

Aus dem Zentrum für Pharmakologie und Toxikologie
Institut für Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Drewelow

**Untersuchungen zur Pharmako- und Toxikodynamik von
nanopartikulären Metalloxiden sowie Sirolimus-beladenen
Nanopartikeln am Modell des humanen Phagozyten**



Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinwissenschaften

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:
Dipl.-Pharm. Sandra Möller
aus Rostock

Rostock, 13. September 2012

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Drewelow

Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Jochen Schubert

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Universität Rostock

3. Gutachter:

PD Dr. Marion Hippius

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Jena

Datum der Einreichung: 13. September 2012

Datum der Verteidigung: 14. Mai 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	5
1 Einleitung	6
1.1 Nanopartikel	6
1.2 Nanopartikel und menschlicher Organismus	8
1.3 Risikobewertung der Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit dem Organismus.....	10
1.4 Neutrophile Granulozyten.....	12
1.5 Charakterisierung von Nanopartikeln.....	15
2 Fragestellung	16
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Material.....	17
3.1.1 Nanopartikel	17
3.2 Methoden.....	17
3.2.1 Bestimmung des Partikeldurchmessers und der -konzentration... ..	17
3.2.2 Phagozytengewinnung und Inkubation.....	19
3.2.3 Bestimmung der Partikelanreicherung in PMN.....	20
3.2.4 Bestimmung der physiologische Funktionen der PMN	22
3.3 Statistische Analyse.....	27
4 Ergebnisse	28
4.1 Methodenentwicklung	28
4.2 Charakterisierung der Nanopartikel	28
4.3 Pharmako-/Toxikodynamik der NP	32
4.3.1 Resovist® (cFeO-NP) und Referenzsubstanzen (uFeO-NP, uZnO-NP)	32
4.3.2 Sirolimus-PLA-NP und Referenzsubstanzen (SRL, PLA-NP).....	41

5	Diskussion.....	45
5.1	Messungen mit NanoSight LM10.....	45
5.2	Resovist®	47
5.2.1	NTA-Messung.....	48
5.2.2	Effekte und Wirkungen	49
5.2.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung	52
5.3	SRL-PLA-NP	53
5.3.1	NTA-Messung.....	54
5.3.2	Erfassung der Inkorporation von NP in PMN	54
5.3.3	Effekte und Wirkungen	57
5.3.4	Dosis-Wirkungs-Beziehung	59
5.4	Schlussfolgerung	59
6	Zusammenfassung	62
7	Literaturverzeichnis.....	64
8	Abbildungs-, Tabellen- und Gleichungsverzeichnis.....	76
8.1	Abbildungen.....	76
8.2	Tabellen.....	77
8.3	Gleichungen	77
9	Anhang	78
9.1	Selbständigkeitserklärung.....	78
9.2	Danksagung	79
9.3	Publikationsliste	80
9.4	Tagungsbeiträge.....	81

Abkürzungen

cFeO	Carboxydextran-ummantelte Eisen(II,III)-oxid-Nanopartikel (Resovist®)
CI	chemotaktischer Index
DDS	„Drug-Delivery“-System
DHR	Dihydrorhodamin
DMR	Desmethoxyrapamycin
EM	Elektronenmikroskopie
FACS	„fluorescence activated cell sorting“ (Durchflusszytometer)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
IL	Interleukin
LC-MS-MS	„liquid chromatography-tandem mass spectrometry“
LI	Lokomotionsindex
MI	Migrationsindex
MRT	Magnetresonanztomographie
NP	Nanopartikel
NTA	„nanoparticle tracking analysis“
PBS	„phosphat buffered saline“
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PE	Phycoerythrin
PLA	Poly(D,L-Milchsäure)
PMA	Phorbolmyristacetat
PMN	polymorphnukleäre Neutrophile
RT	Raumtemperatur
SRL	Sirolimus
uFeO	nicht ummantelte („uncoated“) Eisen(II,III)-oxid-Nanopartikel
uZnO	nicht ummantelte („uncoated“) Zink(II)-oxid-Nanopartikel
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Nanopartikel

Aktuell finden sich vielfältige Produkte im alltäglichen Gebrauch, die mit dem Inhalt von Nanopartikeln werben. Beispielsweise sind Nanomaterialien u.a. in Kosmetika zur Verbesserung des Transportes aktiver Inhaltsstoffe, in Zahnpasten zur Unterstützung des natürlichen Zahnreparaturmechanismus des Speichels, als UV-Filter in Sonnenschutzcremes, in Farben und Lacken, die UV-Strahlen absorbieren sowie als Rieselhilfe, Verdickungs- oder Flockungsmittel in Nahrungsmitteln enthalten [1-5]. Dabei ist für den Verbraucher jedoch nicht ersichtlich, ob die Produkte wirklich NP enthalten, da Nanoprodukte bisher keiner Kennzeichnungs- oder Registrierpflicht unterliegen [3, 6].

Nanopartikel (NP) sind Strukturen mit einer Dimension im Nanometerbereich. Streng definiert, sollte der Durchmesser der Partikel unterhalb von 100 nm liegen, jedoch werden im Bereich der „Drug-Delivery“-Systeme (DDS) teilweise auch Teilchen mit bis zu 1000 nm Durchmesser als NP bezeichnet [7, 8]. Die sehr kleine Dimension nanopartikulärer Substanzen bedingt eine Vielzahl physikalischer und chemischer Besonderheiten. So weichen z.B. die Reaktivität, Leitfähigkeit und optische Sensitivität beträchtlich von Partikeln in μm -Größe ab. Dies liegt in dem veränderten Verhältnis von Oberflächenatomen zu Volumenatomen begründet [2, 4, 5, 9-12].

Auch im medizinischen bzw. pharmazeutischen Bereich bergen ihre besonderen Eigenschaften Hoffnungen und Perspektiven für eine Vielzahl von Produktneu- bzw. -weiterentwicklungen. So haben einige nanopartikuläre Anwendungen bereits Einzug in die medizinische Forschung gehalten [5, 13]. Momentan werden NP als Diagnostika, „Drug-Delivery“-Systeme (DDS) für einen verbesserten Arzneistofftransport zum Wirkort sowie als Therapeutika genutzt bzw. erforscht.

Ein bereits in der Diagnostik eingesetztes nanopartikuläres Arzneimittel ist das Magnetresonanzkontrastmittel Resovist[®], welches zur Darstellung fokaler Leberläsionen genutzt wird. Es enthält Eisen(II,III)-oxid-NP (FeO), die zur Verbesserung der Verträglichkeit von einer Carboxydextran-Hülle umgeben sind [14].

Resovist® stellt ein gewebespezifisches Kontrastmittel dar. Durch die selektive Aufnahme in das mononukleäre phagozytierende System grenzt es das gesunde Lebergewebe besonders kontrastreich vom hepatischen Fremdgewebe ab. Der Kontrastmitteleffekt ist bereits bei sehr geringen Dosierungen zu erreichen und hält für mehrere Stunden an [15]. Der NP-Kern wird gelöst und dem körpereigenen Eisenpool zugeführt, so dass das nanopartikuläre Eisen auf physiologische Weise verwertet wird. Laut Hersteller gehen von Resovist® keine toxischen Wirkungen aus [14].

Ein weiteres medizinisches Anwendungsgebiet für NP stellen „Drug-Delivery“-Systeme (DDS) dar [13]. DDS sind Arzneistoff-Freisetzungssysteme, die den Wirkstoff zielgerichtet, d.h. in einer bestimmten Rate und an einem bestimmten Ort im Organismus freisetzen. Aufgrund des geringen Durchmessers von NP können sie hydrophile und lipophile Barrieren (z.B. Zellmembranen, Blut-Hirn-Schranke) überwinden und den Arzneistoff direkt zum Wirkort transportieren [5, 8, 10, 16, 17]. Bereits im Handel befindliche nanopartikuläre DDS umfassen liposomale Arzneistoffe, Polymer- und Makromolekül-Arzneistoff-Konjugate wie Amphotericin B- und Daunorubicin-Liposome (AmBisome®, DaunoXome®), Albumin-gebundenes Paclitaxel (Abraxane®) oder nanokristallines Fenofibrat (TriCor®) [18]. Daneben wird der Einsatz von nanopartikulären DDS auch zum Schutz vor In-Stent-Rostenosen und Transplantatabstoßungsreaktionen erforscht [19, 20]. Ein für diese Indikationen vielversprechender Arzneistoff stellt Sirolimus (SRL, Rapamycin) dar. SRL ist eine immunsuppressiv wirkende Substanz, die die Proliferation von T-Zellen hemmt und die T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion des Transplantates unterbindet. Im Speziellen hemmt SRL nicht die Synthese und Freisetzung von Zytokinen wie IL-2 und -6, sondern die Antwort der T-Zellen auf diese Zytokine [21-24]. Des Weiteren supprimiert SRL die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen [25, 26]. Um Langzeitschäden durch abgelagerte Trägermaterialien zu vermeiden, werden als nanopartikuläre Matrix biologisch abbaubare Substanzen bevorzugt. Da Poly(D,L-Milchsäure) (PLA) als biologisch verträgliches und abbaubares Polymer [27] bereits etabliert ist, werden SRL-beladene PLA-NP (SRL-PLA-NP) derzeit als pharmakotherapeutische Prophylaxe vor Transplantatabstoßungen bzw. In-Stent-Rostenosen untersucht [19, 20, 28].

Neben dem Einsatz von NP als Diagnostika und DDS wird ihre Nutzung zur lokalen Tumortherapie momentan in klinischen Studien getestet [2, 13, 29]. Dabei werden magnetische NP in den Tumor appliziert, die durch ein magnetisches Wechselfeld in Schwingung versetzt werden und so selektiv das Tumorgewebe erwärmen. Bei einer Erwärmung des Gewebes auf 42-46°C (Hyperthermie) wird die Wirkung einer gleichzeitig angewandten Strahlen- oder Chemotherapie verstärkt. Die zelleigene Reparatur der Strahlenschäden wird vermindert, so dass eine geringere Strahlendosis nötig ist, um die Zellstruktur zu schädigen. Des Weiteren steigert die Hyperthermie die Durchblutung des Tumors, so dass eine größere Menge Arzneistoff in die Tumorregion gelangt. Dadurch reagiert das Gewebe sensibler auf Chemotherapeutika. Werden Temperaturen über 46°C erreicht (Thermoablation), kommt ein zytotoxischer Effekt hinzu. Dies führt zu einer gezielten Zerstörung pathologisch veränderter Zellen und das Gewebe geht durch Nekrotisierung zugrunde. Die abgestorbenen Zellen werden anschließend vom Körper selbst auf natürlichem Wege abgebaut. Die freigesetzten NP werden entweder von umliegenden, noch intakten Tumorzellen aufgenommen oder ebenfalls von Makrophagen abtransportiert. Die nicht mehr benötigten NP werden in der Milz und der Leber gespeichert und dort in einem langsamen Prozess abgebaut und dem Körper für den Eisenstoffwechsel zur Verfügung gestellt [29, 30].

1.2 Nanopartikel und menschlicher Organismus

Trotz der rasanten Entwicklung und Herstellung nanopartikulärer Produkte ist bisher wenig über die Folgen der Exposition des Menschen und der Umwelt gegenüber Nanomaterialien bekannt [5]. Einen Überblick über mögliche bzw. bereits nachgewiesene Expositionswege ist in der **Abb. 1.1** dargestellt. NP können sich über verschiedene Applikationsorte durch Phagozytose, Endozytose, Diffusion oder transmembranäre Kanäle in Zellen und letztendlich in Organen anreichern, wobei neben der medizinischen Anwendung die drei Hauptexpositionswege über die Lunge, die Haut und das Verdauungssystem diskutiert werden [3, 5, 8, 10, 11, 16, 17, 31, 32]. Bisher am besten untersucht ist der Respirationstrakt, wobei die Partikelgröße eine entscheidende Rolle spielt. So dringen auch NP bis in die Lungenalveolen vor, von wo aus sie sich über Blut- und Lymphbahnen in verschiedenen Organen wie Leber, Milz, Nie-

ren, ZNS oder Herz anreichern können [5, 17]. Bei der dermalen Exposition von NP sind drei Routen denkbar, die intra- und interzelluläre sowie die follikuläre Penetration [17], wobei über die Tiefe des Eindringens und eventuelle Wechselwirkungen sehr kontrovers diskutiert wird [5, 10, 32-34]. Da die obere Hautschicht (Hornschicht, Stratum corneum) eine starke Barrierefunktion einnimmt, scheint eine Penetration von NP durch gesunde Haut unwahrscheinlich. Jedoch fehlen bislang Untersuchungen zur Applikation an Wunden, entzündeter und (sonnen-) verbrannter Haut sowie bei Personen mit Hautallergien. Hier wäre ein Eindringen in den Organismus denkbar, da die NP direkt mit Blut und/oder lebenden Zellen in Kontakt treten könnten [9]. Zur Exposition von NP über den Gastrointestinaltrakt gibt es bisher sehr wenige Untersuchungen, jedoch erscheint die Absorption ins Blut und Lymphsystem möglich [5, 17].

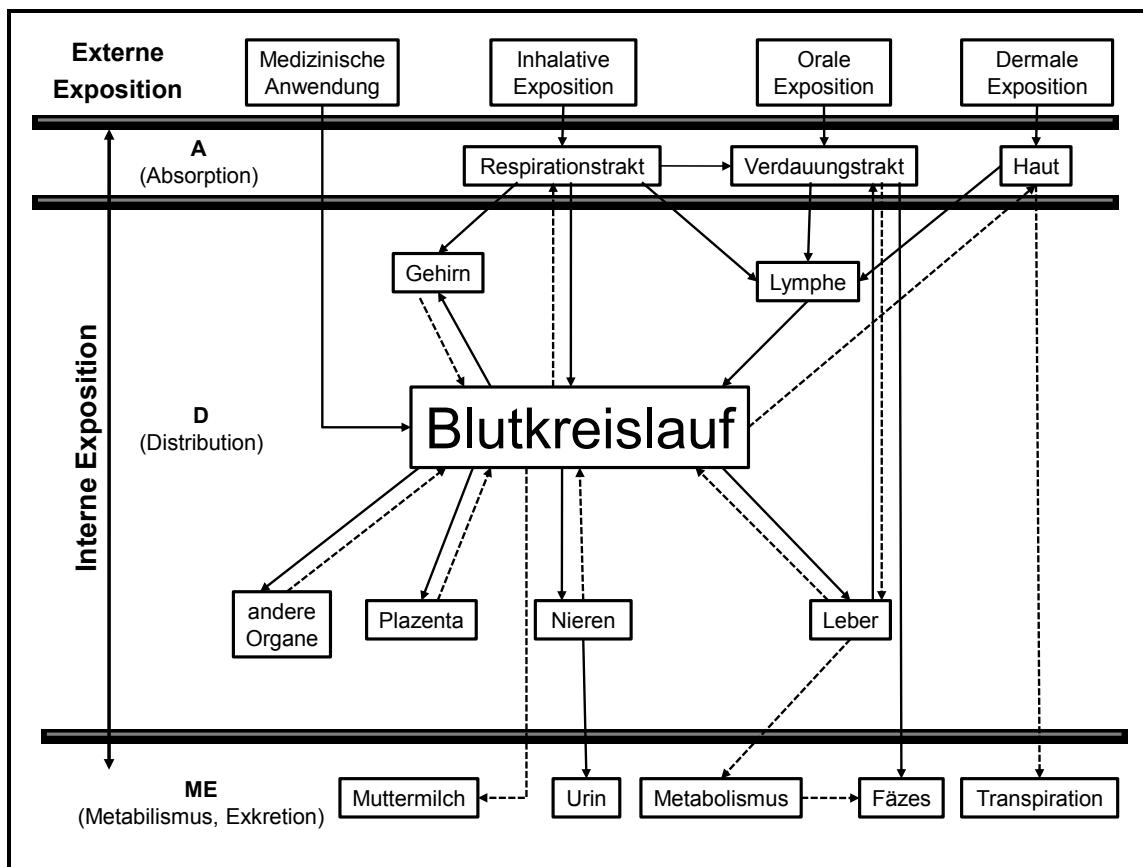


Abb. 1.1: Überblick über ADME-Prozesse (Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion) im Organismus nach HAGENS et al. [10]. Die durchgezogenen Linien stellen nachgewiesene Wege von NP dar, während die gestrichelten Linien hypothetische Wege repräsentieren. Die Transportraten und Retentionszeiten der aufgezeigten Prozesse sind weitgehend unbekannt.

Die Distribution der NP im Organismus wird durch die Partikeleigenschaften wie Größe, Hydrophilie/Hydrophobie, Polymerkonformation, Ladung und Zetapotential bestimmt. Große und/oder hydrophobe NP werden bevorzugt von Organen aufgenommen, die viele Makrophagen enthalten (z.B. Leber, Milz, Lungen, Knochenmark) [8, 35, 36]. Des Weiteren sind NP in der Lage, schwer überwindbare Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen, so dass eine Akkumulation im ZNS möglich ist [5, 8]. Ein weiterer Aspekt, der die Distribution nanopartikulärer Strukturen wesentlich beeinflusst, stellt die Wechselwirkung mit (Plasma-)Proteinen dar. Durch die Bindung von Proteinen an die NP-Oberfläche (Proteinkorona) kommt es zu Veränderungen der Partikeloberfläche sowie der Konformation der Proteine. Denkbare Folgen wären eine Anreicherung der Partikel in weiteren Organen („trojanisches Pferd“) sowie ein möglicher Funktionsverlust körpereigener Proteine [17, 37].

Ebenso wie über die Absorption und Distribution ist wenig über die Elimination nanopartikulärer Strukturen bekannt. Mögliche Exkretionswege sind über den Urin, Fäzes, Schweiß oder Muttermilch [10]. Biologisch schwer abbaubare NP akkumulieren besonders in den Entgiftungsorganen Leber und Nieren, wobei die Exkretion von NP über die Gallenflüssigkeit als extrem langsamer und ineffizienter Prozess beschrieben wird [38]. Dabei können Schädigungen der Leber und Nieren nicht ausgeschlossen werden [5, 8, 10, 17, 38-40].

Zurzeit sind keine quantitativen Aussagen zur relativen Bedeutung der einzelnen Aufnahmepfade möglich, jedoch ist erwiesen, dass NP über den Blutkreislauf in verschiedene Organe transportierbar sind [5, 10] und es zu Interaktionen mit Proteinen und Enzymen kommt, die die Distribution und Elimination der NP entscheidend beeinflussen können [4, 5, 10, 40].

1.3 Risikobewertung der Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit dem Organismus

Trotz der vielseitigen Perspektiven, die sich durch NP im medizinischen Bereich aufzeigen, bestehen auch Risiken und Gefahren, die gegenüber dem Nutzen abzuwegen sind. Bisherige Untersuchungen mit humanen Zellen wie Lungen- [41-43], Endothel- [44] und Nervenzellen [45, 46] sowie Monozyten [47] und

humanen Fibroblasten [48-50] zeigten, dass physiologische Zellfunktionen wie Proliferation, Phagozytose-Aktivität [50, 51] und Freisetzung von Zytokinen [44, 52] beeinflusst werden. Außerdem wurden eine Reduktion der Viabilität [42, 51], die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [42] und eine Induktion von Apoptose [47, 50] sowie eine Beeinträchtigung physiologischer Metabolisierungs- und Eliminationsmechanismen [38] beobachtet. Ferner werden Interaktionen von NP mit Enzymen der Atmungskette in den Mitochondrien diskutiert, infolge der es zu Störungen der Energieproduktion kommen kann. NP mit einem Durchmesser <30 nm sind in der Lage, in den Zellkern zu gelangen; NP <2 nm können sich in die DNA-Doppelhelix einlagern, wobei die Folgen unbekannt sind [4, 39]. Denkbare Auswirkungen von NP im menschlichen Organismus wären die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, Entzündungsreaktionen, Denaturierung von Proteinen, Membran- und DNA-Schädigungen, Immunreaktionen, Störungen der Blutgerinnung, Ablagerungen wie Plaques, Herzrhythmusstörungen, Störungen der Atemwege sowie Schädigungen an Magen, Leber, Herz, Bauchspeicheldrüse und Milz. Der Einfluss von NP aufs Immunsystem ist bisher unbekannt [4, 5, 11, 53, 54]. KANCHAN et al. nehmen an, dass μ m-große Partikel die humoralen Abwehrmechanismen stimulieren, während nanopartikuläre Teilchen (<1000 nm) die zelluläre Immunantwort begünstigen [55].

Um mögliche Gefährdungspotenziale für Mensch und Umwelt sowie ethische Fragestellungen zu bewerten und die Chancen mit den jeweiligen Risiken abzuwägen, fehlen immer noch Regulierungen, die sich speziell auf NP beziehen [5, 39, 56]. In den letzten Jahren starteten die Bundesregierung und EU-Kommission die Förderung einer Reihe von Forschungsprojekten im Bereich Nanotechnologie (z.B. NanoCare, NanoSafe), die erste Hinweise auf mögliche toxische Effekte von NP lieferten. Dabei wurden *In-vivo-* und *In-vitro*-Untersuchungen zur Abschätzung der NP-Toxizität genutzt. Es stellte sich heraus, dass beide Methodenarten zur Testung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Exposition von NP und der Entstehung von akuten bzw. chronischen Gesundheitsstörungen geeignet sind. Da *In-vivo*-Untersuchungen wie Tiermodelle kostenintensiv und langwierig sind sowie ethische Fragen aufwerfen, besteht ein erhöhter Bedarf an praktikableren Methoden – *in vitro* oder *ex vivo* – die eine leistungsfähige und zuverlässige Risikobewertung erlauben [5].

