B. R. Paulke, K. Mäder, R. H. Müller, *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *196*, 245.
- [79] P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61*, 428.
- [80] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5*, 505.
- [81] R. Gref, M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Muller, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2000**, *18*, 301.
- [82] R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, *Science* **1994**, *263*, 1600.
- [83] P. Couvreur, C. Vauthier, *Pharmaceutical Research* **2006**, *23*, 1417.
- [84] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 214.
- [85] C. Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58*, 327.
- [86] E. Osterberg, K. Bergstrom, K. Holmberg, T. P. Schuman, J. A. Riggs, N. L. Burns, J. M. Vanalstine, J. M. Harris, *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, *29*, 741.
- [87] A. Besheer, J. r. Vogel, D. Glanz, J. r. Kressler, T. Groth, K. Mäder, *Molecular Pharmaceutics* **2009**, *6*, 407.
- [88] J. A. Champion, S. Mitragotri, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 4930.
- [89] K. A. Beningo, Y. L. Wang, *Journal of Cell Science* **2002**, *115*, 849.
- [90] X. Sun, R. Rossin, J. L. Turner, M. L. Becker, M. J. Joralemon, M. J. Welch, K. L. Wooley, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2541.
- [91] S. Lorenz, C. P. Hauser, B. Autenrieth, C. K. Weiss, K. Landfester, V. Mailander, *Macromolecular Bioscience* **2010**, *10*, 1034.
- [92] M. Bartneck, H. A. Keul, G. Zwadlo-Klarwasser, J. Groll, *Nano Letters* **2010**, *10*, 59.
- [93] S. Wernersson, M. C. I. Karlsson, J. Dahlstrom, R. Mattsson, J. S. Verbeek, B. Heyman, *Journal of Immunology* **1999**, *163*, 618.
- [94] R. A. B. Ezekowitz, S. Gordon, *Ciba Foundation Symposia* **1986**, *118*, 127.
- [95] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky, *Science* **2004**, *303*, 1532.
- [96] M. von Koeckritz-Blickwede, O. Goldmann, P. Thulin, K. Heinemann, A. Norrby-Teglund, M. Rohde, E. Medina, *Blood* **2008**, *111*, 3070.

- [97] ESF, *Forward Look on Nanomedicine 2005*, European Science Foundation, **2005**.
- [98] A. Ruiz-Garcia, M. Bermejo, A. Moss, V. G. Casabo, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, *97*, 654.
- [99] K. H. Bauer, K.-H. Frömming, C. Führer, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*, 7 ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **2002**.
- [100] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3.
- [101] J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, *Journal of Molecular Biology* **2005**, *353*, 38.
- [102] M. Dockal, D. C. Carter, F. Ruker, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 29303.
- [103] I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, S. Twine, M. East, S. Curry, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 22804.
- [104] J. H. Lin, *Current Drug Metabolism* **2009**, *10*, 661.
- [105] Fachinformation, *Neulasta 6 mg Injektionslösung*, Amgen Europe B.V. **2011**.
- [106] Fachinformation, *KOGENATE Bayer 250 I.E. als Fertig-Set*, Bayer Pharma AG **2011**.
- [107] A. Musyanovych, J. Schmitz-Wienke, V. Mailänder, P. Walther, K. Landfester, *Macromolecular Bioscience* **2008**, *8*, 127.
- [108] C. Witt, K. Mader, T. Kissel, *Biomaterials* **2000**, *21*, 931.
- [109] S. D. Li, L. Huang, *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5*, 496.
- [110] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, *Environmental Health Perspectives* **2005**, *113*, 823.
- [111] A. des Rieux, E. G. E. Ragnarsson, E. Gullberg, V. Preat, Y. J. Schneider, P. Artursson, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *25*, 455.
- [112] J. A. Kim, C. Aberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat Nano* **2012**, *7*, 62.
- [113] W. J. Stark, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 1242.
- [114] A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat Mater* **2009**, *8*, 543.
- [115] F. Caruso, *Advanced Materials* **2001**, *13*, 11.
- [116] W. Kreyling, M. Semmler-Behnke, W. Möller, *Journal of Nanoparticle Research* **2006**, *8*, 543.
- [117] L. K. Limbach, Y. Li, R. N. Grass, T. J. Brunner, M. A. Hintermann, M. Müller, D. Gunther, W. J. Stark, *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 9370.
- [118] T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggård, S. C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse, K. A. Dawson, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 5754.
- [119] B. Chanteau, J. Fresnais, J. F. Berret, *Langmuir* **2009**, *25*, 9064.
- [120] J. Lademann, H. Richter, S. Schanzer, F. Knorr, M. Meinke, W. Sterry, A. Patzelt, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2011**, *77*, 465.
- [121] J. Lademann, H. Richter, A. Teichmann, N. Otberg, U. Blume-Peytavi, J. Luengo, B. Weiss, U. F. Schaefer, C. M. Lehr, R. Wepf, W. Sterry, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *66*, 159.
- [122] W. C. Mak, H. Richter, A. Patzelt, W. Sterry, K. K. Lai, R. Renneberg, J. Lademann, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2011**, *79*, 23.
- [123] W. G. Kreyling, S. Hirn, C. Schleh, *Nat Biotech* **2010**, *28*, 1275.
- [124] C. Brandenberger, B. Rothen-Rutishauser, C. Muehlfeld, O. Schmid, G. A. Ferron, K. L. Maier, P. Gehr, A. G. Lenz, *Toxicology and Applied Pharmacology* **2010**, *242*, 56.
- [125] H.-R. Paur, F. R. Cassee, J. Teeguarden, H. Fissan, S. Diabate, M. Aufderheide, W. G. Kreyling, O. Hanninen, G. Kasper, M. Riediker, B. Rothen-Rutishauser, O. Schmid, *Journal of Aerosol Science* **2011**, *42*, 668.