1.4 Neutrophile Granulozyten

Humane Granulozyten gehören neben den Monozyten und Lymphozyten zu den Leukozyten. Granulozyten werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit mit sauren oder basischen Farbstoffen in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten differenziert. Sie werden im Knochenmark produziert und sind mit einer Lebensspanne von 2 - 3 Tagen sehr kurzlebig.

Neutrophile Granulozyten (polymorphnukleäre Neutrophile, PMN) sind vor allem an der unspezifischen zellulären Abwehr beteiligt. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der primären Immunantwort und sind in die Elimination partikulärer Xenobiotika involviert [8, 36, 57-59]. Nach neuesten Untersuchungen sind apoptotische PMN in der Lage, Entzündungs- und Immunreaktionen zu modulieren [60]. Deshalb spielen neutrophile Granulozyten eine zentrale Rolle bei akuten Inflammationsprozessen. Durch chemotaktische Reize, die aus einem Entzündungsgebiet freigesetzt werden, werden PMN angelockt (Rolling), haften sich an Endothelzellen (Deformation & Adhäsion) und migrieren ins entzündete Gewebe (Migration) (**Abb. 1.2**).

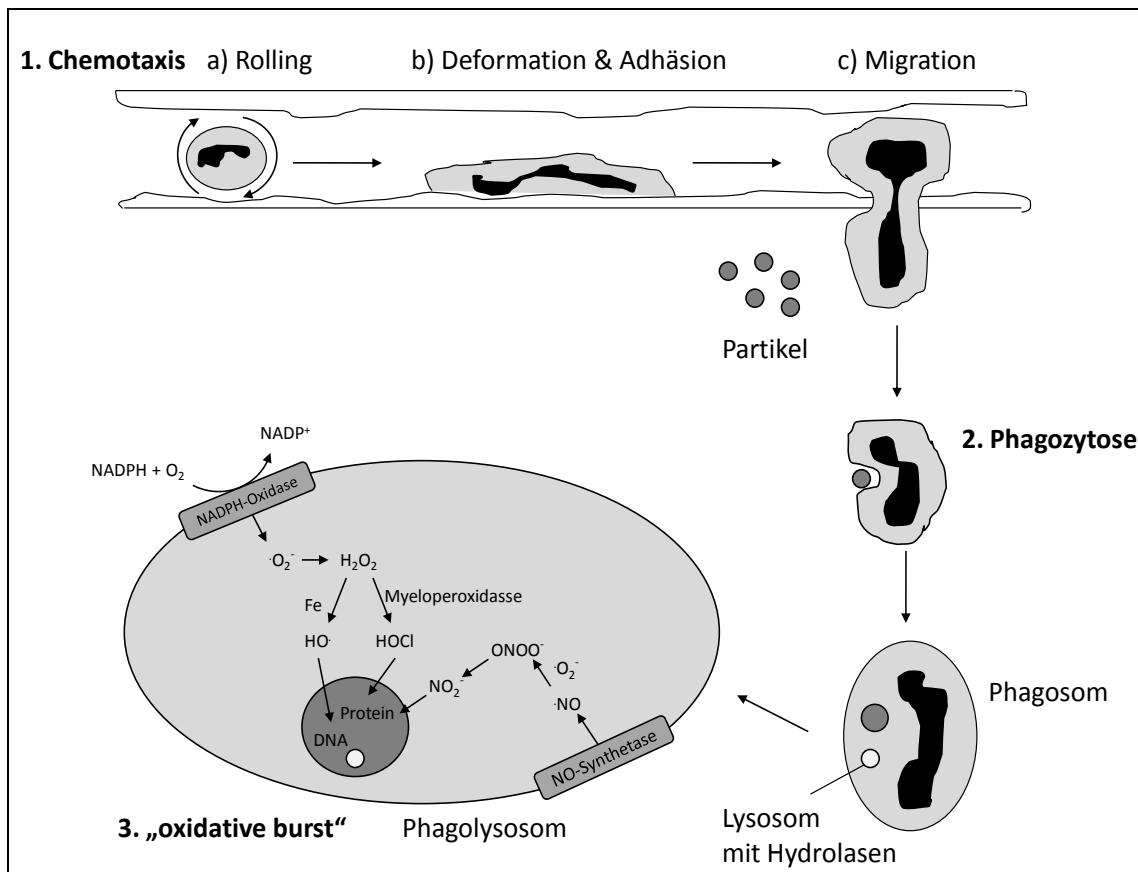


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Abwehrmechanismen der PMN gegenüber partikulärer Xenobiotika:

1. **Chemotaxis** mit Rolling, Deformation & Adhäsion und Migration,
2. **Phagozytose**,
3. „**oxidative burst**“ [57, 61].

Durch Einstülpung der Zellmembran nehmen PMN partikuläre Xenobiotika unter Bildung eines Phagosoms auf (Phagozytose). Die enzymhaltigen Lysosomen der Granulozyten verschmelzen mit dem Phagosome zum Phagolysosom, so dass die Enzyme direkt mit dem Xenobiotikum in Kontakt kommen. Durch Reduktion molekularen Sauerstoffs an der NADPH-Oxidase werden im Phagolysosom reaktive Sauerstoffspezies erzeugt. Das gebildete Wasserstoffperoxid lagert sich in einer Eisen-katalysierten Reaktion zum Hydroxylradikal um oder bildet mittels Myeloperoxidase Hypochlorsäure. Des Weiteren können im Phagolysosom mit Hilfe der Stickoxid-Synthetase reaktive Stickoxidverbindungen hergestellt werden. Die gebildeten Hydroxylradikale fragmentieren vorwiegend die DNA, während Hypochlorsäure und Stickoxidverbindungen hauptsächlich die Proteinfunktionen stören („oxidativ burst“) [61]. Außerdem sezernieren PMN Interleukine (IL), die weitere immunologische Reaktionen vermitteln. Je nach Wirkung wird zwischen pro- und anti-inflammatorischen IL unterschieden (**Tab. 1.1**). Eine stimulierte Freisetzung von IL infolge einer Exposition von NP

könnte zu einer Kaskade von Effekten führen, die vielfältige Gewebe- und Organschädigungen hervorrufen könnte [36].

Tab. 1.1: Wirkungen einiger Interleukine.

Interleukin	Effekte
IL-1 β	pro-inflammatorisch, aktiviert Lymphozyten, verursacht Fieber, stimuliert IL-6-Produktion [62, 63]
IL-2	Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen, Stimulation zytotoxischer Zellen [64, 65]
IL-6	pro-inflammatorisch, aktiviert Lymphozyten, moduliert Antikörperproduktion, verursacht Fieber, Hauptmediator der Akute-Phase-Reaktion, beeinflusst antigenspezifische Immunantwort und entzündliche Reaktionen, Schlüsselrolle in Pathogenese des Schocks und der Sepsis [62, 66]
IL-8	pro-inflammatorisch, chemotaktischer Faktor für Leukozyten, induziert in PMN vorübergehenden Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration und spezifische Freisetzung von Enzymen aus Granula, fördert Expression von Adhäsionsmolekülen auf Zellmembran, stimuliert Phagozytose opsonisierter Partikel, steigert Metabolismus reaktiver Sauerstoffradikale [62, 66]
IL-10	anti-inflammatory, Inhibition von IL-12, reguliert Wachstum von B-, T- und NK-Zellen [63, 67]
IL-12	pro-inflammatorisch, Induktion einer Th1-Immunantwort, Induktion der Produktion von Interferon- γ und anderen Zytokinen der NK- und T-Zellen, Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität [68]
TNF- α	pro-inflammatorisch, synergistische Effekte mit IL-1 β , involviert in pathologische Entzündungsreaktionen, Induktion der Akute-Phase-Proteine, Stimulation von T-Zellen [36, 63, 69]

PMN sind vor allem zu Beginn akuter Inflammationsprozesse am Entzündungsherd vorzufinden [66]. Sie werden als wichtige Komponente der primären Immunabwehr unmittelbar und frühzeitig nach der Exposition mit Nanopartikeln konfrontiert [70, 71]. WANG et al. und SAYES et al. beobachteten nach der Exposition von NP eine gesteigerte Akkumulation von Neutrophilen in spezifischen Organen von Mäusen und Ratten [43, 54]. Ferner wurde eine Anreicherung von Granulozyten und Monozyten im Blut von Mäusen bereits 15 Minuten nach i.v. Applikation von NP verzeichnet [72]. Nach Applikation von PLA-NP in Meerschweinchen waren als phagozytierende Zellen an der Aufnahme der NP hauptsächlich PMN beteiligt [71]. Trotz der bereits vielfältig eingesetzten NP

existieren bisher nur wenige veröffentlichte Studien über den Einfluss der NP auf die physiologischen Funktionen polymorphkerniger Granulozyten [73-75].

Das in dieser Arbeit genutzte PMN-Modell stellt eine *Ex-vivo*-Methode dar, die bereits für die Charakterisierung verschiedener Chemotherapeutika etabliert wurde [76-78]. Da PMN eine wichtige Säule der primären Immunabwehr darstellen und frühzeitig mit NP in Kontakt kommen [70, 71], ist es unerlässlich, den Einfluss nanopartikulärer Strukturen auf physiologische Funktionen humarer Granulozyten zu kennen.

1.5 Charakterisierung von Nanopartikeln

Für Untersuchungen nanopartikulärer Strukturen in biologischen Medien ist die Charakterisierung der eingesetzten NP in biologischen Matrices hinsichtlich Größe und Größenverteilung essentiell. Viele Techniken sind für ein „online-Monitoring“ von NP nicht geeignet, so dass sie für flüssige und/oder biologische Matrices nicht einsetzbar sind [5, 16]. Zwar ist die Messung der Partikelgröße bereits mit verschiedenen Methoden (z.B. Photonenzählungsspektroskopie, PCS) möglich, doch können hiermit nur monodisperse Suspensionen charakterisiert werden. Da NP aggregieren und/oder an ihre Oberfläche Proteine anlagern können (Proteinkorona), sind die meisten biologischen NP-Proben polydispers [5, 10, 35, 79]. Ein weiteres Problem stellt die Messung der Anzahl der Partikel in flüssigen Medien dar [10, 35], da die Toxizität von NP vielmehr mit der Partikelanzahl als mit der Massenkonzentration assoziiert ist [5, 12].

2 Fragestellung

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Effekte medizinisch relevanter NP auf wichtige physiologische Funktionen von *ex vivo* isolierten humanen polymorp-kernigen Neutrophilen (PMN) zu bestimmen.

Dazu sollten das nanopartikuläre MRT-Kontrastmittel Resovist® (cFeO) mit Eisen(II, III)-oxid-NP (uFeO) und Zink(II)-oxid-NP (uZnO) sowie SRL-beladene PLA-NP (SRL-PLA-NP) mit PLA-NP und löslichem Sirolimus (SRL) verglichen werden.

Dahingehend ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie stellen sich die Durchmesser der NP und deren Konzentration in biologischen Matrices dar?
2. Ist eine Adaption der Methoden des bereits für die Untersuchung von Chemotherapeutika etablierten Phagozyten-Modellsystems auf nanopartikuläre Xenobiotika möglich?
3. Welchen Einfluss üben cFeO und SRL-PLA-NP bzw. deren Referenzsubstanzen auf die Viabilität humaner PMN, deren Chemotaxis-, Phagozytose- und „oxidative burst“-Aktivität sowie die Sekretion bestimmter Zytokine (z.B. IL-1 β , IL-6, IL-8) aus?
4. Welche intrazellulären Sirolimus-Konzentrationen lassen sich mittels LC-MS-MS erfassen?
5. Lassen sich die NP markieren, um die Aufnahme der SRL-PLA-NP in humane PMN mittels Durchfluszytometrie zu bestimmen?

Abschließend sollten mögliche Korrelationen zwischen der Zytotoxizität und der Partikelanzahl und -größe geprüft werden, um neue Parameter zur Bewertung der Toxizität nanopartikulärer Strukturen zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Nanopartikel

Resovist® (cFeO-NP) (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland): wässrige Lösung von Eisen(II/III)-oxid-NP, die von einer Carboxyextran-Hülle umgeben sind. Der Durchmesser der umhüllten NP ist mit 20-80 nm angegeben.

Die **nicht ummantelten Fe₃O₄-NP (uFeO-NP)** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) weisen einen Durchmesser von 20-30 nm und eine Oberfläche von >60 m²/g auf.

Die **nicht umhüllten ZnO-NP (uZnO-NP)** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) besitzen einen Durchmesser von 50-70 nm und eine Oberfläche von 15-25 m²/g.

Sirolimus-beladene Poly(D,L-Milchsäure)-NP (SRL-PLA-NP) (micromod Partikeltechnologie GmbH, Warnemünde, Germany) enthalten 1% (m/m) Sirolimus. Sie weisen eine sphärische Form auf, besitzen einen Polydispersitätsindex von <0,2 und eine Dichte von 1,0 g/ml. Der Durchmesser der NP wird mit circa 250 nm angegeben. Ein Milligramm entsprechen 1,2*10¹¹ NP [80].

Poly(D,L-Milchsäure)-NP (PLA-NP) enthalten kein SRL, weisen jedoch die gleichen makrophysikalischen Eigenschaften wie SRL-PLA-NP auf.

3.2 Methoden

3.2.1 Bestimmung des Partikeldurchmessers und der -konzentration

Messprinzip

Die Messung des Partikeldurchmessers und der NP-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines von der Firma NanoSight® Ltd. (Amesbury, Großbritannien) erstmals 2006 kommerzialisierten Instrumentes (LM10). Die mit diesem Gerät mögliche „Nanoparticle tracking analysis“ (NTA) erlaubt eine simultane Messung von Größe, Größenverteilung und Anzahl der NP in Suspensionen. Hierfür wird eine dispergierte NP-Probe in eine Zelle injiziert, die anschließend von einem Laserstrahl (~40 mW bei $\lambda = 635$ nm) passiert wird. Die NP verursachen in dem Laserstrahl eine Lichtstreuung, welche mit Hilfe eines optischen Mikroskops und einer Digitalkamera verfolgt wird. Die Brownsche Molekularbewegung wird in

Videos aufgezeichnet und die Software NTA 2.0 misst die Distanz, welche von jedem Partikel zurückgelegt wurde. Ausgehend von diesem Wert wird der Diffusionskoeffizient D des NP bestimmt und unter Kenntnis der Probentemperatur T und Lösungsmittelviskosität η wird der hydrodynamische Durchmesser der NP d nach der Stokes-Einstein-Gleichung (**Gleichung 3.1**) berechnet, wobei K_B die Boltzmann-Konstante darstellt.

$$D = \frac{K_B T}{3\pi\eta d}$$

Gleichung 3.1: Stokes-Einstein-Gleichung

Die Dichte der NP hat keinen Einfluss auf deren Bewegung. NTA kann NP im Größenbereich von 10-1000 nm analysieren. Die untere Grenze ergibt sich durch die begrenzte Fähigkeit der NP, ausreichend Licht zu streuen, so dass Analysen von NP mit einem Durchmesser von 10 nm nur von Partikeln mit einem hohen Refraktionsindex möglich sind. Hingegen ergibt sich die obere Grenze durch die limitierte Brownsche Molekularbewegung. Die Proben sollten zwischen 10^5 und 10^{10} , idealerweise 10^6 - 10^9 Partikel pro Milliliter enthalten, was einer Konzentration von <1% (m/m) entspricht. Die Ergebnisse jeder Verteilung werden in zwei Werten angegeben, dem Mittelwert („mean“, durchschnittlich gemessene Partikelgröße) und dem Modalwert („mode“, am häufigsten gemessene Partikelgröße). Des Weiteren kann die Partikelanzahl ermittelt werden, da NTA jedes einzelne Partikel verfolgt [81-85].

Messung der NP

Die NP (cFeO-NP, uFeO-NP, uZnO-NP, SRL-PLA-NP, PLA-NP) wurden in verschiedenen Medien:

- a) PBS
- b) 10% Biseko® (= isotone 5%ige Lösung von Serumproteinen, gewonnen aus Plasma gesunder Spender) /PBS
- c) humanem Plasma
- d) 40 g/l humanem Albumin/PBS oder
- e) 2,5 g/l Fibrinogen/PBS

suspendiert, so dass Massenkonzentrationen von 200 mg Fe/l bzw. Zn/l und 20 µg SRL/l erhalten wurden. Nach Inkubation bei 37°C wurden die Proben zu

Partikelkonzentrationen von 10^7 - 10^9 NP/ml verdünnt und anschließend mit NanoSight® LM10 (N=10) analysiert.

3.2.2 Phagozytengewinnung und Inkubation

Die Blutentnahmen, Aufarbeitungen und Versuche wurden von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock genehmigt.

Die Gewinnung humaner Phagozyten (PMN) erfolgte aus heparinisiertem Vollblut gesunder Spender (20-60 Jahre, Nichtraucher, keine Dauermedikation). Der Zeitraum zwischen zwei Blutspenden betrug mindestens 4 Wochen. Die Isolierung der Zellen erfolgte nach zwei verschiedenen Varianten. Um die Zellen möglichst schonend zu behandeln, wurden alle genutzten Lösungen vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.

Variante A

Das heparinisierte Vollblut wurde 1+1 mit einer 1%igen Dextransulfat-Lösung in PBS bei 37°C über 50 min inkubiert. Nach der Phasentrennung wurde der erythrozytenarme Überstand abgenommen und zu gleichen Teilen mit Histopaque® 1077 versetzt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 9800x g bei 20°C waren die Blutbestandteile nach ihrer Dichte aufgetrennt. Die restlichen Erythrozyten wurden durch eine hypotone Lyse mit 0,98% NH₄Cl (10 min bei 37°C) abgetrennt. Die PMN wurden zweimal mit PBS gewaschen (5 min, 3800x g, RT) und in Medium (10% Biseko® in PBS) resuspendiert.

Variante B

Für die Bestimmung der Chemotaxis, Phagozytose und des „oxidative burst“ wurde eine abweichende Zellisolierungsmethode verwendet. Hierzu wurde das heparinisierte Vollblut 1+1 mit Histopaque® 1077 unterschichtet und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die PMN-reiche Schicht wurde abgetrennt und nochmals 1+1 mit Histopaque® 1077 unterschichtet. Nach anschließender Zentrifugation (30 min, 9800x g, RT) wurden die Zellpellets zweimal mit PBS gewaschen und die PMN in autologem Plasma resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellkonzentration mittels Trypanblau-Ausschluss wurde die Zellzahl auf 5 Mio. PMN pro ml eingestellt. Die Aufbereitung der PMN wurde durch ein Differentialblutbild kontrolliert. Dabei wurde eine Zellreinheit von $\geq 95\%$ festgestellt.

Für die Inkubationen der PMN wurde die Massenkonzentration an cFeO-NP so gewählt, dass die finale Eisenkonzentration der laut Packungsbeilage angegebenen maximalen (c_{max}), ein Zehntel der maximalen ($0,1 \times c_{max}$) sowie dem Zehnfachen der Plasmakonzentration ($10 \times c_{max}$) entspricht. Ein Milliliter Resovist[®] enthält 28 mg Eisen. Die maximale Plasmakonzentration beträgt 5-40 μ mol Fe/kg Körpergewicht. Bei einem Körpergewicht von >60 kg beträgt die Dosierung 1,4 ml Resovist[®]; dies entsprechen 0,7 mmol bzw. 39,2 mg Eisen. Unter der Annahme, dass der menschliche Körper ca. 5,5 l Blut mit einem Plasmaanteil von 55% enthält, ergibt sich eine Eisenkonzentration von 5,5-44,3 μ g/ml Plasma. Für die Inkubationen wurden cFeO-NP (Resovist[®]) mit Medium (10% Biseko[®] in PBS) verdünnt, so dass die Inkubationslösungen 22, 220 sowie 2200 μ g Fe/ml enthielten. Für die Inkubationen mit uFeO-NP und uZnO-NP wurden die NP-Suspensionen auf den gleichen Metallgehalt eingestellt (22, 220 und 2200 μ g Fe bzw. Zn/ml). Bezugnehmend auf die maximale Blutkonzentration im therapeutischen Bereich von Rapamune[®] (ein in Deutschland zugelassenes Immunsuppressivum mit dem Arzneistoff Sirolimus) wurden die Inkubationslösungen für SRL-PLA-NP, PLA-NP und löslichem SRL auf 22 μ g SRL/l eingestellt [86].

Die Zellsuspensionen wurden mit Medium (Kontrolle) oder NP-Suspension bei Standardbedingungen (37°C, feuchte Atmosphäre) inkubiert, wobei die Endkonzentration so gewählt wurde, dass die Fe-Konzentration annähernd der $0,1 \times c_{max}$, c_{max} sowie $10 \times c_{max}$ von Resovist[®] bzw. die SRL-Konzentration der c_{max} von Rapamune[®] entspricht. Demzufolge beinhalteten die Ansätze 2, 20 oder 200 mg Metall/l bzw. 20 μ g SRL/l.

3.2.3 Bestimmung der Partikelanreicherung in PMN

PE-markierte NP

Nach einstündiger Inkubation der PMN unter Standardbedingungen mit den PE-markierten SRL-PLA-NP bzw. PLA-NP wurden die Proben für 10 min auf Eis

gelagert und nach Zugabe von PBS für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit eiskalter PBS gewaschen (5 min, 250x g, 4°C) und nach Zusatz von 1 ml FACS®-Lyselösung für 20 min unter Lichtschutz bei RT gelagert. Nach einem weiteren Waschschritt mit eiskalter PBS wurden die Proben mit Hilfe der Durchflusszytometrie vermessen. Die verwendeten Detektoreinstellungen können der **Tab. 3.1** entnommen werden.

Tab. 3.1: Detektoreinstellungen am Durchflusszytometer für die Messung der PE-Markierung

Detektor	Spannung [V]	Signalverstärkung
FSC	E00	1,0 lin
SSC	350	1,0 lin
FL1	450	log
FL2	500	log

Intrazelluläre SRL-Konzentration

Nach Inkubation (5, 15, 30, 90 und 180 min) der PMN mit den SRL-haltigen Suspensionen SRL-PLA-NP bzw. dem freien Arzneistoff SRL wurden die Zellpellets in 50 µl Wasser resuspendiert, 1+1 mit 50,0 mg/l DMR als internen Standard und 100 µl Acetonitril zur Lyse der PMN versetzt und anschließend für 5 min bei 6000x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgetrennt und unter Stickstoff bei RT eingeengt. Die Rückstände wurden mit 50 µl mobiler Phase (MeOH / 5 mM NH₄CH₃COO / HCOOH = 80:20:0,02 (V/V/V)) versetzt, wovon 10 µl für die LC-MS-MS-Analyse genutzt wurden. Die Inkubationsmedia wurden der gleichen Prozedur ohne Zugabe von Wasser unterzogen. Die Waschlösungen wurden lediglich mit internem Standard versetzt und anschließend injiziert. Die Kontrollen und Kalibratoren wurden auf die gleiche Weise hergestellt. Die Kalibrationsbereiche für die Zellpellets betrugen 20-500 µg/l, für die Inkubationsmedia 10-400 µg/l und für die Waschlösungen 5-35 µg/l. Für die LC-MS-MS wurden die in **Tab. 3.2** gelisteten Geräte genutzt und die in **Tab. 3.3** aufgeführten Parameter eingestellt. Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis der Peakflächen von SRL und DMR genutzt. Bei dieser Messmethode kann eine exakte Unterscheidung zwischen intrazellular vorliegendem und an Zellen assoziiertem SRL nicht vorgenommen werden. Im Folgenden werden beide als Intrazellulkonzentration (c_{intra}) bezeichnet.

Tab. 3.2: Geräte der LC-MS-MS-Messung

RP-HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)	CBM-20A Systemkontrolleinheit
	GT-104 Entgaser
	LC-10AT Pumpen
	SIL-10A Autoinjektor mit Probenkühler
	CTO-10AC Säulenofen
	SPD-10A UV-VIS-Detektor
Tandem-MS (TSQ 7000, Thermo Scientific, Waltham, USA)	

Tab. 3.3: Parameter der LC-MS-MS-Messung

LC	MS-MS
<p>Säule: 125/2 Nucleosil® 120-3 C-18 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)</p> <p>Mobile Phase: MeOH/5mM NH₄CH₃COO/HCOOH 80:20:0,02 (V/V/V)</p> <p>Säulentemperatur: 35°C</p> <p>Fließgeschwindigkeit: 250 µl/min</p> <p>Wellenlänge: 278 nm</p>	<p>Ionisation: Elektrospray („positive ion mode“)</p> <p>Kapillare: Spannung 4,8 kV, Temperatur 220°C</p> <p>“Sheath gas” 96 psi</p> <p>“Auxillary gas” 5 a.u.</p> <p>Multiplier-Spannung: 1600 V</p> <p>Kollisionszelle: Argon, Druck 3,2 mT, Energie-22 eV</p> <p>m/z: „parent“: 931,3 (SRL), 901,7 (DMR) „daughter“: 864,4 (SRL), 834,4 (DMR)</p>

3.2.4 Bestimmung der physiologische Funktionen der PMN

Viabilität

Zur Bestimmung der Viabilität wurde die Trypanblau-Ausschluss-Methode genutzt. Dazu wurden nach 7 Stunden Inkubation im 2stündigen Abstand je 50 µl Zellsuspension entnommen. Die Proben wurden mit PBS und 0,4%iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1+1+2 gemischt. Anschließend wurde die Anzahl lebender und toter Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unterm Lichtmikroskop (Bresser® Bino Researcher, Meade Instruments Europe GmbH & Co. KG, Rhede, Deutschland) bestimmt.

Zytokinfreisetzung

Die Sekretion der Interleukine TNF- α , IL-1 β , -2, -6, -8, -10 und -12 wurde mit Hilfe von ELISA-DuoKits der Firma R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) gemessen. Hierzu wurde eine 96-Well-Platte mit je 100 μ l des jeweiligen „capture“-Antikörpers beschichtet und über Nacht bei RT gelagert. Am folgenden Tag wurden die Wells geleert und trockengesaugt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit je 340 μ l/Well 10 mg/ml BSA in PBS 30 min bei RT inkubiert. Nach dem Ausschütten der Platte wurden die Wells dreimal mit je 300 μ l/Well 1 μ l/ml Tween® 20 in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Nachfolgend wurden die Wells erneut trockengesaugt und mit jeweils 100 μ l/Well Standard- bzw. Probelösung 1,5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Wells erneut dreimal mit je 300 μ l/Well 1 μ l/ml Tween® 20 in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und trockengesaugt. Nachfolgend wurden die Wells 1,5 h mit je 100 μ l des entsprechenden Detektionsantikörpers bei RT inkubiert und wiederum dreimal gewaschen und trockengesaugt. Nach 30minütiger Inkubation mit je 100 μ l/Well Streptavidin-HRP und anschließendem Waschen und Trockensaugen wurden die Wells 15 min mit je 100 μ l/Well Substrat-TMB-Reagenz inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 50 μ l/Well 1M H₂SO₄ gestoppt und die Farbintensität wurde bei 450 nm (Referenz: 595 nm) mit Hilfe eines Anthos HTIII „plate reader“ mit Anthos Winread 2.3 Software (Anthos Labtec, Salzburg, Österreich) vermessen. Die Zytokin-Konzentrationen wurden mittels einer Standardkalibrierkurve berechnet. Veränderungen in der Zytokinfreisetzung in Gegenwart von Nanopartikeln wurden aus dem Verhältnis zur identischen, aber nanopartikelfreien Probe (Kontrolle) kalkuliert.

Phagozytose und „oxidative burst“

Nach den Inkubationsperioden 1, 2, 3 und 4 h wurden jeweils 100 μ l der Zellsuspensionen für 10 min auf Eis gelagert. Für die Stimulation der Phagozytose wurden 20 μ l eiskalte opsonisierte Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-konjugierte *E. coli* (10^9 /ml PBS) zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskalter PBS gewaschen (5 min, 250x g, 4°C). Für die Stimulation des „oxidative burst“ wurden 20 μ l 5 μ M fMLP (leichtes Stimulans), eiskalte *E. coli* ($2 \cdot 10^9$ /ml) (mittelstarkes Stimulans) oder 8,1 μ M PMA

(starkes Stimulans) zugesetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl 35 µM DHR wurden die Proben wiederum 10 min bei 37°C inkubiert. Für die Bestimmung der Phagozytose und des „oxidative burst“ wurden die Zellpellets anschließend mit je 1 ml FACS®-Lyselösung versetzt und 20 min bei RT unter Lichtschutz gelagert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 250x g, 4°C) und Waschen mit jeweils 2 ml PBS wurden je 200 µl 5 mg/l Propidiumiodid zugefügt. Die Proben wurden bis zur Messung innerhalb 1 h (Phagozytose) bzw. 30 min („oxidative burst“) auf Eis und unter Lichtschutz gelagert. Inkorporierte FITC-*E.coli* und oxidiertes DHR wurden mittels des Durchflusszyto-meters FACSCalibur™ (Software CellQuest Pro™ 4.0.1, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) bestimmt. Die Messungen wurden auf Kontrollen, die auf Eis gelagert wurden, bzw. auf Proben ohne Zusatz von fMLP, *E.coli* oder PMA evaluiert. Die verwendeten Detektoreinstellungen können der **Tab. 3.4** entnommen werden.

Tab. 3.4: Detektoreinstellungen am Durchflusszytometer für die Messung der Phagozytose- und „oxidative burst“-Aktivität

Detektor	Spannung [V]	Signalverstärkung
FSC	E00	2,0 lin
SSC	350	1,0 lin
FL1	450 bzw. 500	log
FL2	600	log

Bei der Bestimmung des „oxidative burst“ wurde die intrazelluläre Oxidation des Dihydrorhodamin (DHR) 123 zum grün fluoreszierenden Rhodamin 123 genutzt (**Abb. 3.1**). Nach Aktivierung der Zellen katalysiert die NADPH-Oxidase die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxidanionen, die sich mittels Disproportionierung zu Wasserstoffperoxid umwandeln. Das nicht fluoreszierende DHR 123 wird intrazellulär zum Rhodamin 123 oxidiert. Die Menge des gebildeten Rhodamins 123 ist proportional zur produzierten Wasserstoffperoxidmenge [87].

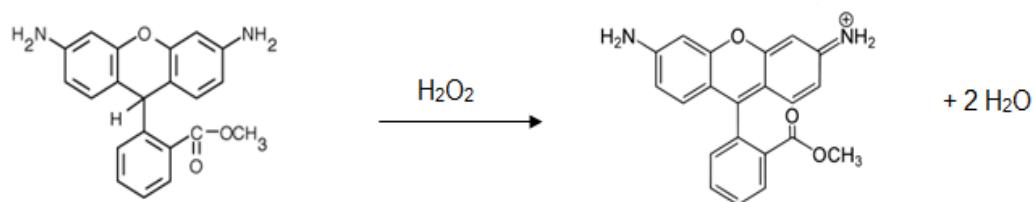


Abb. 3.1: Oxidation des nicht fluoreszierenden Dihydrorhodamin zum grün fluoreszierenden Rhodamin 123

Chemotaxis

Zur Bestimmung des Migrationsverhaltens der PMN wurde eine modifizierte Methode nach BOYDEN genutzt [88, 89]. Die Chemotaxiskammern aus Piacryl bestehen aus zwei Kompartimenten, einem Membranfilter aus Cellulosenitrat (Porenweite 3 µm) sowie einem Ring zum Fixieren des Filters (**Abb. 3.2**).

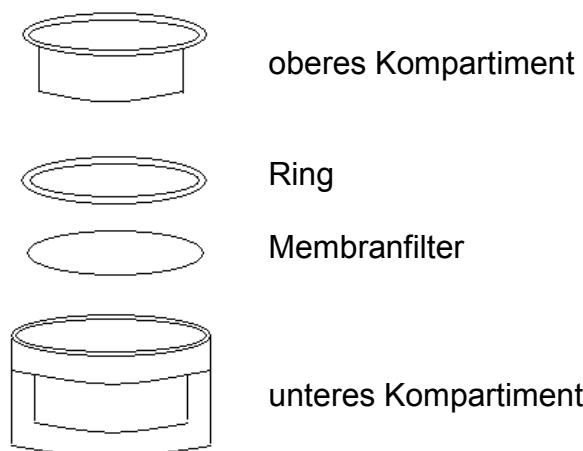


Abb. 3.2: Aufbau einer Chemotaxiskammer

Pro untersuchte Substanz wurden drei Kammern präpariert. Die unteren Kammerkompartimente wurden mit je 450 µl Kontrollmedium bzw. Chemoattractans (1 µg/l fMLP in Medium oder Zymosan-aktiviertes Meerschweinchenserum (ZymA)) gefüllt. Nachdem die unteren Kammern mit Hilfe der Filter luftblasenfrei verschlossen worden sind, wurden die Filter durch Auflegen des Ringes und Verschrauben mit dem oberen Kompartiment fixiert. Nach den Inkubationsperioden von 1, 3 und 5 h wurden jeweils 400 µl Zellsuspension entnommen und mit Medium 1+4 verdünnt, so dass die Zellzahl 1 Mio./ml betrug. Anschließend wurden jeweils 500 µl dieser Zellsuspension in den oberen Teil der Chemotaxis-

kammer gegeben. Die Kammern wurden 3 h bei 37°C in einem wasserdampfgesättigten Behälter inkubiert. Anschließend wurden die oberen Kompartimente mit einem scharfen Wasserstrahl abgespült und die Kammern auseinandergeschraubt. Die Filter wurden 3 min in 50%igem Ethanol fixiert, in bidestilliertem Wasser gespült und 8 min in 1%iger Methylenblaulösung gefärbt. Im Folgenden wurde der überschüssige Farbstoff in Wasser abgespült und die Filter mit der Oberseite (Zellseite) auf einen Objekträger gebracht und leicht angedrückt. Die Filter wurden bis zum folgenden Tag getrocknet und anschließend mit dem Chemotaxisanalysator HCA-100 (HaSoTec, Rostock, Deutschland) vermessen. Die Zellen wurden jeweils im Abstand von 10 µm-Intervallen von der Zellfront an der Filteroberfläche bis zur distalen Seite pro Gesichtsfeld gezählt. Es wurden mindestens fünf Gesichtsfelder vermessen. Die Software errechnet die Lokomotionsindizes (LI) nach folgender **Gleichung 3.2**:

$$LI = \frac{\sum [Zellen\ pro\ Schichttiefe * Distanz\ vom\ Start\ der\ Zellen]}{Zahl\ aller\ Zellen\ pro\ Gesichtsfeld}$$

Gleichung 3.2: Berechnung des Lokomotionsindex

Der LI gibt Auskunft über die durchschnittliche Distanz, die von den Zellen im Verlauf der Inkubationszeit zurückgelegt wurde. Mit Hilfe der LI wurden der chemotaktische Index (CI) (**Gleichung 3.3**) und der Migrationsindex (MI) (**Gleichung 3.4**) berechnet, wobei LI+/- den LI mit bzw. ohne Chemoattractantien-Zusatz und CI_{TS/0} den CI mit bzw. ohne Testsubstanz darstellt.

$$CI = \frac{LI +}{LI -}$$

Gleichung 3.3: Berechnung des chemotaktischen Index

$$MI [\%] = \frac{CI_{TS}}{CI_0} * 100$$

Gleichung 3.4: Berechnung des Migrationsindex

3.3 Statistische Analyse

Veränderungen in der Viabilität, der Phagozytose- und „oxidative burst“-Aktivität sowie der Freisetzung von Zytokinen wurden aus dem Verhältnis der mit NP inkubierten PMN und identischen, aber NP-freien Proben (Kontrolle) kalkuliert. Die Daten werden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Statistische Berechnungen wurden mittels gepaarten T-Tests durchgeführt. Ein statistisch (hoch) signifikanter Unterschied wurde bei * $p<0,05$ (** $p<0,01$) angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Methodenentwicklung

Um die Versuche durchführen zu können, war es erforderlich, bekannte Experimentalanordnungen des für die Untersuchungen von Chemotherapeutika etablierten Phagozyten-Modellsystems [76-78] für nanopartikuläre Xenobiotika zu adaptieren. Im Einzelnen wurden die Messung der Phagozytose, des „oxidative burst“ und der Chemotaxis optimiert. Des Weiteren wurde die experimentelle Handhabung, z.B. im Hinblick auf erforderliche Arbeitsschutzmaßnahmen erarbeitet.

Nach entsprechender Justierung des NanoSight LM 10-Instrumentes wurden die Durchmesser der NP und deren Anzahl in flüssigen und biologischen Medien bestimmt (siehe Kapitel 4.2). Dies war Voraussetzung für die schnelle und direkte Charakterisierung der NP im Inkubationsmedium. Des Weiteren wurde erstmals mit Hilfe Phycoerythrin(PE)-markierter NP die Inkorporationsrate der NP in PMN mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Kapitel 4.3.2).

Außerdem wurden PLA-NP mit 1,00% SRL beladen und die Freisetzung des Arzneistoffes mittels LC-MS-MS ermittelt (siehe Kapitel 4.3.2). In Vorversuchen wurde die Beladung der SRL-PLA-Partikel durch LC-MS-MS-Messung mit 1,04% (m/m) bestätigt. Die Methode zur Sirolimus-Messung wurde für alle Medien (Zellsuspension, Inkubationslösung und Waschlösung) entsprechend internationaler Richtlinien validiert [90, 91]. Es wurden keine Interferenzen durch das Trägermaterial detektiert. Die Kalibrierfunktionen stellten sich mit $R^2 \geq 0,992$ linear dar. Die Messung der niedrigsten Kalibrierkonzentrationen (LLOQ) (20,0 µg/l in Zellsuspensionen und 10,0 µg/l in Inkubationsmedien) ergaben „interday“-Variationskoeffizienten von <14% bzw. <18% und relative Fehler von +9,8% bzw. -10,3% (n = 10).

4.2 Charakterisierung der Nanopartikel

Zunächst wurde die Partikelgröße von SRL-PLA-NP und PLA-NP in humaner Albumin-Lösung zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Zu Beginn der Inkubation wiesen SRL-PLA-NP und PLA-NP einen Partikeldurchmesser von etwa

250 nm auf, die sich nach 5 min auf ca. 150 nm reduzierte (**Abb. 4.1**) und in den folgenden 60 min unverändert blieb. Deshalb wurde für die weiteren Untersuchungen eine Inkubationszeit von 5 min festgelegt.

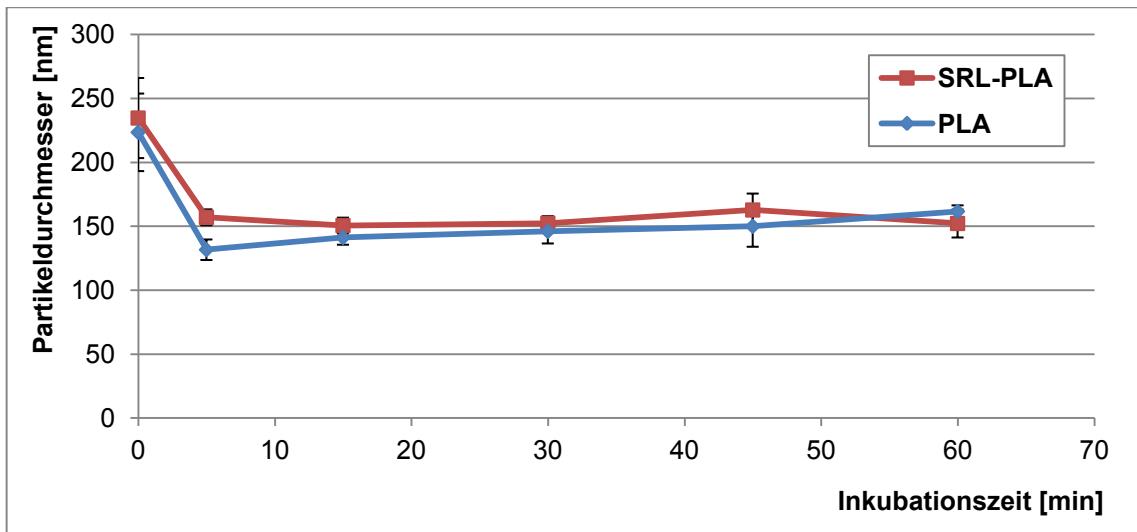


Abb. 4.1: Partikeldurchmesser von PLA-NP und SRL-PLA-NP im Verlauf einer 60 min Inkubation in humaner Albumin-PBS-Lösung (40 g/l) bei 37°C.

Die Ergebnisse der Messung der Partikeldurchmesser von cFeO-NP, uFeO-NP und uZnO-NP in verschiedenen Medien sind in **Abb. 4.2** dargestellt. Die Modal- und Mittelwerte der Partikeldurchmesser von cFeO-NP in PBS, Albumin- und Fibrinogen-Lösung wurden mit etwa 63 nm und 72 nm bestimmt. Nach 5 min Inkubation in 10% Biseko®/PBS und nativem Spenderplasma stieg der Modalwert signifikant (hier und im Weiteren: * $p<0,05$) auf 108 nm bzw. 142 nm und der Mittelwert signifikant auf 89 nm bzw. 126 nm. Nach Inkubation von uFeO-NP und uZnO-NP zeigten die Modal- und Mittelwerte in allen getesteten Medien keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 4.2**). Die häufigsten Partikeldurchmesser von uFeO-NP bzw. uZnO-NP lagen zwischen 141 und 202 nm bzw. zwischen 165 und 225 nm. Ähnlich stellten sich die Mittelwerte dar (uFeO-NP: 167-220 nm; uZnO-NP: 177-220 nm).