- [126] S. Bade, N. Röckendorf, A. Musyanovych, K. Landfester, J. Dimitrijevic, T. Vossmeier, H. Weller, A. Frey, *International Conference on "Biological Response2 to Nanoscale Particles" SPP1313 2011, Modification of Nanoparticles by Intestinal Constituents*
- [127] Y. Whulanza, N. Ucciferri, C. Domenici, G. Vozzi, A. Ahluwalia, *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 26, 3303.
- [128] N. Ucciferri, E. Collnot, M. Favre, B. Gaiser, S. Hirn, T. Sbrna, J. Susewind, A. Ahluwalia, W. G. Kreyling, C. M. Lehr, V. Stone, M. Liley, *International Conference on "Biological Responses to Nanoscale Particles" SPP1313 2011, Inlivetox: Design and Development of a Systemic Model for Nanotoxicity*
- [129] P. Nielsen, A. Eychmüller, H. Weller, H. Hohenberg, J. Heeren, *International Conference on "Biological Responses to Nanoscale Particles" SPP1313 2011, The Liver as Central Organ for Uptake and Processing of Nanoparticles*
- [130] F. F. Davis, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 457.
- [131] H. Gareth A, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2005**, 1, 22.
- [132] D. Predescu, G. E. Palade, *American Journal of Physiology* **1993**, 265, H725.
- [133] J. Kreuter, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 47, 65.
- [134] R. M. Ludatscher, W. E. Stehbens, *Cell and Tissue Research* **1969**, 97, 169.
- [135] F. Braet, E. Wisse, P. Bomans, P. Frederik, W. Geerts, A. Koster, L. Soon, S. Ringer, *Microscopy Research and Technique* **2007**, 70, 230.
- [136] J. Folkman, *Nat Med* **1995**, 1, 27.
- [137] R. Kerbel, J. Folkman, *Nat Rev Cancer* **2002**, 2, 727.
- [138] H. Maeda, K. Greish, J. Fang, in *Polymer Therapeutics Ii: Polymers as Drugs, Conjugates and Gene Delivery Systems, Vol. 193*, Springer-Verlag Berlin, Berlin, **2006**, pp. 103.
- [139] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 631.
- [140] F. Marcucci, F. Lefoulon, *Drug Discovery Today* **2004**, 9, 219.
- [141] O. C. Farokhzad, J. J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 6315.
- [142] J. Jin, K. K. Zhou, K. Park, Y. Hu, X. Xu, Z. Zheng, P. Tyagi, U. B. Kompella, J.-x. Ma, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2011**, 52, 6230.
- [143] D. F. Emerich, C. G. Thanos, *Journal of Drug Targeting* **2007**, 15, 163.
- [144] O. C. Farokhzad, R. Langer, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 1456.
- [145] Fachinformation, *Herceptin (R) 150 mg, Roche Pharma AG* **2011**.
- [146] Fachinformation, *Avastin (R), Roche Pharma AG* **2012**.
- [147] J. D. Heidel, Z. Yu, J. Y.-C. Liu, S. M. Rele, Y. Liang, R. K. Zeidan, D. J. Kornbrust, M. E. Davis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, 5715.
- [148] F. Alexis, J. W. Rhee, J. P. Richie, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations* **2008**, 26, 74.
- [149] S. C. B. Gopinath, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 387, 171.
- [150] O. C. Farokhzad, S. Y. Jon, A. Khademhosseini, T. N. T. Tran, D. A. LaVan, R. Langer, *Cancer Research* **2004**, 64, 7668.
- [151] O. Stanger, *Current Drug Metabolism* **2002**, 3, 211.
- [152] L. E. Kelemen, *International Journal of Cancer* **2006**, 119, 243.
- [153] R. Zhao, I. Goldman, *Cancer and Metastasis Reviews* **2007**, 26, 129.
- [154] P. S. Low, S. A. Kularatne, *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, 13, 256.
- [155] N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low, C. P. Leamon, *Analytical Biochemistry* **2005**, 338, 284.
- [156] J. F. Ross, P. K. Chaudhuri, M. Ratnam, *Cancer* **1994**, 73, 2432.

- [157] W. Xia, A. R. Hilgenbrink, E. L. Matteson, M. B. Lockwood, J.-X. Cheng, P. S. Low, *Blood* **2009**, *113*, 438.
- [158] H. Elnakat, M. Gonit, M. D. Salazar, J. Zhang, V. Basrur, W. Gunning, B. Kamen, M. Ratnam, *Biochemistry* **2009**, *48*, 8249.
- [159] J. F. Ross, H. Wang, F. G. Behm, P. Mathew, M. Wu, R. Booth, M. Ratnam, *Cancer* **1999**, *85*, 348.
- [160] F. Shen, M. Wu, J. F. Ross, D. Miller, M. Ratnam, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5660.
- [161] T. Yamaguchi, K. Hirota, K. Nagahama, K. Ohkawa, T. Takahashi, T. Nomura, S. Sakaguchi, *Immunity* **2007**, *27*, 145.
- [162] P. C. Elwood, K. Nachmanoff, Y. Saikawa, S. T. Page, P. Pacheco, S. Roberts, K. N. Chung, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1467.
- [163] P. S. Low, W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 120.
- [164] A. R. Hilgenbrink, P. S. Low, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *94*, 2135.
- [165] A. C. Antony, M. A. Kane, R. M. Portillo, P. C. Elwood, J. F. Kolhouse, *Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*, 4911.
- [166] A. C. Antony, *Annual Review of Nutrition* **1996**, *16*, 501.
- [167] S. Miotti, M. Bagnoli, A. Tomassetti, M. I. Colnaghi, S. Canevari, *Journal of Cell Science* **2000**, *113*, 349.
- [168] M. Bagnoli, A. Tomassetti, M. Figini, S. Flati, V. Dolo, S. Canevari, S. Miotti, *Oncogene* **2000**, *19*, 4754.
- [169] A. Tomassetti, F. Mangiarotti, M. Mazzi, S. Sforzini, S. Miotti, E. Galmozzi, P. C. Elwood, S. Canevari, *Cancer Research* **2003**, *63*, 696.
- [170] G. Toffoli, C. Cernigoi, A. Russo, A. Gallo, M. Bagnoli, M. Boiocchi, *International Journal of Cancer* **1997**, *74*, 193.
- [171] G. Toffoli, A. Russo, A. Gallo, C. Cernigoi, S. Miotti, R. Sorio, S. Tumolo, M. Boiocchi, *International Journal of Cancer* **1998**, *79*, 121.
- [172] X. Wang, F. Shen, J. H. Freisheim, L. E. Gentry, M. Ratnam, *Biochemical Pharmacology* **1992**, *44*, 1898.
- [173] J. Sudimack, R. J. Lee, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *41*, 147.
- [174] C. P. Leamon, P. S. Low, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 5572.
- [175] C. P. Leamon, I. Pastan, P. S. Low, *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 24847.
- [176] L. Pelkmans, A. Helenius, *Traffic* **2002**, *3*, 311.
- [177] J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J. X. Cheng, P. S. Low, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 13872.
- [178] S. Sabharanjak, S. Mayor, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 1099.
- [179] B. Stella, S. Arpicco, M. T. Peracchia, D. Desmaele, J. Hoebeker, M. Renoir, J. D'Angelo, L. Cattel, P. Couvreur, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, *89*, 1452.
- [180] Y. J. Lu, P. S. Low, *Journal of Controlled Release* **2003**, *91*, 17.
- [181] Q.-Y. Jiang, L.-H. Lai, J. Shen, Q.-Q. Wang, F.-J. Xu, G.-P. Tang, *Biomaterials* **2011**, *32*, 7253.
- [182] P. S. Low, A. C. Antony, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 1055.
- [183] S. H. Kim, J. H. Jeong, K. W. Chun, T. G. Park, *Langmuir* **2005**, *21*, 8852.
- [184] W.-L. Zhang, N. Li, J. Huang, S.-F. Luo, M.-X. Fan, S.-Y. Liu, B. Muir, J.-H. Yu, *Journal of Applied Polymer Science* **2011**, *121*, 3175.
- [185] W. L. Zhang, N. Li, J. Huang, J. H. Yu, D. X. Wang, Y. P. Li, S. Y. Liu, *Journal of Applied Polymer Science* **2010**, *118*, 1805.
- [186] T. Loftsson, D. Duchene, *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *329*, 1.
- [187] Fachinformation, *infukoll (R) HES 6%, UCB Pharma GmbH* **2010**.

- [188] H. Eerikainen, L. Peltonen, J. Raula, J. Hirvonen, E. I. Kauppinen, *Aaps Pharmscitech* **2004**, 5.
- [189] T. Kissel, Y. Li, F. Unger, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 99.
- [190] C. Hiemstra, Z. Zhong, S. R. Van Tomme, M. J. van Steenberg, J. J. L. Jacobs, W. Den Otter, W. E. Hennink, J. Feijen, *Journal of Controlled Release* **2007**, 119, 320.
- [191] Fachinformation, *Implanon (R)*, Essex Pharma GmbH **2008**.
- [192] Fachinformation, *Eligard(R)*, Astellas Pharma GmbH **2011**.
- [193] Fachinformation, *Fentanyl-rationpharm Matrixpflaster(R)*, ratiopharm GmbH **2009**.
- [194] A. Lendlein, D. Hofmann, N. Scharnagel, in *Nachrichten aus der Chemie, Vol. 2*, GdCh, **2011**.
- [195] A. Tautzenberger, S. Lorenz, L. Kreja, A. Zeller, A. Musyanovych, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailaender, A. Ignatius, *Biomaterials* **2010**, 31, 2064.
- [196] R. Duncan, *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, 2, 347.
- [197] V. P. Shastri, A. Lendlein, *Advanced Materials* **2009**, 21, 3231.
- [198] K. T. Kim, S. A. Meeuwissen, R. J. M. Nolte, J. C. M. van Hest, *Nanoscale* **2010**, 2, 844.
- [199] O. T. Bruns, H. Ittrich, K. Peldschus, M. G. Kaul, U. I. Tromsdorf, J. Lauterwasser, M. S. Nikolic, B. Mollwitz, M. Merkel, N. C. Bigall, S. Sapra, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Weller, A. Eychmuller, G. Adam, U. Beisiegel, J. Heeren, *Nat Nano* **2009**, 4, 193.
- [200] M. Vert, *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, 755.
- [201] C. Wohnhaas, A. Turshatov, V. Mailaender, S. Lorenz, S. Balushev, T. Miteva, K. Landfester, *Macromolecular Bioscience* **2011**, 11, 772.
- [202] M. G. Bexiga, J. A. Varela, F. Wang, F. Fenaroli, A. Salvati, I. Lynch, J. C. Simpson, K. A. Dawson, *Nanotoxicology* **2010**, 1.
- [203] A. Zeller, A. Musyanovych, M. Kappl, A. Ethirajan, M. Dass, D. Markova, M. Klapper, K. Landfester, *Acs Applied Materials & Interfaces* **2010**, 2, 2421.
- [204] O. Lunov, T. Syrovets, B. Büchele, X. Jiang, C. Röcker, K. Tron, G. U. Nienhaus, P. Walther, V. Mailänder, K. Landfester, T. Simmet, *Biomaterials* **2010**, 31, 5063.
- [205] A. Beduneau, Z. Ma, C. B. Grotepas, A. Kabanov, B. E. Rabinow, N. Gong, R. L. Mosley, H. Dou, M. D. Boska, H. E. Gendelman, *Plos One* **2009**, 4.
- [206] T. Xia, M. Kovochich, J. Brant, M. Hotze, J. Sempf, T. Oberley, C. Sioutas, J. I. Yeh, M. R. Wiesner, A. E. Nel, *Nano Letters* **2006**, 6, 1794.
- [207] D. Dutta, S. K. Sundaram, J. G. Teegarden, B. J. Riley, L. S. Fifield, J. M. Jacobs, S. R. Addleman, G. A. Kaysen, B. M. Moudgil, T. J. Weber, *Toxicol. Sci.* **2007**, 100, 303.
- [208] V. C. F. Mosqueira, P. Legrand, R. Gref, B. Heurtault, M. Appel, G. Barratt, *Journal of Drug Targeting* **1999**, 7, 65.
- [209] M. R. Lorenz, M.-V. Kohnle, M. Dass, P. Walther, A. Höcherl, U. Ziener, K. Landfester, V. Mailänder, *Macromolecular Bioscience* **2008**, 8, 711.
- [210] O. Lunov, T. Syrovets, C. Loos, J. Beil, M. Delecher, K. Tron, G. U. Nienhaus, A. Musyanovych, V. Mailaender, K. Landfester, T. Simmet, *ACS Nano* **2011**, 5, 1657.
- [211] R. Seitz, H. König, J. Dodt, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2000**.
- [212] R. S. Taichman, *Blood* **2005**, 105, 2631.
- [213] L. Thomas, *Labor und Diagnose*, 5 ed., TH Books, **2000**.
- [214] J. Hawiger, *Thrombosis and Haemostasis* **1995**, 74, 369.
- [215] M. Depka Prondzinski, *Blutgerinnung - Aktuelle Aspekte der Physiologie, Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik, Prophylaxe und Therapie*, uni-med, **2002**.
- [216] G. Mutschler, Kroemer, Ruth, Schäfer-Korting, *Mutschler Arzneimittelwirkungen kompakt*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **2005**.