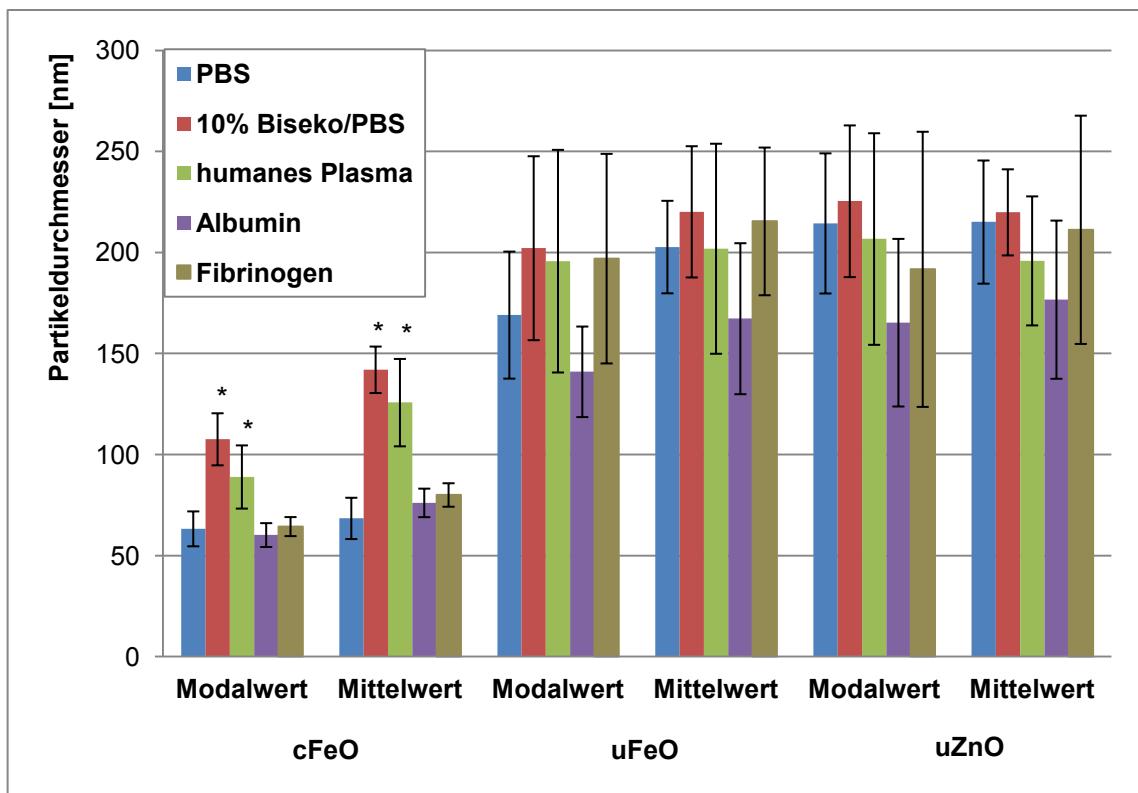


Abb. 4.2: Partikeldurchmesser von cFeO-NP, uFeO-NP und uZnO-NP nach 5 min Inkubation in PBS, 10% Biseko®/PBS, humanem Spenderplasma sowie humaner Albumin- (40 g/l PBS) oder Fibrinogenlösung (2,5 g/l PBS) in bei 37°C (*p<0,05).

Nach der Inkubation von SRL-PLA-NP und PLA-NP in PBS, 10% Biseko®/PBS, humanem Spenderplasma und Fibrinogen/PBS ergaben die Modal- und Mittelwerte ungefähr 220 nm (**Abb. 4.3**). Die Inkubation dieser beiden NP in Albumin/PBS führte zu signifikant niedrigeren Modal- und Mittelwerten (PLA-NP: 119 nm, 147 nm; SRL-PLA-NP: 129 nm, 154 nm).

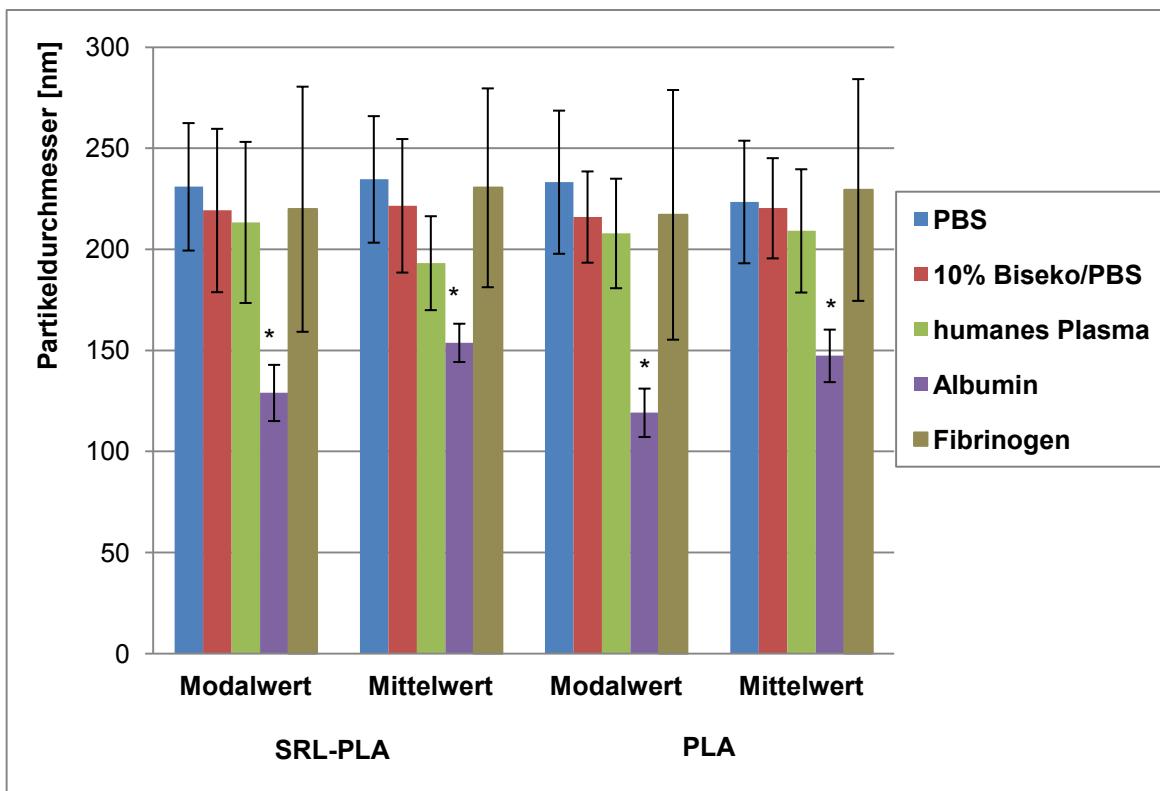


Abb. 4.3: Partikeldurchmesser von SRL-PLA-NP und PLA-NP nach 5 min Inkubation in PBS, 10% Biseko®/PBS, humanem Spenderplasma sowie von humaner Albumin- (40 g/l PBS) oder Fibrinogenlösung (2,5 g/l PBS) in bei 37°C (*p<0,05).

Für alle untersuchten NP-Arten stellte sich die Partikelanzahl pro Milliliter PBS (im Folgenden als Partikelkonzentration bezeichnet), 10% Biseko®/PBS und humanem Plasma unabhängig vom Dispersionsmedium dar (**Abb. 4.4**). Die Massenkonzentration von 200 mg Fe oder Zn/l wiesen unterschiedliche Partikelkonzentrationen auf. Die nicht-ummantelten FeO-NP und ZnO-NP beinhalteten ungefähr 3×10^8 NP/ml, wohingegen die umhüllten FeO-NP etwa 19×10^8 Partikel pro ml enthielten. Die Partikelkonzentration von PLA-NP und SRL-PLA-NP entsprach ca. 4×10^8 NP/ml.

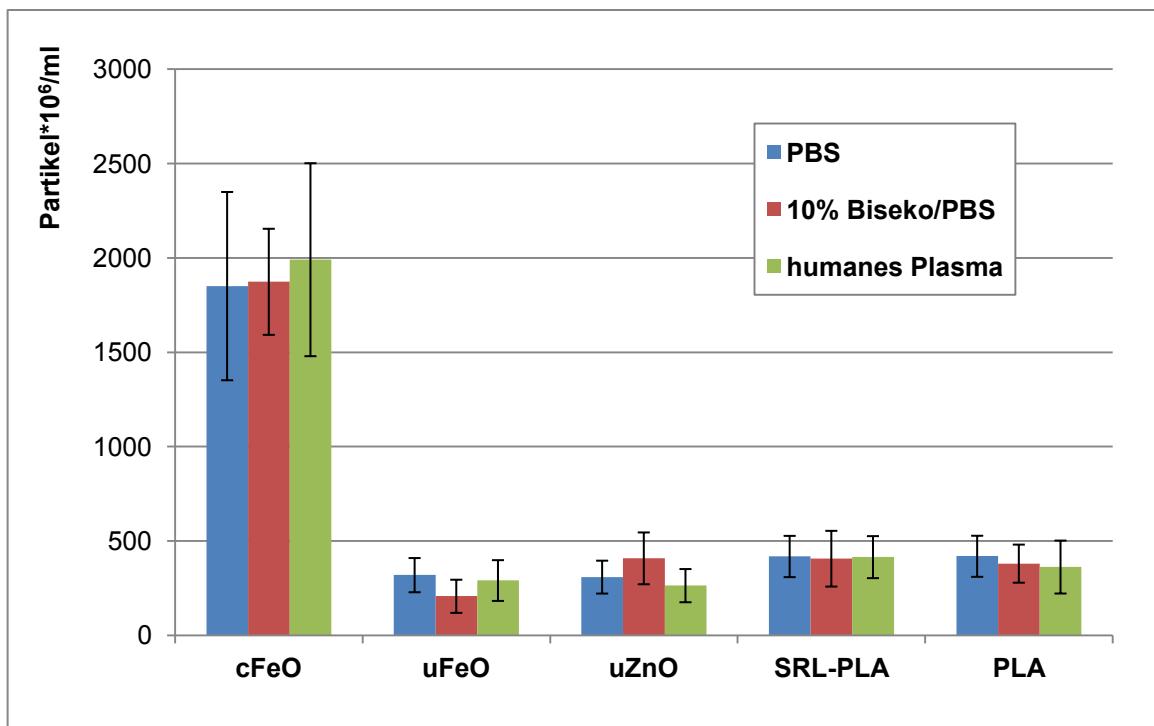


Abb. 4.4: Partikelkonzentration von cFeO-NP, uFeO-NP, uZnO-NP, SRL-PLA-NP und PLA-NP in PBS, 10% Biseko[®]/PBS oder nativem Spenderplasma.

4.3 Pharmako-/Toxikodynamik der NP

4.3.1 Resovist[®] (cFeO-NP) und Referenzsubstanzen (uFeO-NP, uZnO-NP)

Viabilität

Zu Beginn der Untersuchungen betrug die Viabilität der PMN 94 - 97%. In den NP-freien Kontrollen sank sie während der Inkubationsperiode von bis zu 19 h um 12 - 13% ($n=17$). Weder cFeO-NP noch uFeO-NP zeigten einen relevanten Einfluss auf die Zellviabilität. Hingegen verursachte uZnO-NP eine signifikante dosisabhängige Reduktion der Viabilität der PMN (**Abb. 4.5**). Bei einer Massenkonzentration von 200 mg Zn/l sank sie von 92% nach 5 h auf 50% nach 19 h. Nach 19 h Inkubation mit 20 mg Zn/l waren noch ca. 72% der Zellen lebensfähig. Inkubationen mit 2 mg Zn/l beeinflusste die Viabilität der PMN nur leicht (91%).

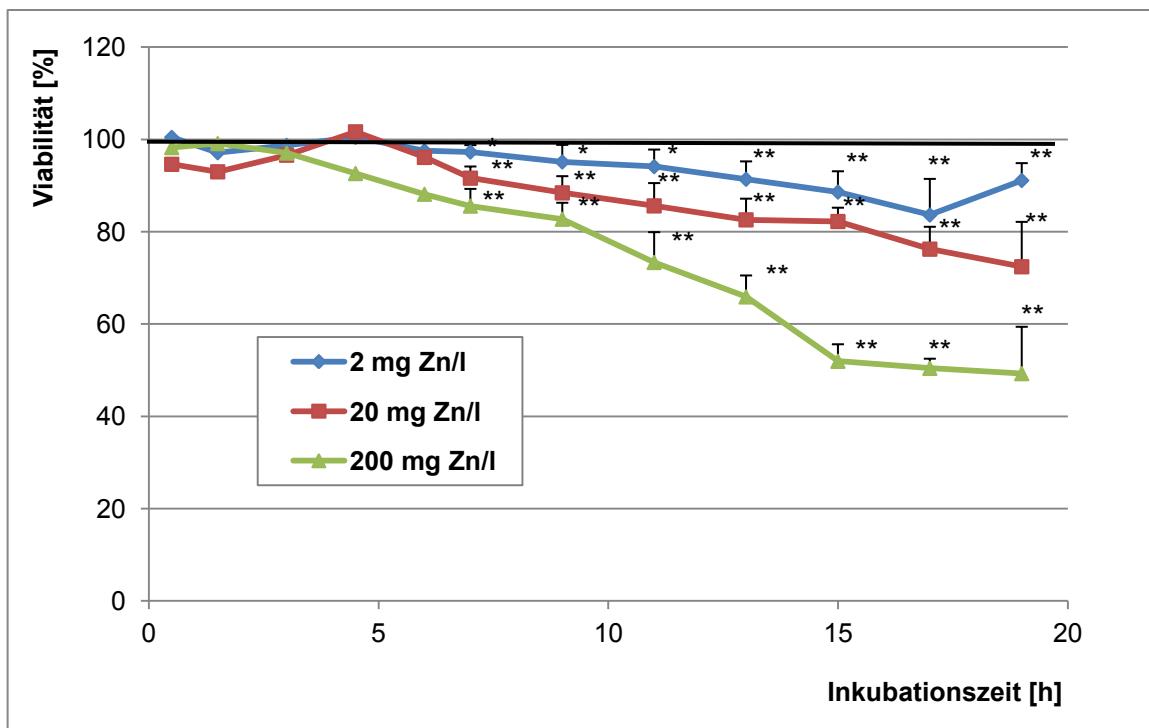


Abb. 4.5: Anteil lebender PMN im Vergleich zur Kontrolle (100%) im Verlauf von 19 h Inkubation mit uZnO-NP (*p<0,05).

Zur Untersuchung, ob die Viabilitiesbeeinträchtigung der PMN durch Auflösung des Zinkoxids zu Zn²⁺-Ionen verursacht wird, wurden die Zellen mit löslichem Zink(II)-sulfat gleicher Zink-Massenkonzentrationen (2, 20 und 200 mg Zn/l) inkubiert. Zink(II)-sulfat verursachte eine leichte konzentrationsabhängige Reduktion der PMN-Viabilität (**Abb. 4.6**). Bei einer Konzentration von 200 mg Zn/l fiel sie von 89% nach 7 h auf 72% nach 19 h. In Gegenwart von 20 mg Zn/l waren nach 19 h 17% der Zellen tot. Inkubationen mit 2 mg Zn/l zeigten selbst nach 19 h keinen Einfluss auf die Zellviabilität.

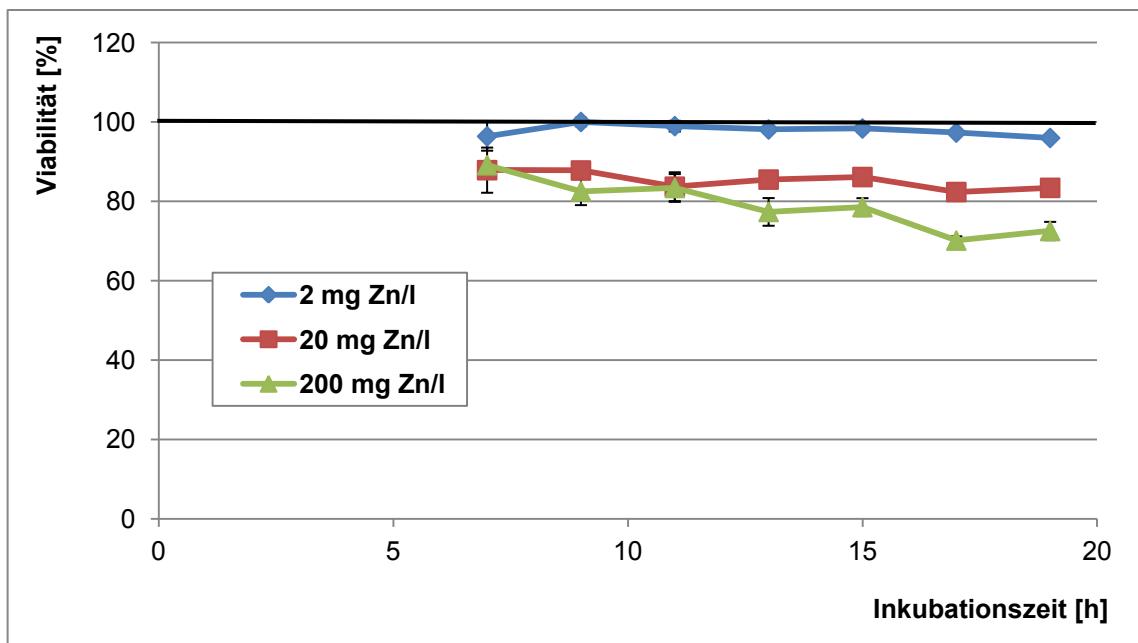


Abb. 4.6: Anteil lebender PMN im Vergleich zur Kontrolle (100%) bis 19 h nach Inkubation mit löslichem ZnSO_4 (2, 20 und 200 mg Zn/l).

Chemotaxis

Die chemotaktische Aktivität der PMN in NP-freien Proben blieb über den gesamten Inkubationszeitraum stabil; die LI_C -Werte betrugen nach Stimulation mit fMLP und ZymA durchschnittlich 39,5 ($\pm 6,8$) bzw. 43,2 ($\pm 6,6$). Das spontane Migrationsverhalten der PMN wurde durch Inkubationen mit cFeO-NP, uFeO-NP oder uZnO-NP nicht beeinflusst. Die Migrationsindizes nach Stimulation mit ZymA blieben bei allen getesteten NP-Konzentrationen unverändert. Unter Stimulation mit fMLP verursachten cFeO-NP nach einstündiger Inkubation eine signifikante Steigerung des Migrationsindex (MI) (Abb. 4.7). In den folgenden Inkubationsperioden glichen sich die MI von cFeO-NP der der Kontrolle an. uFeO-NP und uZnO-NP zeigten keinen Einfluss auf die Chemotaxis der PMN.

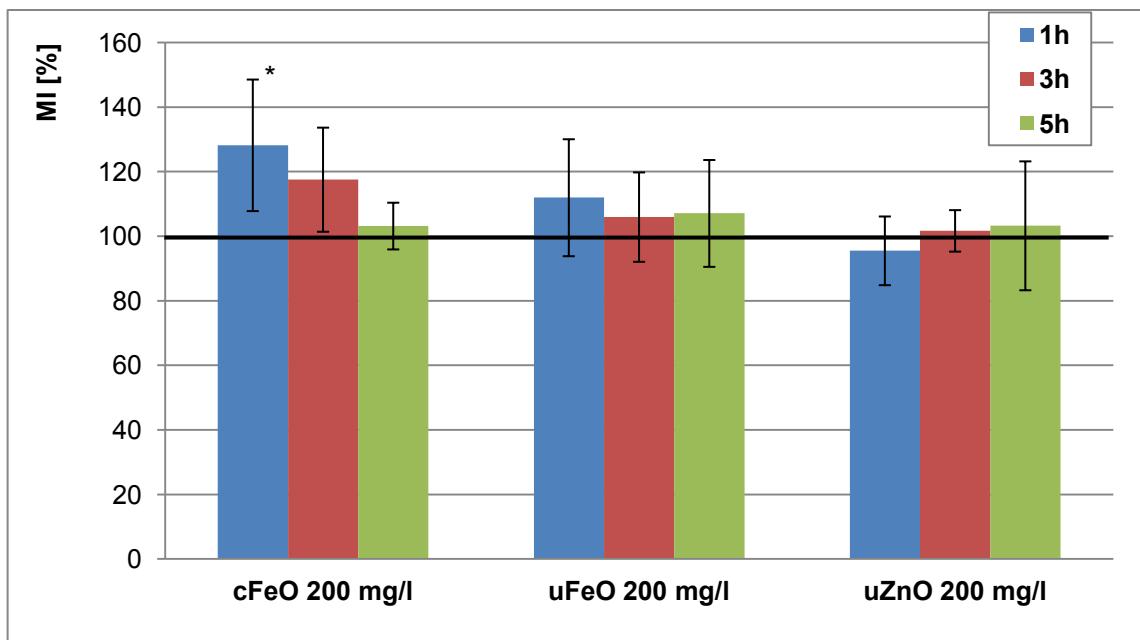


Abb. 4.7: Migrationsindizes (MI) humaner PMN (5 Mio./ml) nach Inkubation mit cFeO-NP, uFeO-NP oder uZnO-NP unter Stimulation mit fMLP (Kontrolle: 100%).

Phagozytose

Während der Inkubationsperiode von bis zu 3 h waren 92,5% der PMN phagozytotisch aktiv. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte cFeO-NP eine konzentrationsabhängige Abnahme der Phagozytose (**Abb. 4.8**). Nach Inkubation mit 2 mg Fe/l cFeO-NP wurde die phagozytische Aktivität nach 1 h leicht gesenkt ($75,5 \pm 20,6\%$); in den folgenden Inkubationsperioden glich sie sich der Kontrolle an (91,5% nach 2 h, 96,7% nach 3 h). In Gegenwart von 20 oder 200 mg Fe/l von cFeO-NP sank der Phagozytose-Index (PI) nach 1 h auf 78,2% bzw. 65,9% und nach 3 h auf 57,4% bzw. 50,8%.

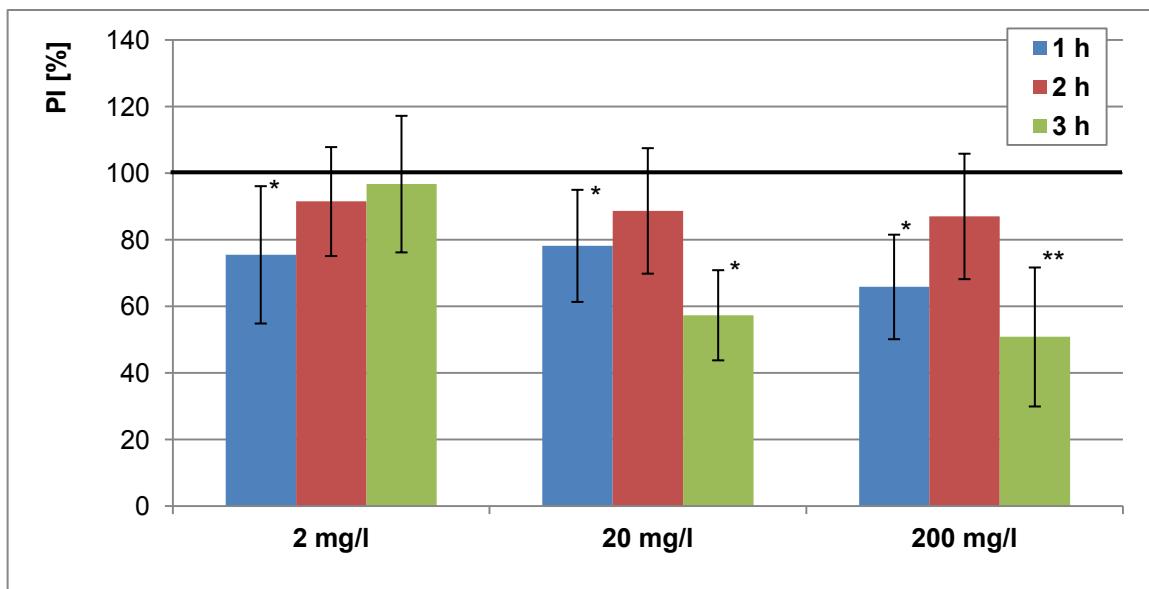


Abb. 4.8: Phagozytose-Indizes (PI) von PMN (5 Mio./ml) nach Inkubation mit cFeO-NP (Kontrolle: 100%) (* $p\leq 0,05$).

uFeO-NP verursachte ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion der PI (**Abb. 4.9**). In Gegenwart von 2 mg/l wurde die Phagozytose-Aktivität der PMN tendenziell, jedoch nicht signifikant gesenkt. Eine Inkubation mit 20 mg/l uFeO-NP reduzierte deren Aktivität bereits nach 1 h auf 66,4% und nach 2 h auf 63,6%; nach 3 h Inkubation glich sie sich der der NP-freien Kontrolle an. Zweihundert mg/l uFeO-NP verursachten nach allen drei Inkubationszeitpunkten eine signifikante Reduktion der PI (70,5% nach 1 h; 69,7% nach 2 h; 55,7% nach 3 h).

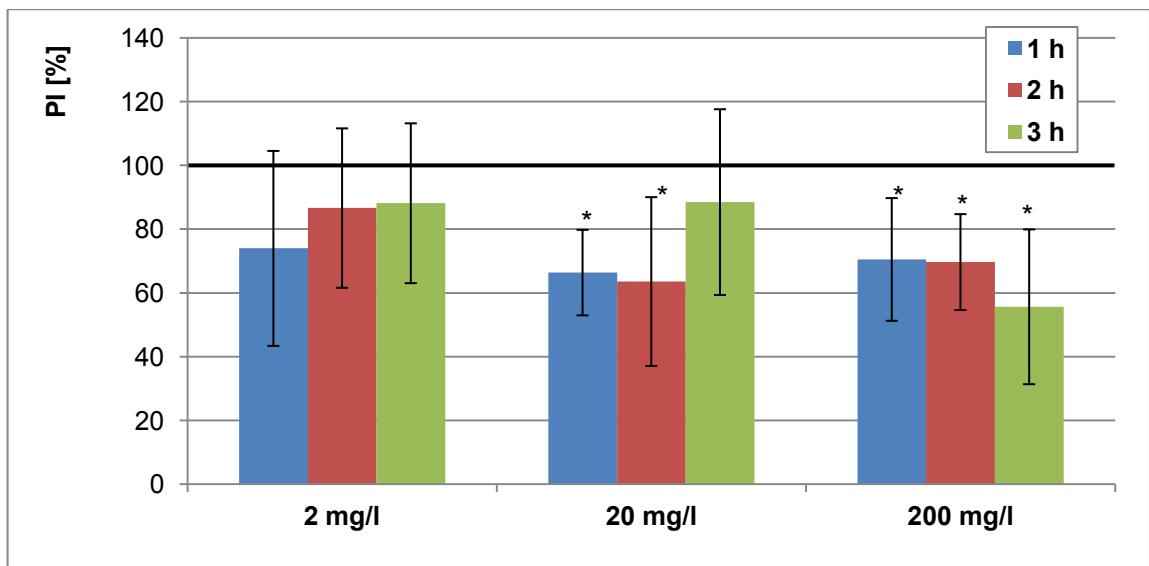


Abb. 4.9: Phagozytose-Indizes (PI) von PMN (5 Mio./ml) nach Inkubation mit uFeO-NP (Kontrolle: 100%) (* $p\leq 0,05$).

Die Phagozytose-Aktivität wurde nach Inkubation mit uZnO-NP ebenfalls reduziert (**Abb. 4.10**). Nach 1 h verursachten 2 mg Zn/l zunächst eine leichte Reduktion ($76,4 \pm 21,8\%$), welche nach 3 h deutlich ausgeprägt war ($50,4 \pm 22,8\%$). In Gegenwart von 20 mg Zn/l betrug der PI nach 3 h $54,1 \pm 22,5\%$ und nach Inkubation mit 200 mg Zn/l sank sie von 68,8% nach 1 h auf 64,0% nach 3 h.

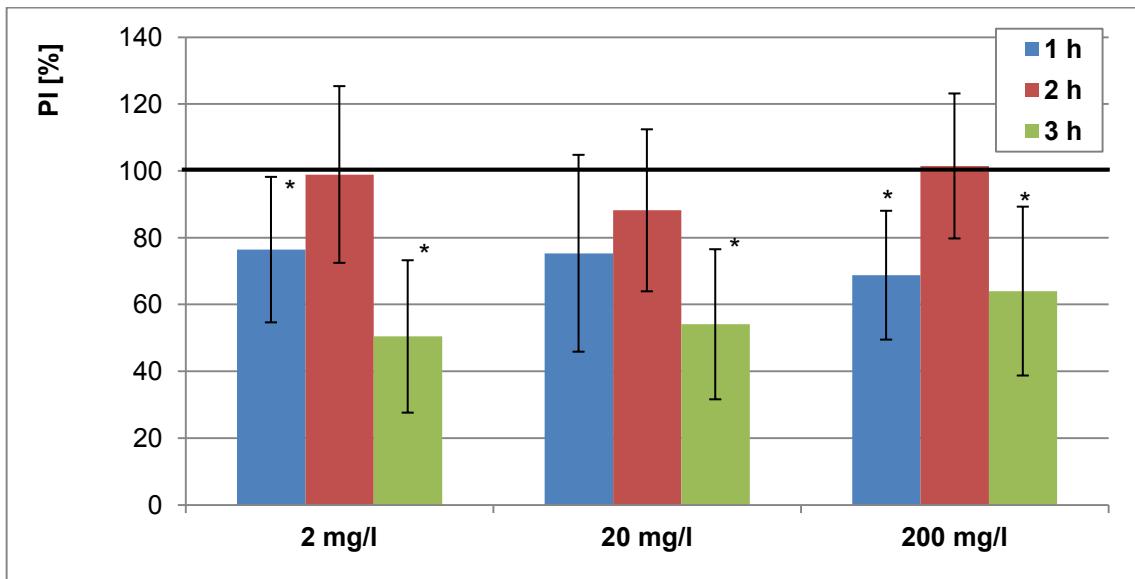


Abb. 4.10: Phagozytose-Indizes (PI) von PMN (5 Mio./ml) nach Inkubation mit uZnO-NP (Kontrolle: 100%) (* $p \leq 0,05$).

„Oxidative burst“

Ohne Einwirkung eines Stimulans verursachten keine der untersuchten Metall-oxid-NP eine messbare intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Nach Stimulation mit fMLP, *E. coli* oder PMA beinhalteten die Inkubationsansätze durchschnittlich 13%, 84% bzw. 94% PMN, die über den Inkubationszeitraum von 3 h einen „oxidative burst“ zeigten. Die Gegenwart der Metalloxid-NP verursachte nach leichter Stimulation mittels fMLP keine Abschwächung des „oxidative burst“. Nach mittelstarker Stimulation mit *E.coli* konnte in den Konzentrationen 2 und 20 mg/l ebenfalls keine Beeinträchtigung der „burst“-Aktivität durch die Metalloxid-NP verzeichnet werden. Die Dosis von 200 mg Metall/l zeigte jedoch deutliche ($p \leq 0,05$) Suppressionen des „oxidative burst“ (**Abb. 4.11**). Inkubationen mit cFeO-NP verursachten eine Abnahme von 91,3% nach 1 h über 85,2% nach 2 h auf 75,1% nach 3 h. uFeO-NP induzierten eine signifi-

kante Reduktion der „oxidative burst“-Aktivität nach 2 und 3 h. Zu Beginn der Inkubation mit uZnO-NP konnte eine mäßige Suppression des „oxidative burst“ beobachtet werden, die sich in den folgenden Inkubationsperioden den Werten der Kontrolle anglich.

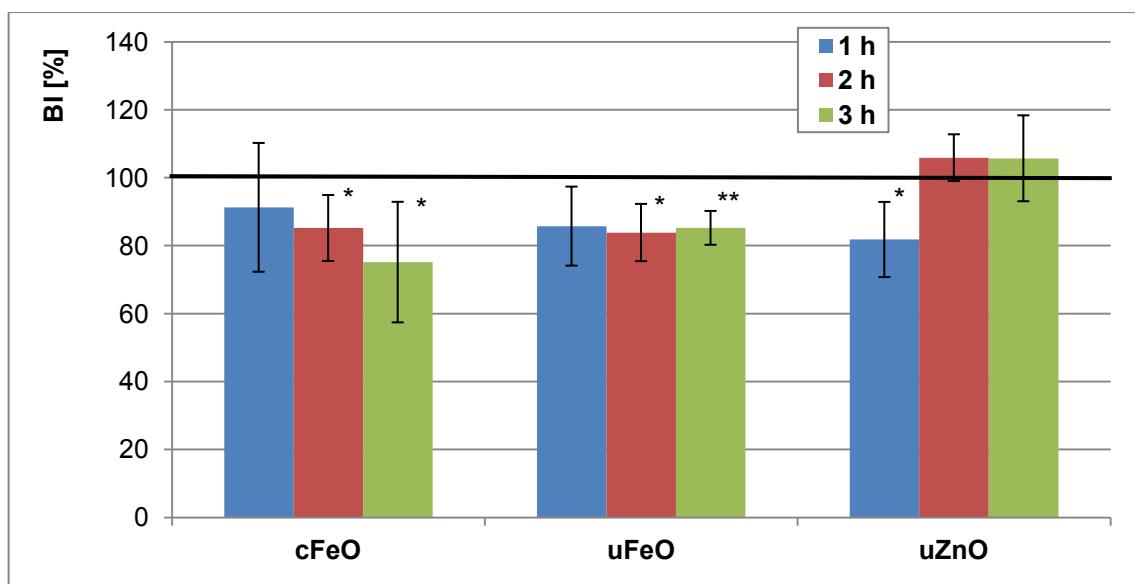


Abb. 4.11: „Oxidative burst“-Aktivität (BI) von PMN nach Inkubation mit 200 mg Metall/l unter Stimulation mit *E.coli* (Kontrolle: 100%).

Nach starker Stimulation mit PMA zeigten alle drei getesteten Metalloxid-NP keine signifikanten Beeinträchtigungen der „oxidative burst“-Aktivität.

Sekretion von Interleukinen

Die Freisetzung von TNF- α , IL-2, -10 und 12 aus PMN wurde von den untersuchten Metalloxid-NP nicht beeinflusst. Es zeigte sich jedoch eine Beeinträchtigung der IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Sekretion.

IL-1 β

Zwar zeigten die Eisenoxid-NP keinen Einfluss auf die Freisetzung von IL-1 β aus PMN. Hingegen verursachten uZnO-NP konzentrationsabhängige Modifizierungen der IL-1 β -Freisetzung aus PMN (**Abb. 4.12**): In Gegenwart von 2 mg Zn/l wurde die Freisetzung von IL-1 β stimuliert ($145,5 \pm 40,6\%$); bei Inkubation mit 20 mg Zn/l blieb die IL-1 β -Konzentration unbeeinflusst ($101,7 \pm 23\%$) und 200 mg Zn/l verursachten eine signifikante Suppression der IL-1 β -Sekretion

($44,6 \pm 21,4\%$). Die konzentrationsabhängige Suppression der IL-1 β -Freisetzung durch uZnO-NP konnte auch nach Inkubationszeiten von 4 h und 6 h gezeigt werden (**Abb. 4.12**).

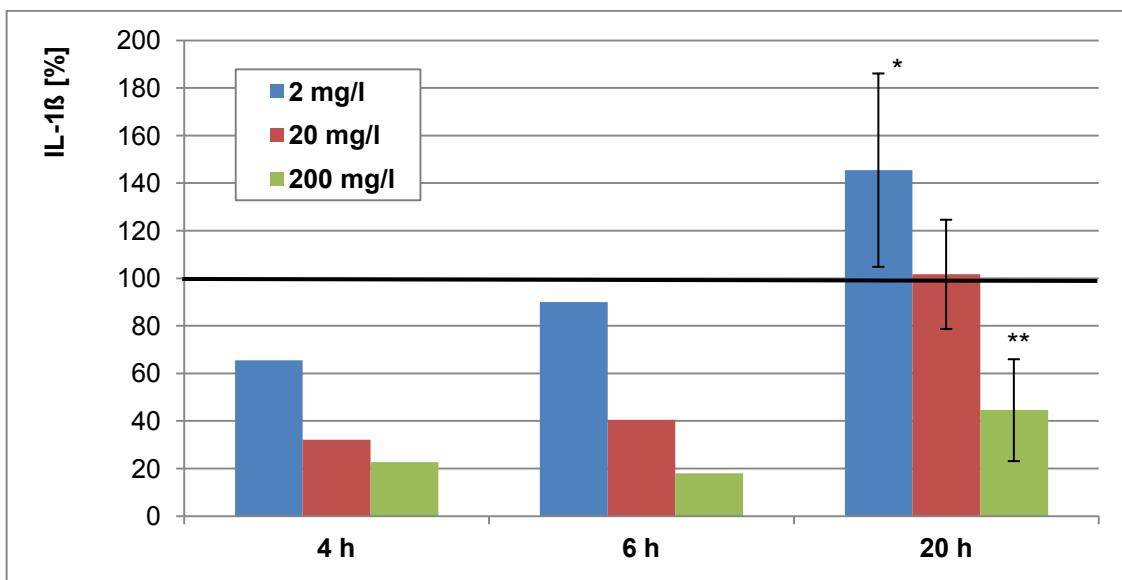


Abb. 4.12: Freisetzung von IL-1 β aus PMN nach 4 h, 6 h und 20 h Inkubation mit uZnO-NP (Kontrolle: 100%).

IL-6

Die Inkubation der PMN mit 200 mg Fe/l von cFeO-NP verursachte eine signifikante Suppression der IL-6-Freisetzung; uFeO-NP führten tendenziell ebenfalls zu einer Abschwächung (**Abb. 4.13**). Die Inkubation mit uZnO-NP bewirkte trotz hoher Variabilität eine insgesamt signifikante Stimulation der IL-6-Sekretion bis zu einer Konzentration von 20 mg/l; bei 200 mg Zn/l wurde eine hoch signifikante ($p \leq 0,01$) Suppression festgestellt.

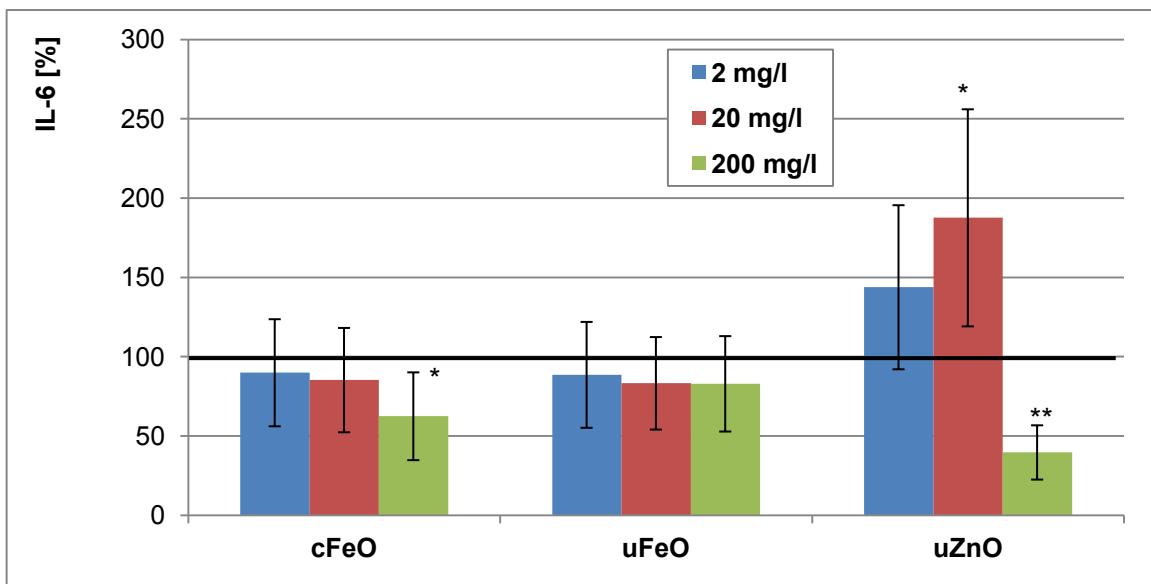


Abb. 4.13: Freisetzung von IL-6 aus PMN nach 20 h Inkubation mit cFeO-NP, uFeO-NP oder uZnO-NP (Kontrolle: 100%).

Die Beobachtung, dass 20 mg/l von uZnO-NP eine höhere IL-6-Freisetzung verursachten als 200 mg/l wurde weiter verfolgt. Die zeit- und konzentrations-abhängigen Untersuchungen zeigten, dass humane Granulozyten nach 8 h Inkubation mit 25 mg Zn/l die größten Mengen an IL-6 sezernierten (**Abb. 4.14**). Für alle untersuchten Konzentrationen spiegelten sich vergleichbare Konzentrations-Zeit-Profile wider.

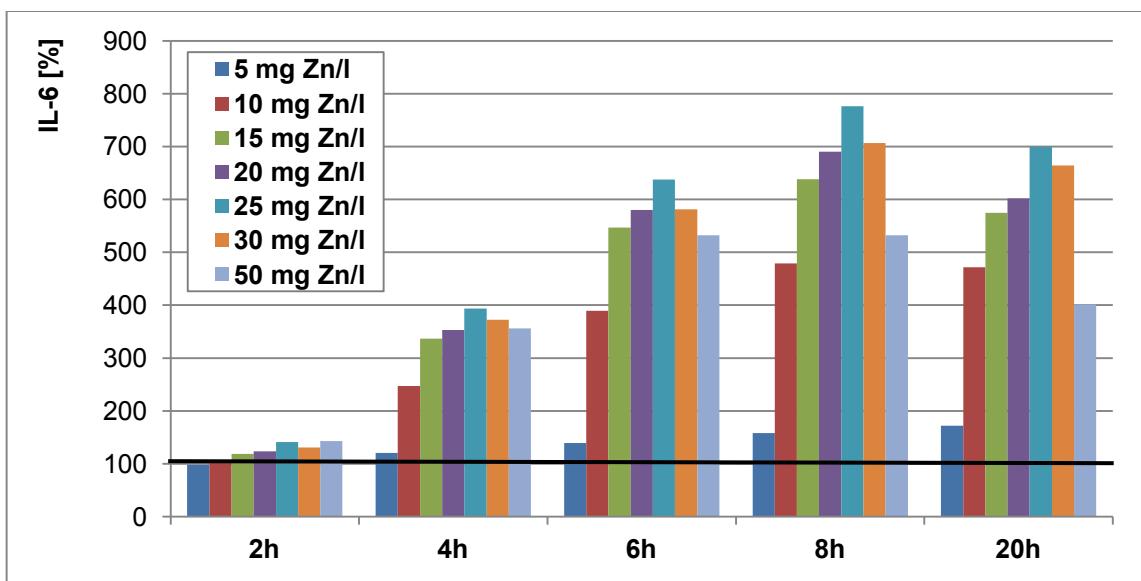


Abb. 4.14: Zeit- und konzentrationsabhängige Freisetzung von IL-6 aus PMN im Vergleich zur Kontrolle (100%) nach Inkubation mit uZnO-NP.

IL-8

Die Inkubation der PMN mit cFeO-NP bewirkte mit sinkender Konzentration eine markante Suppression der IL-8-Freisetzung (**Abb. 4.15**). In Gegenwart von uFeO-NP wurde die Sekretion von IL-8 moderat gedämpft (~20%). Nach Inkubation mit uZnO-NP wurde die IL-8-Sekretion tendenziell leicht geändert.