- [217] W. Irving L, *Cell* **1994**, 76, 207.
- [218] A. Pezzutto, T. Ulrichs, G.-R. Burmester, *Taschenatlas der Immunologie*, 2 ed., Thieme, **2007**.
- [219] M. A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J. B. Hall, S. E. McNeil, *Molecular Pharmaceutics* **2008**, 5, 487.
- [220] M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 469.
- [221] K. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Janeway's Immunobiology*, 7 ed., Garland Science, **2008**.
- [222] B. J. Scallon, E. Scigliano, V. H. Freedman, M. C. Miedel, Y. C. Pan, J. C. Unkeless, J. P. Kochan, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, 86, 5079.
- [223] WHO, *Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations & Stability of blood, plasma and serum samples* **2002**.
- [224] C. Nathan, *Nature Reviews Immunology* **2006**, 6, 173.
- [225] S. Bennouna, S. K. Bliss, T. J. Curiel, E. Y. Denkers, *Journal of Immunology* **2003**, 171, 6052.
- [226] P. Scapini, A. Carletto, B. Nardelli, F. Calzetti, V. Roschke, F. Merigo, N. Tamassia, S. Pieropan, D. Biasi, A. Sbarbati, S. Sozzani, L. Bambara, M. A. Cassatella, *Blood* **2005**, 105, 830.
- [227] F. Ethuin, B. Gerard, J. E. Benna, A. Boutten, M. A. Gougereot-Pocidallo, L. Jacob, S. Chollet-Martin, *Laboratory Investigation* **2004**, 84, 1363.
- [228] Salem, II, D. L. Flasher, N. Duzgunes, in *Liposomes, Pt E, Vol. 391* (Ed.: N. Duzgunes), **2005**, pp. 261.
- [229] A. R. Bender, H. vonBriesen, J. Kreuter, I. B. Duncan, H. RubsamenWaigmann, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, 40, 1467.
- [230] R. Loebenberg, L. Araujo, H. Von Briesen, E. Rodgers, J. Kreuter, *Journal of Controlled Release* **1998**, 50, 21.
- [231] H. Hillaireau, T. Le Doan, M. Appel, P. Couvreur, *Journal of Controlled Release* **2006**, 116, 346.
- [232] A. S. Nowacek, S. Balkundi, J. McMillan, U. Roy, A. Martinez-Skinner, R. L. Mosley, G. Kanmogne, A. V. Kabanov, T. Bronich, H. E. Gendelman, *Journal of Controlled Release* **2011**, 150, 204.
- [233] L. M. Coussens, Z. Werb, *Nature* **2002**, 420, 860.
- [234] D. Roos, S. K. A. Law, *Blood Cells Molecules and Diseases* **2001**, 27, 1000.
- [235] R. Alon, A. Etzioni, *Trends in Immunology* **2003**, 24, 561.
- [236] M. Luisetti, C. Sturani, D. Sella, E. Madonini, V. Galavotti, G. Bruno, V. Peona, U. Kucich, G. Dagnino, J. Rosenbloom, B. Starcher, *European Respiratory Journal* **1996**, 9, 1482.
- [237] P. Sapra, T. M. Allen, *Cancer Research* **2002**, 62, 7190.
- [238] L. Vroman, A. L. Adams, G. C. Fischer, P. C. Munoz, *Blood* **1980**, 55, 156.
- [239] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, 2050.
- [240] I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse, K. A. Dawson, *Advances in Colloid and Interface Science* **2007**, 134-135, 167.
- [241] W. Norde, C. E. Giacomelli, *Journal of Biotechnology* **2000**, 79, 259.
- [242] C. Rocker, M. Potzl, F. Zhang, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *Nat Nano* **2009**, 4, 577.
- [243] A. Gessner, A. Lieske, B. R. Paulke, R. H. Muller, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, 65A, 319.
- [244] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, S. Seal, *Biomaterials* **2007**, 28, 4600.
- [245] P. Maffre, K. Nienhaus, F. Amin, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2011**, 2, 374.

- [246] A. Salvati, *International Conference on "Biological Responses to Nanoscale Particles" SPP1313* **2011**, *Impact of Nanoparticles Accumulating in the Lysosomes*
- [247] C. Wilhelm, C. Billotey, J. Roger, J. N. Pons, J. C. Bacri, F. Gazeau, *Biomaterials* **2003**, *24*, 1001.
- [248] X. Jiang, S. Weise, M. Hafner, C. Roecker, F. Zhang, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *Journal of the Royal Society Interface* **2010**, *7*, S5.
- [249] M. Rahman, *Vol. Introduction to Flow Cytometry* (Ed.: A. Serotec), **2006**.
- [250] E. J. Modest, S. K. Sengupta, *Cancer Chemotherapy Reports Part 1* **1974**, *58*, 35.
- [251] I. Schmid, W. J. Krall, C. H. Uittenbogaart, J. Braun, J. V. Giorgi, *Cytometry* **1992**, *13*, 204.
- [252] I. Schmid, C. H. Uittenbogaart, B. Keld, J. V. Giorgi, *Journal of Immunological Methods* **1994**, *170*, 145.
- [253] H. M. Saphiro, *Practical Flow Cytometry*, 4 ed., Wiley-Liss, **2003**.
- [254] O. D. Perez, G. P. Nolan, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 155.
- [255] S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch, H. Heinz, *Die konfokale Laserscanning Mikroskopie - Mikroskopie von Carl Zeiss*, **2009**.
- [256] K. L. Hazelwood, S. G. Olenych, J. D. Griffin, C. S. Murphy, C. J.A., M. W. Davidson, <http://digitalimagingu.com/articles/microscopyimaging2.html>, **2011**.
- [257] N. J. Philpott, A. J. C. Turner, J. Scopes, M. Westby, J. C. W. Marsh, E. C. GordonSmith, A. G. Dalgleish, F. M. Gibson, *Blood* **1996**, *87*, 2244.
- [258] M. J. Pollitt, G. Buckton, S. Brocchini, H. O. Alpar, *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, *298*, 333.
- [259] G. O. Gey, W. D. Coffman, M. T. Kubicek, *Cancer Research* **1952**, *12*, 264.
- [260] D. Baksh, L. Song, R. S. Tuan, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2004**, *8*, 301.
- [261] U. Schneider, H. U. Schwenk, G. Bornkamm, *International Journal of Cancer* **1977**, *19*, 621.
- [262] K. Eisele, R. Gropeanu, A. Musante, G. Glasser, C. Li, K. Muellen, T. Weil, *Macromolecular Rapid Communications* **2010**, *31*, 1501.
- [263] A. S. Levenson, V. C. Jordan, *Cancer Research* **1997**, *57*, 3071.
- [264] N. B. Javitt, *Faseb Journal* **1990**, *4*, 161.
- [265] L. Bonaccorsi, M. Muratori, V. Carloni, S. Zecchi, L. Formigli, G. Forti, E. Baldi, *International Journal of Andrology* **2003**, *26*, 21.
- [266] M. E. Kaighn, K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, L. W. Jones, *Investigative Urology* **1979**, *17*, 16.
- [267] A. Pinzon-Charry, T. Maxwell, J. A. Lopez, *Immunology and Cell Biology* **2005**, *83*, 451.
- [268] P. J. Tacken, I. J. M. de Vries, R. Torensma, C. G. Figdor, *Nature Reviews Immunology* **2007**, *7*, 790.
- [269] Fachinformation, *Abraxis BioScience Limited Abraxane 5 mg/mL* **2010**.
- [270] V. Mailaender, M. R. Lorenz, V. Holzapfel, A. Musyanovych, K. Fuchs, M. Wiesneth, P. Walther, K. Landfester, H. Schrezenmeier, *Molecular Imaging and Biology* **2008**, *10*, 138.
- [271] M. S. Ehrenberg, A. E. Friedman, J. N. Finkelstein, G. Oberdoerster, J. L. McGrath, *Biomaterials* **2009**, *30*, 603.
- [272] Q. He, J. Zhang, J. Shi, Z. Zhu, L. Zhang, W. Bu, L. Guo, Y. chen, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1085.
- [273] Z. J. Deng, G. Mortimer, T. Schiller, A. Musumeci, D. Martin, R. F. Minchin, *Nanotechnology* **2009**, *20*.
- [274] D. Labarre, C. Vauthier, C. Chauvierre, B. Petri, R. Muller, M. M. Chehimi, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5075.