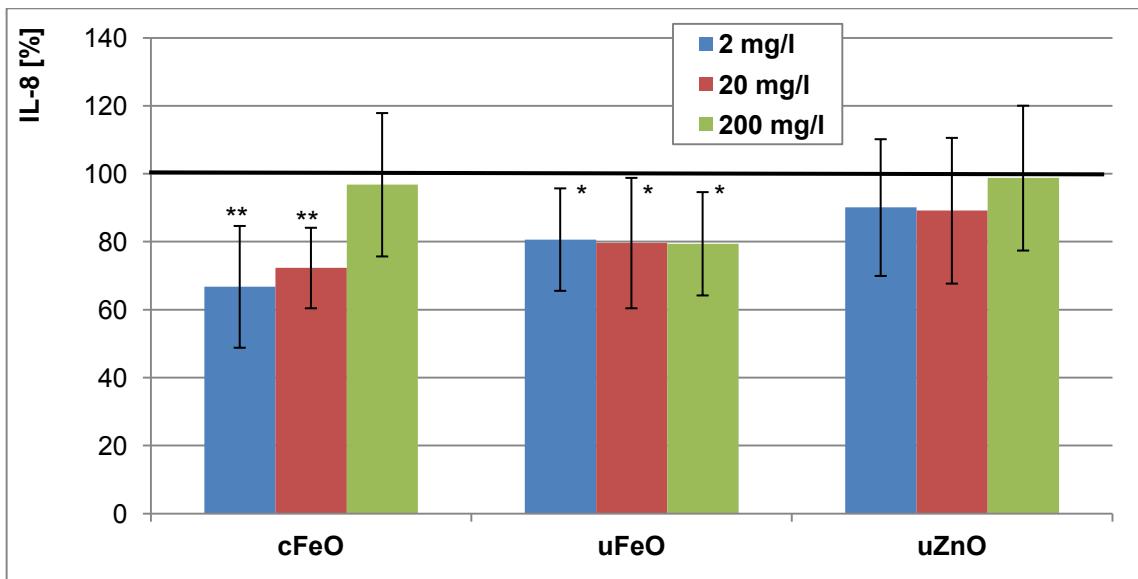


Abb. 4.15: Sekretion von IL-8 aus PMN nach 20 h Inkubation mit cFeO-NP, uFeO-NP oder uZnO-NP (Kontrolle: 100%).

4.3.2 Sirolimus-PLA-NP und Referenzsubstanzen (SRL, PLA-NP)

Inkorporation von SRL-PLA-NP bzw. SRL in humane PMN

Wie in **Abb. 4.16** dargestellt, wurden freies SRL und SRL-PLA-NP aus einer 20 µg/l-Plasma-Lösung in den PMN akkumuliert, wobei bereits nach 5 min Intrazellular-Konzentrationen von 50,1 µg/l für SRL und 37,1 µg/l für SRL-PLA-NP erreicht werden. Die höchste intrazelluläre SRL-Konzentration von 83,7 µg/l wurde in dem Inkubationsansatz mit dem freien Arzneistoff nach 15 min erzielt; nach 30 min wurde ein „steady state“ von ca. 60 µg/l erreicht. Die Intrazellulär-Konzentrationen nach Inkubation mit SRL-PLA-NP blieben über den gesamten Inkubationszeitraum von 3 h relativ stabil bei durchschnittlich 42 µg/l (37,1 - 47,7 µg/l). Am Ende der Inkubationszeit fanden sich in den Inkubationsmedien 2 - 6 µg/l SRL wieder. Alle Kontrollen von Waschlösungen ergaben SRL-Konzentrationen unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (< 2 µg/l).

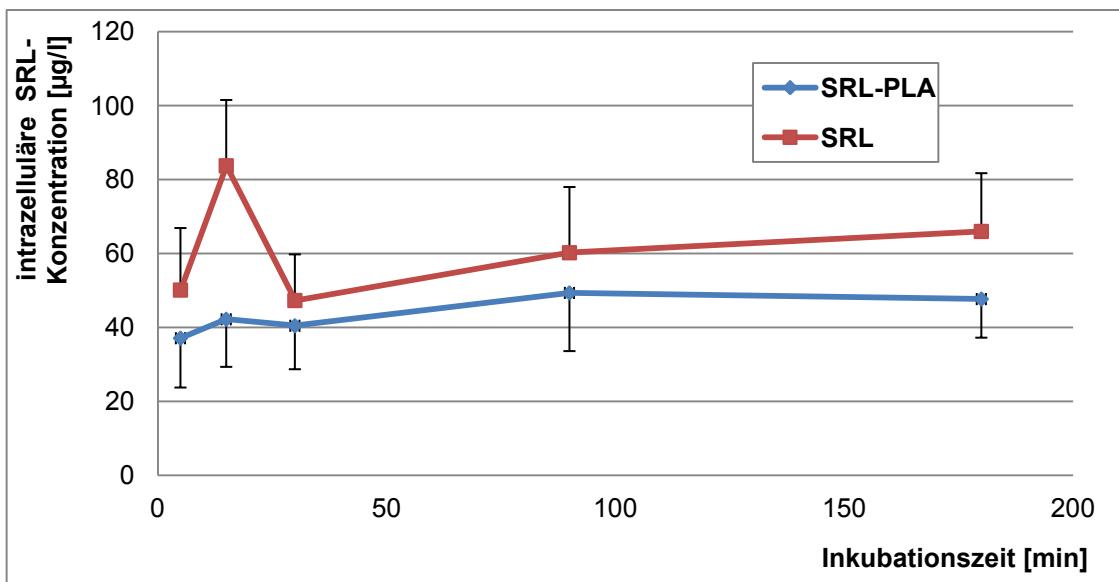


Abb. 4.16: Intrazelluläre Sirolimus-Konzentrationen nach Inkubation mit dem freien Arzneistoff SRL bzw. SRL-PLA-NP (1.04% w/w SRL).

Inkorporation von SRL-PLA-NP bzw. PLA-NP in humane PMN

Unabhängig von Konzentration und Partikelart wurden nach einstündiger Inkubation mit PE-markierten SRL-PLA-NP bzw. PLA-NP durchschnittlich 29% (24,3 - 33,2%) der NP in die PMN inkorporiert (**Abb. 4.17**). Unter Berücksichtigung eigener Messung und Herstellerangaben, denen zufolge eine eingesetzte SRL-Menge von 1000 ng SRL/ml 100 µg/ml SRL-PLA-NP entsprechen sowie 1,00 mg NP etwa $1,2 \cdot 10^{11}$ NP enthalten, entspricht diese Dosis einer Anzahl von etwa $2,4 \cdot 10^{10}$ NP in 1,00 ml Zellsuspension. Da 29% der NP in die PMN inkorporiert wurden und die Zellsuspension $5 \cdot 10^6$ PMN/ml enthielten, ergibt sich, dass innerhalb der Inkubationszeit von 1 h bei 2,00 mg/l ca. 1440, bei 4,00 mg/l 2880 und bei 6,00 mg/l 4320 NP pro Zelle aufgenommen wurden. In diesem Konzentrationsbereich lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der SRL-Konzentration und der Anzahl an intrazellulären NP erkennen (**Abb. 4.17**).

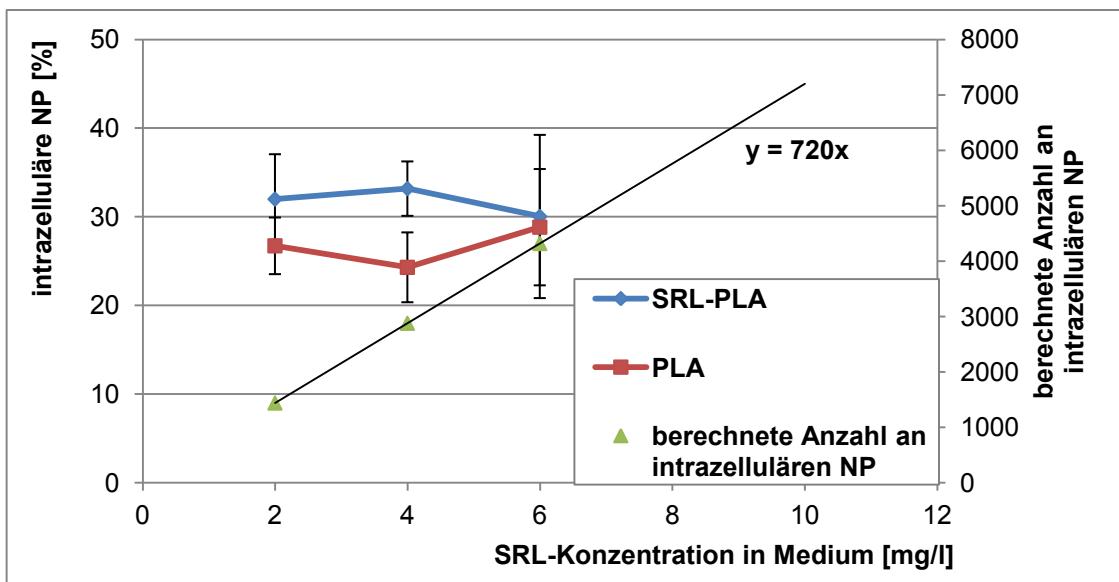


Abb. 4.17: Prozentanteil in PMN inkorporierter PE-markierter PLA-NP und SRL-PLA-NP nach einstündiger Inkubation.

Viabilität

Zu Beginn der Untersuchungen betrug die Viabilität der PMN 96 - 99%. In den NP-freien Kontrollen blieb sie während der Inkubationsperiode von bis zu 19 h unverändert. Weder die SRL-Proben (freier Arzneistoff und SRL-PLA-NP) noch die PLA-NP zeigten einen relevanten Einfluss auf die Zellviabilität ($n=5$).

Chemotaxis

Die chemotaktische Aktivität der PMN in NP-freien Proben blieb über den gesamten Inkubationszeitraum stabil; die LI_C -Werte betrugen nach Stimulation mit fMLP und ZymA durchschnittlich 39,5 ($\pm 6,8$) bzw. 43,2 ($\pm 6,6$). Das spontane Migrationsverhalten der PMN wurde durch Inkubationen mit SRL-PLA-NP, SRL oder PLA-NP nicht beeinflusst. Auch nach Stimulation mit fMLP oder ZymA zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderungen in der chemotaktischen Aktivität.

Phagozytose

Während der gesamten Inkubationsperiode von bis zu 3 h waren ~99% (97 - 100%) der PMN phagozytotisch aktiv. Innerhalb der ersten 2 h induzierten SRL-PLA-NP, SRL und PLA-NP im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Abnahme der phagozytotischen Aktivität (**Abb. 4.18**).

Die Phagozytose-Indizes (PI) reduzierten sich um 27,2% (17 - 37%) nach 1 h und 15,6% (6 - 26%) nach 2 h für SRL-PLA-NP, um 28,1% (19 - 37%) nach 1 h und um 31,5% (14 - 50%) nach 2 h für PLA-NP sowie um 20,0% (7 - 33%) nach 1 und 2 h für SRL. In Gegenwart von SRL-PLA-NP oder SRL stieg die Phagozytose-Aktivität nach 3 h um ca. 20% (5,9 - 33,4%) bzw. um etwa 40% (11,4 - 66,3%). PLA-NP bewirkten ebenfalls einen Zunahme des PI, allerdings ohne Unterschied zur Kontrolle (104,6%). In den folgenden Inkubationszeiträumen glich sich die Phagozytose-Aktivität aller Proben der der Kontrolle an.

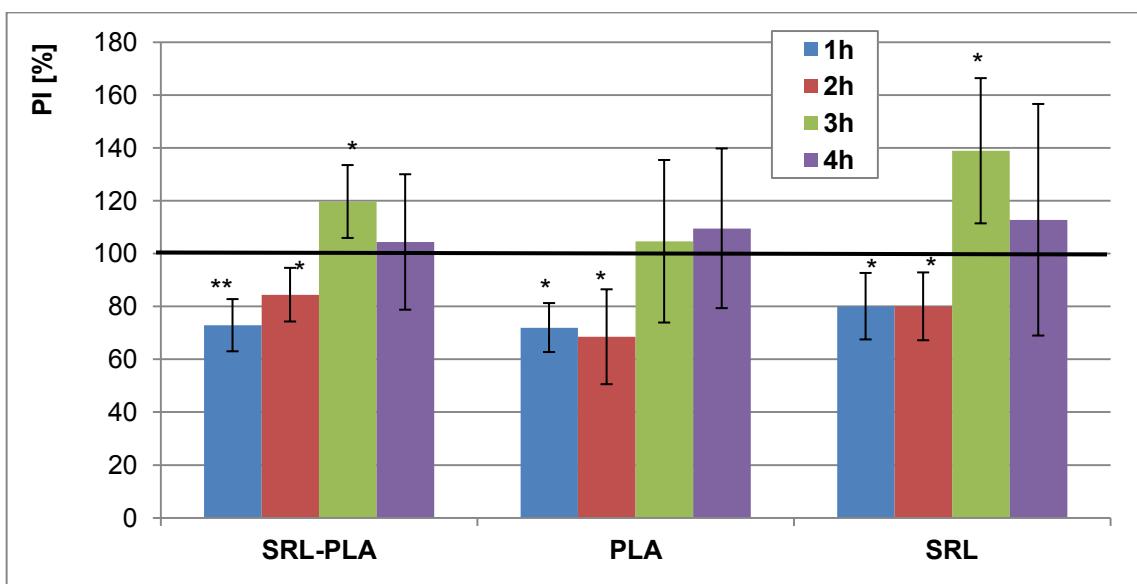


Abb. 4.18: Phagozytose-Indizes (PI) humaner PMN nach Inkubation mit SRL, PLA-NP oder SRL-PLA-NP über 1-4 h (Kontrolle: 100%).

„oxidative burst“

Ohne Stimulation induzierten weder SRL-PLA-NP, PLA-NP noch SRL eine Produktion detektierbarer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies. Nach Stimulation mit fMLP, *E. coli* oder PMA zeigten über den gesamten Inkubationszeitraum durchschnittlich 17%, 87% bzw. 89% der PMN eine „oxidative burst“-Aktivität. Die Gegenwart von SRL-PLA-NP, PLA-NP oder SRL verursachte keine signifikante Veränderung der „oxidative burst“-Aktivität nach Stimulation mit fMLP (99,3 - 107,9%), *E. coli* (96,4 - 101,8%) oder PMA (95,7 - 104,9%).

Freisetzung von Interleukinen

Die Freisetzung von IL-1 β , -6 und -8 aus PMN blieb nach 20 h-Inkubation mit SRL-PLA-NP, SRL und PLA-NP unbeeinflusst.

5 Diskussion

Der Einsatz von NP in der Medizin könnte einen vielversprechenden Fortschritt bedeuten, beispielsweise hinsichtlich dem Arzneistoff-Transport direkt zum Wirkort, der Verbesserung der Löslichkeit schlecht wasserlöslicher Wirkstoffe oder der retardierten Arzneistofffreisetzung verbunden mit einer verringerten Applikationshäufigkeit [18]. Dabei sind NP in der Lage, über verschiedene Wege in lebende Zellen zu gelangen, wobei der genaue Mechanismus noch weitgehend unbekannt ist. Neben der unspezifischen und Rezeptor-vermittelten Endozytose wird auch die Phagozytose als möglicher Inkorporationspfad diskutiert [50, 92-101]. Anscheinend besteht ein Zusammenhang zwischen dem Aufnahmemechanismus und der NP-Art bzw. dem Zelltyp [93, 100, 102]. In PMN werden NP vermutlich mittels Phagozytose inkorporiert [94]. Obwohl PMN als robuste Zellen bekannt sind [103-106], ist es unerlässlich, die Effekte von NP auf PMN zu kennen, da sie eine entscheidende Rolle im Entzündungsgeschehen spielen und mit partikulären Fremdstoffen einschließlich NP früh in Kontakt treten. Sie nehmen NP auf und sind in die Elimination partikulärer Xenobiotika involviert [8, 57-59, 71].

5.1 Messungen mit NanoSight LM10

NTA ist eine direkte, schnelle und robuste Messmethode, mit der NP in verschiedenen flüssigen Dispersionsmitteln visualisiert, großenvermessen und gezählt werden können. Sie zeichnet sich durch kurze Probenvorbereitungszeiten und kleine Probenmengen (250 µl) sowie niedrige Kosten und eine einfache Handhabung aus. Außerdem ist keine Gerätekalibrierung notwendig. NTA ermöglicht die simultane Messung der Partikelgröße und der relativen Lichtintensität, welche jedes einzelne Partikel streut, so dass ähnlich große NP mit verschiedenen Refraktionsindizes voneinander unterscheidbar sind. Bislang wurden zur Interpretation nur die eingesetzten NP-Charakteristika herangezogen. Mittels NTA ist die Messung der NP direkt im flüssigen Inkubationsmedium möglich. NTA führt zu analogen Messergebnissen wie die Photonенkorrelationsspektroskopie (PCS) und Elektronenmikroskopie (EM); die EM benötigt jedoch ein Hochvakuum und ist mit einer komplexeren Probenaufarbeitung und höheren Kosten verbunden. Im Vergleich zur PCS bietet NTA eine höhere Auf-

lösung multimodaler Proben. Die PCS misst lediglich die durchschnittliche Partikelgrößenverteilung, weshalb sie für die Betrachtung monodisperser Proben geeignet ist, jedoch Schwierigkeiten bei der Messung polydisperser Proben aufweist, die mit NTA problemlos messbar sind. Allerdings bietet die PCS die Möglichkeit, kleinere Partikelgrößen zu bestimmen als die NTA. Daneben gestaltete sich die Messung von Lösungen mit zu vielen bzw. zu großen Proteinen mittels NTA als sehr schwierig. Des Weiteren könnte bei der NTA-Messung die Probenaufbereitung die Partikelgrößenverteilung beeinflussen. Zudem ist NTA eine relativ neue Methode, mit der bisher nur begrenzte Erfahrungen vorliegen [5, 79, 81-85, 107].

Da alle getesteten NP einen Durchmesser >50 nm aufwiesen und die Proben in biologischen Matrices häufig polydispers sind, stellte die NTA für die Charakterisierung der Größe, Größenverteilung und Anzahl der NP in biologischen Matrices eine geeignete Messtechnik dar.

Die Größe und Größenverteilung der NP spielt eine entscheidende Rolle bei deren Interaktionen mit lebenden Systemen. Sie nehmen Einfluss auf deren Zirkulation, Halbwertszeit im Blut und das Aufnahmeverhalten von Zellen. NP mit einem Durchmesser <100 nm passieren Zellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose; NP <40 nm können in Zellkerne eindringen und NP <35 nm die Blut-Hirn-Schranke überwinden [8, 83]. In einem biologischen Medium, wie beispielsweise Plasma, lagern sich Proteine an die NP-Oberfläche an und bilden eine sogenannte Proteinkorona, die die weitere Verteilung der Partikel im Organismus beeinflusst. Das gebildete Proteinmuster ist abhängig von der Proteinart, der Konzentration der Plasmaproteine, der NP-Art, deren Größe, Hydrophobizität und funktionellen Gruppen an der NP-Oberfläche, wobei Albumin und Fibrinogen vermutlich an alle NP adsorbieren [108-115]. Obwohl die Adsorption der Plasmaproteine an NP ein sehr schneller Prozess ist, findet offenbar ein permanenter Wechsel des Proteinmusters statt. Zu Beginn adsorbierten an die NP-Oberfläche Proteine mit hoher Konzentration, die jedoch schnell durch Proteine mit geringer Konzentration, aber höherer Affinität ausgetauscht werden [108, 109, 114, 116, 117]. Deshalb sind Aussagen über die zeitlichen Änderungen der tatsächlichen Größenverhältnisse für Zytotoxizitätsuntersuchungen von entscheidender Bedeutung. Mittels NTA wurden die Kinetiken der Aggregation und Koronabildung erstmals direkt im Inkubat verfolgt. Das Adsorp-

tionsgleichgewicht der Plasmaproteine auf SRL-PLA-NP und PLA-NP wurde innerhalb weniger Minuten erreicht (siehe **Abb. 4.1** S. 28). Dies korreliert mit den Beobachtungen von VITTAZ et al. und DENG et al., welche die Opsonisierung von PLA-NP und verschiedenen Metalloxid-NP innerhalb von 5 min beobachteten [116, 118]. Des Weiteren ermöglichte die NTA die Bestimmung des Partikeldurchmessers in flüssigen Medien, wobei in dieser Arbeit neben wässrigen Dispersionsmitteln wie PBS auch Matrices mit Proteinzufluss (z.B. Biseko[®], Albumin, Fibrinogen) sowie biologische Medien wie Plasma eingesetzt wurden und reproduzierbare Ergebnisse lieferten.

Für die Risikoabschätzung nanopartikulärer Substanzen ist die Dosis von ausschlaggebender Bedeutung. Viele Studien beziehen sich auf die Masse (z.B. mg/kg Körpergewicht) bzw. Konzentration (z.B. mg/l) [43, 51, 119-121]. Jedoch zeigten einige Untersuchungen, dass diese nicht die einzigen bestimmenden Parameter sind. Neben der Masse und Konzentration spielen die Partikeloberfläche, deren Ladung und Reaktivität [93, 122] sowie die Anzahl der NP eine entscheidende Rolle [5, 10, 12, 123, 124]. NTA erlaubt erstmals die Messung der Partikelanzahl in flüssigen Dispersionen. Durch die gleichzeitige Eignung der Messtechnik für mono- und polydisperse Proben wurden Partikelzahlen in wässrigen Medien wie PBS, in Medien mit Proteinzufluss (z.B. Biseko[®]) als auch in biologischen Matrices wie humanem Plasma ermittelt.

5.2 Resovist[®]

Resovist[®] (cFeO-NP) stellt ein bereits in der Diagnostik zur Darstellung fokaler Leberläsionen eingesetztes MRT-Kontrastmittel dar. Nach Angaben des Herstellers gehen von Resovist[®] keine toxischen Effekte aus. Nach Abbau der Carboxydextran-Hülle löst sich der NP-Kern auf und das Eisen wird dem körpereigenen Pool zugeführt, so dass das nanopartikuläre Eisen physiologisch verwertet wird [14]. Jedoch sind bisher keine Studien zu möglichen Effekten des Diagnostikums auf humane Granulozyten und somit auf eine wichtige Säule der primären Immunabwehr veröffentlicht. Als Referenzsubstanzen zu den umhüllten FeO-NP wurden nicht-ummantelte FeO-NP, um mögliche Effekte der Hülle zu erkennen, sowie die für ihre Zytotoxizität bekannten ZnO-NP als Positivkontrollen gewählt [43, 51, 119, 122, 125-127].