- [275] E. Allémann, J.-C. Leroux, R. Gurny, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *34*, 171.
- [276] X. Jiang, J. Dausend, M. Hafner, A. Musyanovych, C. Röcker, K. Landfester, V. Mailänder, G. U. Nienhaus, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 748.
- [277] P. H. Carter, S. Restoruz, G. C. Washington, S. Ethridge, A. Palini, R. Vogt, M. Waxdal, T. Fleisher, P. D. Noguchi, G. E. Marti, *Cytometry* **1992**, *13*, 68.
- [278] W. R. Drobyski, C. A. Keever, M. S. Roth, S. Koethe, G. Hanson, P. McFadden, J. L. Gottschall, R. C. Ash, P. Vantuinen, M. M. Horowitz, N. Flomenberg, *Blood* **1993**, *82*, 2310.
- [279] S. Narayanan, *American Journal of Clinical Pathology* **2000**, *113*, 429.
- [280] S. Narayanan, *Laboratoriums Medizin* **2003**, *27*, 243.
- [281] C. S. Engstad, T. J. Gutteberg, B. Osterud, *Thrombosis and Haemostasis* **1997**, *77*, 690.
- [282] C. W. Taylor, L. M. Broad, *Trends in Pharmacological Sciences* **1998**, *19*, 370.
- [283] M. E. E. Jaconi, D. P. Lew, J. L. Carpentier, K. E. Magnusson, M. Sjogren, O. Stendahl, *Journal of Cell Biology* **1990**, *110*, 1555.
- [284] Y. Baba, T. Kurosaki, *Immunological Reviews* **2009**, *231*, 174.
- [285] P. Nunes, N. Demaux, *Journal of Leukocyte Biology* **2010**, *88*, 57.
- [286] R. J. T. Ducusin, Y. Uzuka, E. Satoh, M. Otani, M. Nishimura, S. Tanabe, T. Sarashina, *Research in Veterinary Science* **2003**, *75*, 27.
- [287] R. J. T. Ducusin, T. Sarashina, Y. Uzuka, S. Tanabe, M. Ohtani, *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* **2001**, *65*, 38.
- [288] R. H. Bohmer, L. S. Trinkle, J. L. Staneck, *Cytometry* **1992**, *13*, 525.
- [289] O. Lunov, V. Zablotskii, T. Syrovets, C. Röcker, K. Tron, G. U. Nienhaus, T. Simmet, *Biomaterials* **2011**, *32*, 547.
- [290] Z. Panagi, A. Beletsi, G. Evangelatos, E. Livaniou, D. S. Ithakissios, K. Avgoustakis, *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, *221*, 143.
- [291] J. T. Bourne, W. J. Raynor, J. V. Jones, *Clinical and Experimental Immunology* **1983**, *51*, 69.
- [292] V. Olivier, C. Riviere, M. Hindie, J. L. Duval, G. Bomila-Koradjim, M. D. Nagel, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2004**, *33*, 23.
- [293] A. S. Zahr, C. A. Davis, M. V. Pishko, *Langmuir* **2006**, *22*, 8178.
- [294] A. M. Javier, O. Kreft, A. P. Alberola, C. Kirchner, B. Zebli, A. S. Susha, E. Horn, S. Kempter, A. G. Skirtach, A. L. Rogach, J. Radler, G. B. Sukhorukov, M. Benoit, W. J. Parak, *Small* **2006**, *2*, 394.
- [295] A. Gessner, A. Lieske, B. R. Paulke, R. H. Muller, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2002**, *54*, 165.
- [296] K. Ogawara, K. Furumoto, S. Nagayama, K. Minato, K. Higaki, T. Kai, T. Kimura, *Journal of Controlled Release* **2004**, *100*, 451.
- [297] DSMZ, in *Leibnitz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*, HELA **2011**.
- [298] M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggård, M. B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia, K. Dawson, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7503.
- [299] I. Lynch, K. A. Dawson, *Nano Today* **2008**, *3*, 40.
- [300] Fachinformation, Myocet, *Cephalon Europe* **2011**.
- [301] Y. Chen, H. Chen, D. Zeng, Y. Tian, F. Chen, J. Feng, J. Shi, *ACS Nano* **2010**, *4*, 6001.
- [302] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *385*, 113.
- [303] D. Ren, F. Kratz, S.-W. Wang, *Small* **2011**, *7*, 1051.
- [304] R. Stern, *Hyaluronan in cancer biology*, Academic Press - Elsevier, **2009**.

- [305] B. P. Toole, G. Jackson, J. Gross, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1972**, *69*, 1384.
- [306] M. Brecht, U. Mayer, E. Schlosser, P. Prehm, *Biochem. J.* **1986**, *239*, 445.
- [307] N. Mian, *Biochemical Journal* **1986**, *237*, 333.
- [308] E. A. Turley, P. Bowman, M. A. Kytryk, *Journal of Cell Science* **1985**, *78*, 133.
- [309] E. A. Turley, J. Torrance, *Experimental Cell Research* **1985**, *161*, 17.
- [310] N. Itano, F. Atsumi, T. Sawai, Y. Yamada, O. Miyaishi, T. Senga, M. Hamaguchi, K. Kimata, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 3609.
- [311] B. P. Toole, V. C. Hascall, *American Journal of Pathology* **2002**, *161*, 745.
- [312] R. Stern, *Pathologie Biologie* **2005**, *53*, 372.
- [313] B. P. Toole, *Nature Reviews Cancer* **2004**, *4*, 528.
- [314] A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, B. Seed, *Cell* **1990**, *61*, 1303.
- [315] Q. Yu, I. Stamenkovic, *Genes & Development* **1999**, *13*, 35.
- [316] J. Greiner, M. Schmitt, L. Li, K. Giannopoulos, K. Bosch, A. Schmitt, K. Dohner, R. F. Schlenk, J. R. Pollack, H. Dohner, L. Bullinger, *Blood* **2006**, *108*, 4109.
- [317] J. Greiner, H. Dohner, M. Schmitt, *Haematologica-the Hematology Journal* **2006**, *91*, 1653.
- [318] M. Schmitt, A. Schmitt, M. T. Rojewski, J. Chen, K. Giannopoulos, F. Fei, Y. Yu, M. Goetz, M. Heyduk, G. Ritter, D. E. Speiser, S. Gnjatic, P. Guillaume, M. Ringhoffer, R. F. Schlenk, P. Liebisch, D. Bunjes, H. Shiku, H. Dohner, J. Greiner, *Blood* **2008**, *111*, 1357.
- [319] Z. Markovic-Housley, G. Miglierini, L. Soldatova, P. J. Rizkallah, U. Muller, T. Schirmer, *Structure* **2000**, *8*, 1025.
- [320] S. Nagaraju, Y. H. Mahadeswaraswamy, K. S. Girish, K. Kemparaju, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **2006**, *144*, 1.
- [321] A. Jacobson, M. Rahmanian, K. Rubin, P. Heldin, *International Journal of Cancer* **2002**, *102*, 212.
- [322] V. B. Lokeshwar, M. J. Young, G. Goudarzi, N. Iida, A. I. Yudin, G. N. Cherr, M. G. Selzer, *Cancer Research* **1999**, *59*, 4464.
- [323] M. A. Simpson, J. Reiland, S. R. Burger, L. T. Furcht, A. P. Spicer, T. R. Oegema, J. B. McCarthy, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 17949.
- [324] W. R. Xu, X. R. Zhang, H. Qian, W. Zhu, X. C. Sun, J. Hu, H. Zhou, Y. C. Chen, *Experimental Biology and Medicine* **2004**, *229*, 623.
- [325] C. Campagnoli, I. A. G. Roberts, S. Kumar, P. R. Bennett, I. Bellantuono, N. M. Fisk, *Blood* **2001**, *98*, 2396.
- [326] Fachinformation, *B.Braun Heparin-Natrium Braun "Multi" 10 000 I.E./ml Injektionslösung* **2008**.
- [327] Y. Wang, Y. Q. Wang, J. N. Xiang, K. T. Yao, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3531.
- [328] I. Capila, R. J. Linhardt, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 426.
- [329] L. Borsig, R. Wong, J. Feramisco, D. R. Nadeau, N. M. Varki, A. Varki, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 3352.
- [330] K. T. Lappegård, M. Fung, G. Bergseth, J. Riesenfeld, J. D. Lambris, V. Videm, T. E. Mollnes, *The Annals of Thoracic Surgery* **2004**, *77*, 932.
- [331] F. Maillet, M. D. Kazatchkine, D. Glotz, E. Fischer, M. Rowe, *Molecular Immunology* **1983**, *20*, 1401.
- [332] N. Jaulin, M. Appel, C. Passirani, G. Barratt, D. Labarre, *Journal of Drug Targeting* **2000**, *8*, 165.
- [333] C. Passirani, G. Barratt, J.-P. Devissaguet, D. Labarre, *Pharmaceutical Research* **1998**, *15*, 1046.

- [334] M. Socha, P. Bartecki, C. Passirani, A. Sapin, C. Damgé, T. Lecompte, J. Barré, F. E. Ghazouani, P. Maincent, *Journal of Drug Targeting* **2009**, *17*, 575.
- [335] Y.-I. Chung, J. C. Kim, Y. H. Kim, G. Tae, S.-Y. Lee, K. Kim, I. C. Kwon, *Journal of Controlled Release* **2010**, *143*, 374.
- [336] CLS, in *CLS - Cell lines service*, Hep G2, **2011**.
- [337] DSMZ, in *Leibnitz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen MCF-7*, **2011**.
- [338] Z. Zhang, J. Jia, Y. Lai, Y. Ma, J. Weng, L. Sun, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 5528.
- [339] G. Baier, A. Musyanovych, M. Dass, S. Theisinger, K. Landfester, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 960.
- [340] J. Devy, E. Balasse, H. Kaplan, C. Madoulet, M. C. Andry, *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *307*, 194.
- [341] P. Zhang, Z. Zhang, Y. Yang, Y. Li, *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *392*, 241.
- [342] A. J. Newton, T. Kirchhausen, V. N. Murthy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 17955.
- [343] B. Zhang, Y. Li, C.-Y. Fang, C.-C. Chang, C.-S. Chen, Y.-Y. Chen, H.-C. Chang, *Small* **2009**, *5*, 2716.
- [344] I. Hayashi, K.-J. Sohn, J. M. Stempak, R. Croxford, Y.-I. Kim, *Journal of Nutrition* **2007**, *137*, 607.
- [345] J. M. Rosenholm, A. Meinander, E. Peuhu, R. Niemi, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Linden, *ACS Nano* **2009**, *3*, 197.
- [346] S. Tavares, J. Sousa, P. Gonçalves, J. R. Araújo, F. Martel, *European Journal of Pharmacology* **2010**, *640*, 29.
- [347] S. E. Steinberg, S. Fonda, C. L. Campbell, R. S. Hillman, *Journal of Cellular Physiology* **1983**, *114*, 252.
- [348] S. Dharmawardhane, A. Schurmann, M. A. Sells, J. Chernoff, S. L. Schmid, G. M. Bokoch, *Molecular Biology of the Cell* **2000**, *11*, 3341.
- [349] B. A. Kamen, A. Capdevila, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 5983.
- [350] C. M. Paulos, J. A. Reddy, C. P. Leamon, M. J. Turk, P. S. Low, *Molecular Pharmacology* **2004**, *66*, 1406.
- [351] R. J. Lee, S. Wang, P. S. Low, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1996**, *1312*, 237.
- [352] K. G. Rothberg, Y. S. Ying, J. F. Kolhouse, B. A. Kamen, R. G. W. Anderson, *Journal of Cell Biology* **1990**, *110*, 637.
- [353] S. Mayor, K. G. Rothberg, F. R. Maxfield, *Science* **1994**, *264*, 1948.
- [354] C. Le Roy, J. L. Wrana, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2005**, *6*, 112.
- [355] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569.
- [356] S. Chatterjee, E. R. Smith, K. Hanada, V. L. Stevens, S. Mayor, *Embo Journal* **2001**, *20*, 1583.
- [357] S. Mayor, S. Sabharanjak, F. R. Maxfield, *Embo Journal* **1998**, *17*, 4626.
- [358] J. Yang, H. T. Chen, I. R. Vlahov, J. X. Cheng, P. S. Low, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2007**, *321*, 462.
- [359] S. Gelperina, O. Maksimenko, A. Khalansky, L. Vanchugova, E. Shipulo, K. Abbasova, R. Berdiev, S. Wohlfart, N. Chepurnova, J. Kreuter, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2010**, *74*, 157.
- [360] W. J. Bailey, Z. Ni, S. R. Wu, *Macromolecules* **1982**, *15*, 711.
- [361] H. Wickel, S. Agarwal, *Macromolecules* **2003**, *36*, 6152.