5.2.1 NTA-Messung

Bei der zunächst durchgeführten Größencharakterisierung der Metalloxid-NP konnten die vom Hersteller angegebenen Durchmesser (cFeO-NP (Resovist®): 60 - 80 nm, uFeO-NP: 20 - 30 nm, uZnO-NP: 50 - 70 nm) lediglich für cFeO-NP in PBS, humaner Albumin- und Fibrinogen-Lösung bestätigt werden (siehe **Abb. 4.2** S. 29). Die Metalloxide uFeO-NP und uZnO-NP wiesen in proteinfreien Medien um vielfach größere Modal- und Mittelwerte auf. Diese Größenzunahme der nicht-ummantelten NP ist auf Aggregationsbildung zurückzuführen. Es ist davon auszugehen, dass die Carboxyextran-Hülle von cFeO-NP nicht nur der Biokompatibilität, sondern auch als Aggregationsschutz dient. In 10% Biseko®/PBS und humanem Plasma zeigten cFeO-NP hingegen signifikant größere Partikeldurchmesser als in PBS oder in humaner Albumin- bzw. Fibrinogenlösung. Theoretisch könnte diese Größenzunahme einerseits in Aggregationseffekten oder aber der Bildung einer Proteinkorona begründet liegen [10, 40, 128]. Bei einer Aggregation lagern sich die Partikel zusammen, so dass die Nanopartikelanzahl kleiner wird. Wenn eine Korona gebildet wird, lagern sich an die Oberfläche der NP Proteine an, so dass sich dabei die Anzahl der Partikel nicht verändert. Im Fall von cFeO-NP unterschieden sich die Partikelzahlen in allen getesteten Medien nicht signifikant voneinander (siehe **Abb. 4.4** S. 31), woraus auf die Ausbildung einer Korona geschlossen werden kann. Dabei kommen Albumin und Fibrinogen anscheinend nicht als aggregationsbildende Proteine in Betracht, da in diesen Medien keine Zunahme des Partikeldurchmessers verzeichnet wurde (siehe **Abb. 4.2** S. 29). In anderen Studien wurden neben Albumin und Fibrinogen auch IgG und ein bisher nicht klassifiziertes 70 kDa-Protein als adsorbierende Proteine auf Carboxyextran-ummantelten FeO-NP identifiziert [129]. Die Adsorption von Plasmaproteinen (meist Immunglobuline, Bestandteile des Komplementsystems oder andere Blutserumproteine) an die Oberfläche von NP wurde bereits vielfach festgestellt [10, 40, 130]. Durch diese sogenannte Opsonisierung nehmen die NP an Größe zu und ihre Oberflächenladungen verändern sich, so dass sich ihre physiko-chemischen Eigenschaften verändern und sie als „trojanisches Pferd“ in verschiedene Körperzellen gelangen und unbekannte Effekte auslösen können [37]. Die Durchmesser von uFeO-NP und uZnO-NP zeigten nach Inkubation in proteinangereicherten Lösungen im Vergleich zu proteinfreien Medien keine

Größenzunahme, so dass die Bildung einer Proteinhülle um diese Metalloxide nicht beobachtet wurde. Bis heute liegen nur wenige weitergehende Untersuchungen vom Einfluss funktioneller Gruppen auf die Partikeloberfläche vor [112].

5.2.2 Effekte und Wirkungen

Die Oberfläche von NP (z.B. Art der Umhüllung, Adsorption von Plasmaproteinen) kann die weitere Verteilung der NP im Organismus, die Aufnahme in Zellen und somit auch die Viabilität der Zellen maßgeblich bestimmen [37, 47, 48, 50]. Entsprechend beobachteten BERRY et al., dass Dextran-umhüllte NP von humanen Fibroblasten endozytiert werden und deren Zelltod verursachten, wohingegen Albumin-derivatisierte Partikel eine Zellproliferation auslösten [50]. Ebenso induzierten ionische Carboxydextran-ummantelte Eisenoxid-NP (100-2000 mg Fe/l) keine Apoptose humaner Monozyten; wohingegen nichtionische Dextran-ummantelte NP (>500 mg Fe/l) deren Viabilität wesentlich beeinträchtigten, obwohl der intrazelluläre Eisengehalt nach Inkubation mit den nichtionischen NP kleiner war [47]. Eine Inkorporation von Carboxydextran-umhüllten FeO-NP (cFeO-NP) wurde bereits in verschiedenste Zelllinien wie z.B. Maus-makrophagen [100, 131, 132], humane Monozyten [47], mesenchymalen Stammzellen [133], Brustkrebszellen [132] und Fibroblasten [48, 50, 134] nachgewiesen. Dabei blieb die Viabilität humaner Monozyten über 4 h und mesenchymaler Stammzellen über 24 h durch cFeO-NP unbeeinflusst [47, 133]. Nach Aufnahme von Carboxydextran-ummantelten FeO-NP in Makrophagen wurden deren Proliferation und Viabilität ebenfalls nicht modifiziert, obwohl deren Phagozytose-Aktivität bei Konzentrationen von 10 bzw. 100 mg Fe/l sank und die Migration sich bei 100 mg Fe/l verstärkte [131]. Dies korreliert mit den Ergebnissen dieser Arbeit. In Gegenwart von cFeO-NP blieb die Viabilität der PMN unbeeinflusst, die Phagozytose-Aktivität wurde jedoch dosisabhängig reduziert (siehe **Abb. 4.8** S. 35). Das veränderte Sekretionsprofil von IL-6 und IL-8 könnte sich in einer Beeinflussung der Chemotaxis und des „oxidative burst“ widerspiegeln. So zeigten die mit NP-beladenen PMN nach Stimulation mit fMLP eine leicht gesteigerte Migration (siehe **Abb. 4.7** S. 34) und nach Stimulation mit *E.coli* eine Suppression der „oxidative burst“-Aktivität (siehe **Abb. 4.11** S. 37). Das unterschiedliche Migrationsverhalten nach Stimulation mit ZymA oder fMLP

liegt vermutlich in den verschiedenen Mediationswegen der Stimulanzien begründet. ZymA aktiviert die Migration der Neutrophilen über den „toll-like-receptor“ (TLR) 2, wohingegen fMLP die Chemotaxis über den Formyl-Methionin-(f-met) Rezeptor stimuliert [135-139]. Auch die Aktivierung des „oxidative burst“ durch *E.coli* bzw. PMA erfolgt über zwei verschiedene Signallewege, der p38 „mitogen-activated protein kinase“ (p38 MAPK) und der Proteinkinase C (PKC) [140-145]. Dies legt die Vermutung nahe, dass cFeO-NP Einfluss auf die chemotaktische und „oxidative burst“-Aktivität der PMN über den f-met-Rezeptor bzw. die p38 MAPK nehmen.

Ähnlich wie cFeO-NP wurden nach Inkubation der Neutrophilen mit uFeO-NP keine Effekte auf die Viabilität und lediglich eine leichte Suppression der Phagozytose (siehe **Abb. 4.9** S. 35), „oxidative burst“-Aktivität (siehe **Abb. 4.11** S. 37) und IL-8-Freisetzung (siehe **Abb. 4.15** S. 40) beobachtet. Im Gegensatz zum cFeO-NP, welches nach einstündiger Inkubation ein gesteigertes Migrationsverhalten induzierte, wurde die Chemotaxis der PMN in Gegenwart von uFeO-NP nicht beeinflusst (siehe **Abb. 4.7** S. 34). Möglicherweise wird die Hülle von cFeO-NP erst zu einem späteren Zeitpunkt vom Kern getrennt, so dass das Carboxyextran der bestimmende Faktor im Migrationsverhalten darstellen könnte.

Über die Zytotoxizität von Eisenoxid-NP sind bereits mehrere Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen veröffentlicht. HUSSAIN et al. und KARLSSON et al. beobachteten eine leichte bzw. keine toxischen Einflüsse von uFeO-NP auf Rattenleber- [146], Lungenepithel- [127] bzw. Mausneuroblastomzellen [119] hinsichtlich deren Morphologie, Funktion der Mitochondrien, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Schädigung der DNA oder Apoptoseerscheinungen. Auch CHENG et al. konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den exponierten und Kontrollzellen verzeichnen [147]. Im Gegensatz dazu beobachteten einige Wissenschaftler in Gegenwart von uFeO-NP eine Reduktion der Zellviabilität, eine Veränderung der Zellmorphologie, eine gesteigerte ROS-Produktion und ein unverändertes IL-6- bzw. IL-8-Sekretionsprofil [48, 50, 52, 134, 148]. Ein möglicher Erklärungsansatz dieser widersprüchlichen Ergebnisse bietet der Zelltyp. BRUNNER et al. beobachteten ein zelltypspezifisches Verhalten. Nach der Inkubation von humanen Mesotheliomzellen mit uFeO-NP wur-

de die Viabilität stark reduziert, wohingegen die Viabilität von Fibroblasten durch dieselben NP unbeeinflusst blieb. Die Autoren nahmen an, dass die höhere Sensitivität der Mesotheliomazellen auf die höhere Metabolisierungsaktivität der entarteten Zellen zurückzuführen ist, so dass vermutlich größere Mengen der uFeO-NP inkorporiert wurden [51]. Deshalb sollte die Bestimmung der in PMN aufgenommenen Eisenoxid-NP-Mengen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zinkoxid-NP sind für ihre Toxizität auf verschiedene Zelllinien bekannt [43, 51, 119, 120, 122, 125-127, 149]. REDDY et al. stellten fest, dass mikrometergroße ZnO-Partikel keine Effekte auf die Viabilität von T-Zellen haben, wohingegen ZnO-NP ab einer Konzentration von ≥ 5 mM eine signifikante Reduktion verursachten [120]. Gegenüber Fibroblasten wiesen ZnO-NP im Vergleich zu FeO-NP und TiO₂-NP die höchste Toxizität auf [51]. ZnO-NP wirkten auf Makrophagen und Epithelzellen ebenfalls zytotoxisch [125]. In humane Lungenepithelzellen induzierten ZnO-NP DNA-Schäden und oxidativen Stress [127]. PARK et al. beobachteten eine dosisabhängige Induktion von Apoptose und ROS-Produktion in humanen Alveolarepithelzellen, obwohl keine intrazelluläre NP-Aufnahme festgestellt wurde [149]. In humane Bronchoalveolarkarzinom- und Mausneuroblastomazellen wurde hingegen eine ZnO-NP-Inkorporation beobachtet, die in einer Reduktion der Viabilität und mitochondrialen Funktion sowie der Induktion von oxidativen Stress und DNA-Schäden resultierte [119, 122]. Nach der Exposition von Mäusen mit ZnO-NP wurde eine Aufnahme von Zink in Nieren, Pankreas und ins Knochenmark beobachtet [54]. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass uZnO-NP auch auf humane PMN akut toxische Effekte ausübten. Sie verminderten die Viabilität (siehe **Abb. 4.5** S. 32) und Phagozytoserate (siehe **Abb. 4.10** S. 36) und veränderten die „oxidative burst“-Aktivität (siehe **Abb. 4.11** S. 37) sowie die Freisetzung von IL-1 β (siehe **Abb. 4.12** S. 38) und IL-6 (siehe **Abb. 4.13** S. 39). Dabei war die verminderte Sekretion von IL-1 β nicht Folge der abnehmenden Zellpopulation, da bereits nach 4- und 6-stündiger Inkubation die Freisetzung des Zytokins vermindert war (siehe **Abb. 4.14** S. 39) und die Zellviabilität durch uZnO-NP erst nach ca. 7 - 9 h beeinträchtigt wurde. Entgegen Literaturangaben [51, 125] ist die Zytotoxizität von uZnO-NP auf humane PMN nicht assoziiert mit der Auflösung von ZnO zu

Zink(II)-Ionen im Inkubationsmedium, da nach Inkubation der Zellen mit korrespondierenden Zink(II)-Ionen Zn^{2+} (ZnSO_4) zwar eine schwache Viabilitätsreduktion beobachtet wurde, jedoch war diese weniger stark ausgeprägt als nach Exposition der Zellen mit nanopartikulärem uZnO (siehe **Abb. 4.6** S. 33). Dieses Ergebnis erscheint unter der Betrachtung, dass nach 120 min vom ZnO lediglich 2 - 4% in künstlichem Magensaftsekret bzw. ~14% in Kulturmedium zu Zn^{2+} dissoziieren, nachvollziehbar [54, 128]. Der inflammatorische Effekt von ZnO-NP zeigte sich reversible. Nach der *In-vivo*-Exposition von Ratten mit ZnO-NP-Suspensionen wurde initial (24 h, 1 Woche) eine erhöhte Zytotoxizität festgestellt; nach 1 und 3 Monaten konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen beobachtet werden [43]. In den eigenen Untersuchungen wurde eine vorübergehende Zytotoxizität nach der *Ex-vivo*-Inkubation von humanen Neutrophilen nicht beobachtet, jedoch sollten diese Ergebnisse in *In-vivo*-Langzeituntersuchungen überprüft werden.

5.2.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zur Risikoabschätzung der drei Metalloxid-NP wurde die Dosis in den Untersuchungen auf die Metall-Konzentration (mg/l) bezogen. Anscheinend spielt die Konzentration allein nicht die entscheidende Rolle, da bei gleicher Metallkonzentration die physiologischen Funktionen der humanen PMN durch cFeO-NP und uFeO-NP lediglich leicht beeinträchtigt wurden, wohingegen uZnO-NP akut toxische Effekte auf die Neutrophilen ausübten. Auch die Größe der Partikeloberfläche kann nicht der ausschlaggebende Parameter für die Toxizität sein, da die kleinsten Partikel (cFeO-NP: 126 nm Partikeldurchmesser in humanem Plasma) verbunden mit der größten Oberfläche nicht die größte Toxizität aufwiesen. Obwohl beide nicht-umhüllten Metalloxide uFeO-NP und uZnO-NP in humanem Plasma ähnliche Partikelgrößen (~200 nm) aufwiesen, zeigten sie gegenüber den PMN ein unterschiedliches Toxizitätspotenzial. Neben der Konzentration, Ladung und Oberflächengröße könnte die Anzahl der NP eine entscheidende Rolle spielen [10, 12, 123, 124]. Jedoch konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Partikelanzahl und deren Toxizität bei den getesteten Metalloxid-NP ebenfalls nicht bestätigt werden. Die Messungen der Partikelanzahl mittels NTA ergaben für cFeO-NP eine ca. 6,5-fach größere NP-Menge als für uFeO-NP und uZnO-NP (siehe **Abb. 4.4** S. 31). Ein weiterer interessan-

ter Aspekt wurde von JENG et al. beschrieben [119]. Sie beobachteten, dass sich abhängig vom Typ des Metalloxids einige NP an die Zelloberfläche (extra- bzw. interzellulär) und andere NP in die Zellen (intrazellulär) lagern. Möglicherweise liegt die unterschiedliche Toxizität der untersuchten Metalloid-NP in einem unterschiedlichen Aufnahmeverhalten begründet. So wäre denkbar, dass uZnO-NP in humane Granulozyten inkorporieren, wohingegen sich die Eisenoxid-NP interzellulär aufhalten. Dieser Gesichtspunkt sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Zusätzlich könnte die unterschiedliche Toxizität der getesteten Metalloid-NP auch in anderen Eigenschaften (z.B. Gitterstruktur, Ladung, NP-Typ) begründet liegen [36, 51, 119]. Während Zinkoxidkristalle in einem hexagonalen Gittersystem angeordnet sind, weist Eisenoxid kubische Gitterstrukturen auf. Um diese Theorie zu bestätigen, wären weitere Untersuchungen zu einer möglichen Korrelation der Zytotoxizität von NP und ihrer Gitterstruktur unumgänglich.

5.3 SRL-PLA-NP

SRL ist ein immunsuppressiv wirkender Arzneistoff, der die Proliferation von T-Zellen hemmt und die T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion des Transplantates unterbindet. Des Weiteren supprimiert SRL die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen [22]. Momentan sind NP-basierte DDS mit SRL in der Erforschung als pharmakotherapeutisches Medium für die Vorbeugung von T-zellassozierten Transplantatabstossungsreaktionen und Restenosen von vaskulären Stents [19, 20, 25, 26, 150-152]. Dessen ungeachtet ist das Einbringen körperfremder Partikel in den menschlichen Organismus auch mit Wechselwirkungen zwischen den NP und dem Immunsystem verbunden. So wurde 15 min nach der i.v.-Applikation von NP in Mäusen eine Akkumulation zahlreicher Granulozyten und Monozyten verzeichnet [72]. VERRECCHIA et al. beobachteten die Aufnahme von PLA-NP durch das Phagozyten-Monozyten-System [153]. Auch nach der Exposition von Meerschweinchen mit PLA-NP waren hauptsächlich PMN als phagozytierende Zellen aktiv [71]. Da nur wenige Untersuchungen mit dem zusammengesetzten Produkt SRL-PLA-NP veröffentlicht sind, sollte der Einfluss dieser NP auf die physiologischen Funktionen humaner PMN untersucht werden. Um mögliche toxische Effekte genauer charakterisieren zu kön-

nen, wurden die Einzelkomponenten SRL und PLA-NP als Referenzsubstanzen genutzt.

5.3.1 NTA-Messung

Bei der zunächst durchgeföhrten Größencharakterisierung von SRL-PLA-NP und PLA-NP wurde in PBS, 10% Biseko®/PBS, humanem Plasma sowie Fibrinogen-Lösung ein geringerer Durchmesser (~220 nm) als der vom Hersteller angegebene (250 nm) ermittelt, jedoch war dieser Unterschied für die Messung nicht ausschlaggebend (siehe **Abb. 4.3** S. 30). Dagegen stellte sich die in humarer Albumin-Lösung (40 g/l) gemessene Partikelgröße (120 - 130 nm) als signifikant kleinere dar. Anscheinend ist der Durchmesser dieser NP abhängig von der Albumin-Konzentration im Inkubat. Oberhalb von 2,5 g/l kann der Durchmesser der PLA-NP kontinuierlich bis zu einem Wert von 100 nm abnehmen [154]. LODE vermutete, dass die Abnahme der Partikelgröße im Opsonisierungsprozess begründet liegt. Die Adsorption von Proteinen führt vermutlich zu einer gleichsinnigen Aufladung mit anschließender Reduktion der Aggregate durch Abstoßung, so dass Proteine die Agglomerationseffekte abschwächen könnten [113, 155, 156].

5.3.2 Erfassung der Inkorporation von NP in PMN

Die Inkorporation der SRL-PLA-NP in humane PMN wurde mit zwei verschiedenen Verfahren (LC-MS-MS, FACS) nachgewiesen und quantifiziert. Mittels LC-MS-MS wurde die Anreicherung von SRL-PLA-NP sowie SRL in die Zellen ermittelt. Die Aufnahme von PLA-NP und SRL in verschiedene Zellarten wurde schon in früheren Studien beobachtet, wobei jedoch der zugrundeliegende Mechanismus noch weitgehend unbekannt ist. In dendritische Zellen und Mausmakrophagen wurden PLA-NP anscheinend durch Phagozytose [55, 157] inkorporiert. Der Aufnahmeweg von SRL in verschiedene Krebszelllinien und humane Granulozyten ist bislang unbekannt [24, 158, 159]. Der Absorptionsmechanismus von NP in Zellen ist abhängig vom Zelltyp, der NP-Spezies sowie deren Größe [92, 93, 96, 100, 102, 160]. Das in dieser Arbeit durchgeföhrte intrazelluläre pharmakokinetische Monitoring offenbarte einen schnellen Einstrom des Arzneistoffes SRL (siehe **Abb. 4.16** S. 41). Nach 15 min wurde im Ver-

gleich zur extrazellulären Konzentration eine vierfach größere intrazelluläre Maximalkonzentration ($c_{\max} \sim 80 \mu\text{g/l}$) erzielt, was auf einen aktiven Aufnahmemechanismus deuten könnte. Nach 30 min scheint sich die Intrazellular-Konzentration durch ein Ausströmen des Arzneistoffes dem „steady-state“-Level (dreifache Mediumkonzentration) anzugeleichen. Diese Interpretation wird gestützt durch die ermittelten Intrazellular-Konzentrationen von SRL-PLA-NP. Das Konzentrations-Zeit-Profil der NP zeigte kein Maximum und wies dieselbe „steady-state“-Konzentration wie der freie Wirkstoff SRL auf. Anscheinend setzen die SRL-PLA-NP den Arzneistoff SRL in einer retardierten Rate frei. Des Weiteren fanden sich in den Umgebungsmedien lediglich geringe Mengen an SRL (2 - 6 $\mu\text{g/l}$). Vom pharmako- und toxikodynamischen Standpunkt aus gesehen könnten diese abgeflachten, aber noch effektiven Arzneistoffkonzentrationsprofile mit weniger ausgeprägten Nebenwirkungen assoziiert sein und demzufolge hervorragend für die Kontrolle und den Erfolg einer Therapie in Betracht kommen. Diese Ergebnisse führen zu der Frage nach den Aufnahmeraten bzw. der intrazellulären Anreicherung der NP.