- [362] S. Agarwal, L. Ren, T. Kissel, N. Bege, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, *211*, 905.
- [363] J. F. Lutz, J. Andrieu, S. Uzun, C. Rudolph, S. Agarwal, *Macromolecules* **2007**, *40*, 8540.
- [364] D. J. Siegwart, S. A. Bencherif, A. Srinivasan, J. O. Hollinger, K. Matyjaszewski, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008**, *87A*, 345.
- [365] Y. Dong, S.-S. Feng, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4154.
- [366] J. Wang, W. Liu, Q. Tu, J. Wang, N. Song, Y. Zhang, N. Nie, J. Wang, *Biomacromolecules* **2010**, *12*, 228.
- [367] W. Spencer, H. Kwon, P. Crepieux, N. Leclerc, R. T. Lin, J. Hiscott, *Oncogene* **1999**, *18*, 495.
- [368] D. A. Fuchs, R. K. Johnson, *Cancer Treatment Reports* **1978**, *62*, 1219.
- [369] M. T. Huizing, V. H. S. Misser, R. C. Pieters, W. W. T. Huinink, C. H. N. Veenhof, J. B. Vermorken, H. M. Pinedo, J. H. Beijnen, *Cancer Investigation* **1995**, *13*, 381.
- [370] A. Sparreboom, L. van Zuylen, E. Brouwer, W. J. Loos, P. de Bruijn, H. Gelderblom, M. Pillay, K. Nooter, G. Stoter, J. Verweij, *Cancer Research* **1999**, *59*, 1454.
- [371] O. v. Tellingen, M. T. Huizing, V. R. N. Panday, J. H. M. Schellens, W. J. Nooijen, J. H. Beijnen, *Br J Cancer* **1999**, *81*, 330.
- [372] J. Liebmann, J. A. Cook, J. B. Mitchell, *Lancet* **1993**, *342*, 1428.
- [373] Q. Fu, J. Sun, W. P. Zhang, X. F. Sui, Z. T. Yan, Z. G. He, *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* **2009**, *4*, 262.
- [374] P. Zhao, H. Wang, M. Yu, S. Cao, F. Zhang, J. Chang, R. Niu, *Pharmaceutical Research* **2010**, *27*, 1914.
- [375] L. Zhao, S.-S. Feng, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *99*, 3552.
- [376] A. S. Zahr, M. V. Pishko, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2004.
- [377] K. Paal, J. Muller, L. Hegedus, *European Journal of Biochemistry* **2001**, *268*, 2187.
- [378] M. S. Apro, G. Von Minckwitz, *Ejc Supplements* **2008**, *6*, 3.
- [379] N. Desai, V. Trieu, Z. W. Yao, L. Louie, S. Ci, A. Yang, C. L. Tao, T. De, B. Beals, D. Dykes, P. Noker, R. Yao, E. Labao, M. Hawkins, P. Soon-Shiong, *Clinical Cancer Research* **2006**, *12*, 1317.
- [380] N. Desai, V. Trieu, B. Damascelli, P. Soon-Shiong, *Translational Oncology* **2009**, *2*, 59.
- [381] J. M. Siebert, D. Baumann, A. Zeller, V. Mailänder, K. Landfester, *Macromolecular Bioscience* **2011**, *12*, 165.
- [382] P. Range, R. E. Unger, J. B. Oltrogge, D. Zenker, D. Begley, J. Kreuter, H. von Briesen, *European Journal of Neuroscience* **2000**, *12*, 1931.
- [383] S. W. Hell, J. Wichmann, *Optics Letters* **1994**, *19*, 780.
- [384] J. Dausend, *Dissertation, Universität Ulm* **2009**, *Aufnahmemechanismus und Wirkung chemotherapeutisch beladener Miniemulsions-Nanopartikel in Tumorzellen*
- [385] T. K. Yeung, C. Germond, X. M. Chen, Z. X. Wang, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, *263*, 398.

9. Danksagung

10. Lebenslauf

11. Publikationen

11.1 Veröffentlichungen

O. Zupke, E. Distler, D. Baumann, D. Strand, R.G. Meyer, K. Landfester, W. Herr, V. Mailänder,

Preservation of dendritic cell function upon labeling with amino functionalized polymeric nanoparticles

2010, Biomaterials, 31, 27, 7086-7095

G. Baier, A. Zeller, C. Costa, D. Baumann, C. Sayer, P.H. Araujo, V. Mailänder, A. Musyanovych, K. Landfester

BSA Adsorption on Differently Charged Polystyrene Nanoparticles using Isothermal Titration Calorimetry and the Influence on Cellular Uptake

2011, Macromolecular Bioscience, 11, 5, 628-638

J.M. Siebert, D. Baumann, A. Zeller, V. Mailänder, K. Landfester

Synthesis of Polyester Nanoparticles in Miniemulsion Obtained by Radical Ring-Opening of BMDO and Their Potential as Biodegradable Drug Carriers

2011, Macromolecular Bioscience, DOI: 10.1002/mabi.201100236

D. Baumann; K. Landfester, V. Mailänder

Complex Encounters: Nanoparticles in whole blood and their uptake into different types of blood cells

eingereicht Dezember 2011, Nanomedicine

G. Baier, D. Baumann, J.M. Siebert, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester

Cell line specific targeting of folic acid functionalized hydroxyethyl starch nanocapsules
in Vorbereitung

11.2 Poster

S. Lorenz, A. Ziegler, D. Baumann, A. Musyanovych, K. Landfester, V. Mailänder
Interaction of stem cells with functionalized nanoparticles for drug delivery in hard tissue
implantation
MPI-P interner Workshop
Mai 2008, Naurod, Germany

S. Lorenz, D. Baumann, I. Brüstle, A. Ziegler, A. Musyanovych, A. Tauzenberger, K.
Landfester, V. Mailänder
Interaction of stem cells with functionalized nanoparticles for drug delivery
25-Jahre Max Planck Institut für Polymerforschung
Juni 2009, Mainz, Germany

I. Brüstle, S. Lerch, A. Höcherl, S. Lorenz, D. Baumann, M. Dröge, J.M. Cramer, V.
Mailänder, K. Landfester
Evaluating Nanomaterials for Biomedical Applications - The cell culture lab
MPI-P interne Poster-Präsentation "Meet your colleague"
September 2010, Mainz, Germany

G. Baier, D. Baumann, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester
*Encapsulation of different biomolecules in biodegradable nanocapsules and their cellular
uptake in different cells*
Polymers in Medicine and Biology
September 2011, Santa Rosa, USA

D. Baumann, D. Hofmann, V. Mailänder, K. Landfester
Nanoparticles in whole blood: a versatile screening platform
International Conference on "Biological Responses to Nanoscale Particles", DFG, SPP1313
September 2011, Essen, Germany

12. Erklärung

Diese Dissertation wurde in der Zeit vom 01.03.2008 – 31.08.2008 am Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm gGmbH (IKT Ulm) und der Abteilung Organische Chemie III der Universität Ulm und vom 01.09.2008 – 30.06.2011 im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung in Mainz erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn gemäß anderen Arbeiten entnommen wurden, sind durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Mainz, den 28.02.2012

(Daniela Kathrin Baumann)