Zur Abschätzung der Ausprägung der NP-Inkorporation gelang es in dieser Arbeit erstmals die Aufnahme von PLA-NP durch humane PMN direkt im Inkubat zu verfolgen. In Kooperation mit der Firma micromod Partikeltechnologie GmbH wurde die Markierung der SRL-PLA- und PLA-Partikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE erreicht. Da der zweite Fluoreszenzkanal des Durchflusszytometers Proben im Spektralbereich um 585 nm vermisst und das Emissionsmaximum von PE bei 575 nm liegt, konnte die Inkorporation der markierten NP in humane PMN direkt und wenig komplex mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden (siehe **Abb. 4.17** S. 42). Dabei wurde eine ca. 30%-ige Aufnahme der PE-markierten SRL-PLA-NP und PLA-NP in humane Granulozyten beobachtet. Innerhalb von 60 Minuten wurden bis zu 4320 NP mit einem Durchmesser von ~230 nm in eine einzelne Zelle aufgenommen (**Abb. 5.1** S. 55). Eine weitere Inkorporation während längerer Inkubationsperioden scheint bis zum Eintreten einer Sättigung möglich [71, 161-163].

GREF et al. beobachteten die maximale Aufnahme von 2×10^4 PLA-NP/PMN (Durchmesser ~160 nm) [161]. In der Annahme eines empirischen Modells von zufällig dichtgepackten monodispersen kugelförmigen NP in einem großen

Phagosom [164] würde das Gesamtvolumen V_{tot} aller NP mit dem Radius von 80 nm nach **Gleichung 5.1** etwa

$$V_{tot} = \frac{V_{NP} \cdot n}{f} \approx \underline{\underline{76,6 \mu\text{m}^3}}$$

Gleichung 5.1: Berechnung des Gesamtvolumens inkorporierter NP

betrugen, wobei V_{NP} das Volumen einer NP-Kugel ($\sim 2,1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$), n die NP-Anzahl und f einen Dichtekoeffizienten für sehr lockere Kugelpackungen (~ 0.56) darstellen.

Unter Berücksichtigung des Zellvolumens eines PMN von $300 - 700 \mu\text{m}^3$ [165] erscheint dieses errechnete Gesamtvolume plausibel. Die in dieser Arbeit getesteten NP mit einem Radius von 115 nm würden dieses Gesamtvolume nach der Inkorporation von ~ 6700 NP erreichen. Unter der Annahme eines weiteren linearen Zusammenhangs bei Konzentrationen oberhalb von 6 mg SRL/l würde dieses Sättigungslimit nach einstündiger Inkubation mit Konzentrationen von 9 - 10 mg SRL/l erreicht werden (**Abb. 5.1**). Diese Hypothese müsste in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

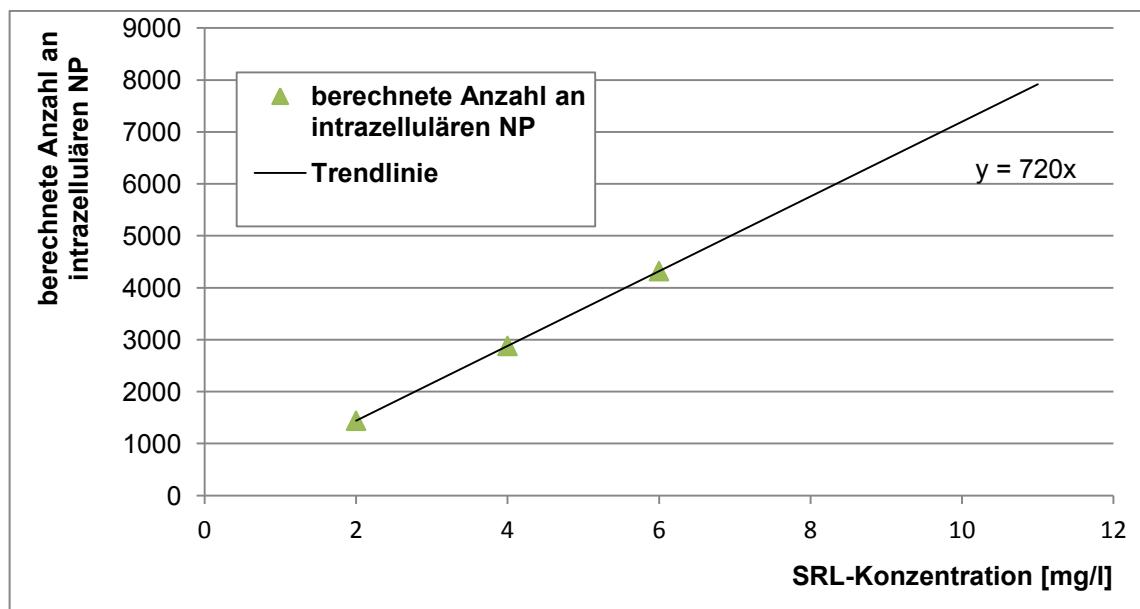


Abb. 5.1: Berechnete Anzahl an intrazellulären Nanopartikeln im Verhältnis zur Sirolimus-Konzentration (extrapolierte Trendlinie).

5.3.3 Effekte und Wirkungen

Der Mechanismus der NP-Aufnahme ist abhängig vom Zelltyp, der NP-Art und deren Größe [92, 93, 96]. Es gibt Studien über die Inkorporation von PLA-NP in dendritische Zellen und Mausmakrophagen durch Phagozytose bzw. aktive Endozytose [55, 157]. PLA ist bekannt für Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit [27]. Demzufolge wurde in dieser Arbeit keine akut chemische Toxizität von PLA-NP auf PMN erwartet. Andererseits kann jedoch aufgrund der beachtlichen Mengen der inkorporierten NP in PMN und den potentiell hohen intrazellulären Konzentrationen an Abbauprodukten eine Beeinträchtigung der essentiellen Zellfunktionen nicht völlig ausgeschlossen werden.

Doch trotz der intrazellulären Beladung durch die getesteten NP und die dementsprechend resultierenden intrazellulären SRL-Konzentrationen von 37 - 47 µg/l, die deutlich oberhalb des therapeutischen Bereiches im Blut (12 - 20 µg/l) lagen, wurde die Viabilität der PMN nicht beeinträchtigt, sondern blieb sowohl relativ als auch absolut zur Kontrolle unbeeinflusst. Dies scheint verwunderlich, da durch Oxidationsprozesse aus SRL eine breite Palette von Metaboliten und chemischen Abbauprodukten mit unbekannten Effekten entstehen [166-168]. Doch auch nach 19-stündiger Inkubation der PMN nahm deren Viabilität nicht ab. Dies korreliert mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen SRL-PLGA-NP, PLGA-NP sowie auch SRL keine Effekte auf die Viabilität verschiedener Zelllinien wie Makrophagen, dendritische Zellen, Monozyten und THP-1-Zellen zeigten [27, 157, 169, 170].

Die Fähigkeit der PMN zur Migration ist für das Eindringen in pathologisch veränderte Gewebe von entscheidender Bedeutung. Einerseits ist es wichtig, um Krankheitserreger unschädlich zu machen und die Entzündungskaskade in Gang zu setzen, andererseits kann die Chemotaxis der PMN als Transportweg für Arzneistoffe zum Entzündungsort genutzt werden [171]. Infolgedessen ist es unerlässlich, die Effekte von NP auf das Migrationsverhalten der PMN zu erfassen. Obwohl die getesteten NP von humanen PMN aufgenommen wurden, konnte nach Stimulation mit ZymA bzw. fMLP kein Effekt von SRL-PLA-NP und PLA-NP sowie SRL auf die Chemotaxis humaner Granulozyten verzeichnet werden. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis beobachteten GOMEZ-CAMBRONERO et al. eine Migrationshemmung humaner PMN durch SRL. Allerdings verwendeten die Autoren andere Chemoattractantien (GM-CSF, IL-8)

[159]. WESSELY et al. stellten oberhalb einer SRL-Konzentration von 100 µg/l eine signifikante Reduktion der Migration von PMN (stimuliert durch fMLP) fest [172]. Das unterschiedliche Migrationsverhalten nach Stimulation mit ZymA, fMLP, GM-CSF oder IL-8 könnte Folge der verschiedenen Mediationswege der Stimulanzien sein. ZymA aktiviert die Migration der Neutrophilen über den Toll-like-Rezeptor (TLR) 2, fMLP über f-met-Rezeptor; GM-CSF stimuliert die Chemotaxis über TLR 2 und CD14 und IL-8 über den IL-8-Rezeptor [135-138, 173]. Diese Annahme deutet darauf hin, dass SRL das Migrationsverhalten der PMN über den IL-8-Rezeptor und TLR-2 bzw. CD14 sowie oberhalb einer Konzentration von 100 µg/l zusätzlich über den f-met-Rezeptor beeinflusst.

Trotz unbeeinträchtigter Viabilität wurde die Phagozytose-Aktivität der PMN gesenkt, wobei dies unabhängig von der Gegenwart des Arzneistoffes SRL war (siehe **Abb. 4.18** S. 43). Auch nach der Inkubation von T-Zellen bzw. Erythrozyten mit 100 nmol/l SRL (entspricht ~91 µg/l) wurde eine Reduktion der Phagozytose um 10 bzw. 20% verzeichnet, obwohl deren Zellviabilität nicht beeinflusst wurde [174]. Die Phagozytose-Aktivität der PMN regenerierte sich nach 3 h. Es ist davon auszugehen, dass nach der Inkorporation der NP und anschließend der *E. coli* in den ersten Stunden das intrazelluläre Volumen der PMN ausgeschöpft war, so dass deren maximale Phagozytose-Kapazität erreicht wurde. Diese Theorie wird durch die Beobachtung gestützt, dass der Prozentsatz der Phagozytose-aktiven Zellen unverändert blieb, während die Menge der aufgenommenen FITC-*E. coli* abnahm. Des Weiteren könnte die Regeneration auch auf immunologische Reaktionen hindeuten, die durch Zytokine moduliert wurden. DAS et al. berichteten eine derartige Induktion der IL-1β- und IL-6-Freisetzung aus dendritischen Zellen durch SRL [175]. In dieser Arbeit ließ sich diese Hypothese jedoch nicht bestätigen. Das Monitoring der Zytokine IL-1β, IL-6 und IL-8, die bekannte Marker für pro-inflammatorische Zellprozesse darstellen, zeigte weder durch die getesteten NP noch durch den freien Arzneistoff SRL ein verändertes Sekretionsprofil aus humanen Phagozyten. Jedoch könnten andere Zytokine wie TNF-α, Interferon α oder Granulozyten-stimulierender Faktor (G-CSF) involviert sein [67]. Ferner kommen auch zelltypspezifische Reaktionen in Betracht.

Neben dem Aufklären des Inkorporationspfades sind Kenntnisse über die Eliminationswege der NP, insbesondere von DDS-NP, von besonderer Bedeutung.

PLA wird als biologisch verträgliches und abbaubares Polymer beschrieben [27]. Im Organismus wird es durch Hydrolyse zu Milchsäure abgebaut, aus der anschließend mittels Laktatdehydrogenase Pyruvat gebildet wird. Aus Pyruvat kann über die Glukoneogenese Glukose entstehen oder es wird über den Zitronensäurezyklus zu Kohlendioxid und Wasser metabolisiert [176, 177]. Hingegen können durch Oxidation aus SRL verschiedene Metaboliten mit unbekannten Effekten entstehen [166-168]. Als Teil des „oxidative burst“ der PMN werden reaktive Sauerstoffspezies in Phagosomen sezerniert. Trotzdem beobachteten GEE et al. in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit keinen signifikanten Einfluss von SRL auf die „oxidative burst“-Aktivität der humanen Neutrophilen bei Konzentrationen unterhalb von 50 µg/l [178]. Es ist davon auszugehen, dass die Bildung der SRL-Metaboliten über Oxidation wahrscheinlich ist, jedoch sind weitere Studien nötig, um deren Einfluss auf die Zellen zu klären.

5.3.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zur Risikoabschätzung der SRL-PLA-NP und PLA-NP wurde ebenso wie in den Versuchen mit den Metalloxid-NP die Dosis zunächst auf die Konzentration (mg/l) bezogen. Jedoch sollte auch hier die Möglichkeit einer Korrelation zwischen der Partikelanzahl und der Toxizität der NP überprüft werden. Da sich die getesteten Substanzen in der Beeinflussung der physiologischen Effekte der PMN nicht unterschieden, lag die Vermutung nahe, dass die Partikelanzahl ähnlich war (siehe **Abb. 4.4** S. 31). Dies wurde dann auch mittels NTA-Messung bestätigt, jedoch lassen sich hieraus keine endgültigen Rückschlüsse auf eine mögliche Korrelation ziehen.

5.4 Schlussfolgerung

Mittels der neuen NTA-Technik lassen sich NP erstmals in dispergiertem Zustand hinsichtlich Größe, Größenverteilung und Partikelanzahl direkt im Inkubat vermessen, was mit einem bedeutenden Fortschritt in der Charakterisierung und Risikobewertung suspendierter NP verbunden ist. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass die Größe der NP teilweise abhängig vom Inkubationsmedium und dessen Bestandteilen ist. Die nicht-ummantelten Metalloxid-NP

uFeO und uZnO neigten zur Aggregation. Im Gegensatz zu uFeO-NP bildete Resovist® (cFeO-NP) in proteinangereicherten Lösungen und humanem Plasma anscheinend eine Proteinkorona aus. Obwohl cFeO-NP die kleinsten Partikelgrößen und somit die größte Materialoberflächen sowie die größte Anzahl an NP aufwiesen, zeigten sie ebenso wie die nicht-umhüllten Eisenoxid-NP lediglich eine leichte Beeinflussung der physiologischen Funktionen humaner Neutrophiler. Hingegen übten die für ihre Zytotoxizität bekannten uZnO-NP auf humane PMN erwartungsgemäß akut toxische Effekte aus. Somit konnte eine Korrelation zwischen der Toxizität und der Dosis bzw. der Toxizität und der Partikelanzahl nicht festgestellt werden. Offenbar ist die NP-Art der entscheidende Einflussfaktor.

Hinsichtlich der SRL-beladenen NP demonstrieren die Untersuchungen, dass PLA-NP als Arzneistoffträger für SRL geeignet sind. Sie besitzen das Potenzial für steuerbare Arzneistofffreisetzung des Immunsuppressivums hinsichtlich eines gezielten Freisetzungsortes, -zeitpunktes sowie Freisetzungsrate. Erstmals konnten PE-markierte NP zum Nachweis der Inkorporation in humane Granulozyten erfolgreich eingesetzt werden. Dies lieferte detailliertere Einblicke in den Aufnahmeprozess, die Eliminierung durch Phagozytose und die akute Toxizität der NP. Humane Granulozyten sind als robuste Zellspezies bekannt. So beeinträchtigen weder SRL-PLA-NP noch die Einzelkomponenten deren physiologische Funktionen, obwohl hohe intrazelluläre Konzentrationen nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestärken die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen im Hinblick auf PLA-NP als DDS für weitere Arzneistoffe, die eine gezielte Pharmakotherapie erfordern.

Zuvor sollte jedoch die Lokalisation der NP in den Zellen bekannt sein. Da die Beeinträchtigung der PMN in ihren physiologischen Funktionen eine Schwächung der primären Immunabwehr zur Folge haben könnte, sollten diese Ergebnisse durch *In-vivo*-Langzeituntersuchungen überprüft werden. Neutrophile spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Fremdkörpern. Sie setzen chemotaktische Faktoren frei, die weitere PMN und Monozyten anlocken. Des Weiteren sezernieren stimuliert PMN eine Vielzahl von Zytokinen, toxischen Sauerstoffmetaboliten und Enzymen, die die Integrität und Funktion von Endothelzellen schädigen können [8, 36, 179, 180]. Deshalb sind vor jedem Einsatz nanopartikulärer Substanzen eine umfangreiche Charakterisierung und

Untersuchung des Einflusses auf Organismus und Umwelt über längere Zeiträume notwendig, um auch spätauftretende Effekt zu erfassen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte vom MRT-Kontrastmittel Resovist® (cFeO) und von Sirolimus-beladenen PLA-NP (SRL-PLA-NP) sowie Referenzsubstanzen auf die physiologischen Funktionen humaner Granulozyten bestimmt werden.

Dazu wurden die NP zunächst mittels der neuen NTA-Technik näher charakterisiert. NTA ist eine neue, in der Handhabung einfache und schnelle Methode, um NP hinsichtlich deren Größe, Größenverteilung und Partikelanzahl direkt in biologischen Matrices zu untersuchen. Carboxydextran-ummantelte cFeO-NP bildeten in proteinhaltigen Lösungen und humanem Plasma wohl eine Korona aus. Die nicht-ummantelten uFeO-NP und uZnO-NP neigen hingegen zu Aggregationen. Im Vergleich zu humanem Plasma waren die Durchmesser von SRL-PLA-NP sowie PLA-NP in humaner Albumin-Lösung reduziert. Dieses Ergebnis ist vermutlich auf Abstoßung infolge gleichsinniger Oberflächenladung zurückzuführen.

Des Weiteren konnten die Methoden des für die Untersuchung von Chemotherapeutika etablierten Phagozyten-Modellsystems für nanopartikuläre Xenobiotika erfolgreich adaptiert werden. Die Inkorporation der SRL-PLA-NP in humane PMN konnte in zwei verschiedenen Verfahren (LC-MS-MS, FACS) quantifiziert werden. Mittels LC-MS-MS wurde die Anreicherung von SRL-PLA-NP sowie des freien Arzneistoffes SRL in den Zellen ermittelt. SRL erreichte das Absorptionsmaximum bereits nach 15 min, wohingegen die SRL-PLA-NP den Arzneistoff in einer retardierten Rate freisetzen. Mit der Firma micromod Partikel-technologie GmbH gelang erstmals die Markierung der SRL-PLA-NP und PLA-NP mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE. So konnte mittels Durchflusszytometrie eine ca. 30%ige Aufnahme der PE-markierten SRL-PLA-NP und PLA-NP in humane PMN beobachtet werden. Gemäß Näherungsberechnung unterliegt die Aufnahme von NP durch PMN einer Sättigung bei ca. 6700 SRL-PLA-NP.

Die physiologischen Funktionen der humanen Neutrophilen wurden durch cFeO-NP und uFeO-NP lediglich leicht beeinflusst. Im Gegensatz zu uFeO-NP beeinträchtigten die cFeO-NP das Migrationsverhalten der PMN. Hingegen übten die für ihre Zytotoxizität bekannten uZnO-NP auf humane PMN akut-toxische Effekte aus. Sie beeinflussten deren Viabilität, phagozytotische und

„oxidative burst“-Aktivität sowie deren Sekretion der Zytokine IL-1 β und IL-6. SRL-PLA-NP und deren Referenzsubstanzen zeigten keine akut toxischen Effekte auf humane Granulozyten. Sie bewirkten in den ersten 2 Inkubationsstunden lediglich eine Schwächung der Phagozytose-Aktivität, die sich jedoch nach 3 h regenerierte.

Die Messungen der Partikelanzahl ergaben für cFeO-NP im Vergleich zu den anderen getesteten NP 5-6fach größere Werte. Eine zunächst vermutete Korrelation zwischen Zytotoxizität und Partikelanzahl konnte somit nicht bestätigt werden.

Da Phagozyten eine der ersten Zellen sind, die im Blutkreislauf mit NP interagieren und die Beeinträchtigung in ihren physiologischen Funktionen eine Schwächung der primären Immunabwehr zur Folge haben könnte, sollten diese Ergebnisse mittels *In-vivo*-Langzeituntersuchungen weiter abgeklärt werden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass vor jedem Einsatz nanopartikulärer Substanzen eine umfangreiche Charakterisierung und Untersuchung des Einflusses auf Organismus und Umwelt über längere Zeiträume notwendig ist, um auch spätauftretende Effekte zu erfassen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Hoet, P. H., Bruske-Hohlfeld I. and Salata O. V., *Nanoparticles - known and unknown health risks*. J Nanobiotechnology, 2004. **2** (1): 12.
- [2] Löchtefeld, S., *Nanopartikel - Anwendungen und mögliche Risiken*. 2006.
- [3] <http://www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zur-nanotechnologie.pdf>.
- [4] Nel, A., Xia T., Madler L., et al., *Toxic potential of materials at the nanolevel*. Science, 2006. **311** (5761): 622-7.
- [5] Luther, W., *Industrial applications of nanomaterials - chances and risks (NanoSafe I - Final report)*. Future Technologies Devision of VDI Technologiezentrum GmbH, 2004.
- [6] Bundestag, D., *Bericht der Bundesregierung zum Veränderungsbedarf des bestehenden Rechtsrahmens für Anwendungen der Nanotechnologie*. 2007.
- [7] Ausgewählte Fragen und Antworten zur Nanotechnologie.
- [8] Garnett, M. C. and Kallinteri P., *Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles*. Occup Med (Lond), 2006. **56** (5): 307-11.
- [9] Steinfeldt, M., von Gleich A., Petschow U., et al., *Nachhaltigkeitseffekte durch Herstellung und Anwendung nanotechnologischer Produkte*. Bundesministerium für Bildung und Forschung, 2004.
- [10] Hagens, W. I., Oomen A. G., de Jong W. H., et al., *What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?* Regul Toxicol Pharmacol, 2007. **49** (3): 217-29.
- [11] Schulenburg, M., *Nanopartikel - kleine Dinge, große Wirkung*. BMBF, 2008.
- [12] Boverhof, D. R. and David R. M., *Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation*. Anal Bioanal Chem, 2010. **396** (3): 953-61.
- [13] Salata, O., *Applications of nanoparticles in biology and medicine*. J Nanobiotechnology, 2004. **2** (1): 3.
- [14] Bayer-Vital-GmbH, *Fachinformation Resovist 0.5 mmol Fe/ml Injektionslösung, Fertigspritze*. 2007.
- [15] Reiser, M., *Magnetresonanztomographie*. Springer, Berlin, 2002.
- [16] Becker, H., Dubbert W., Schwirn K., et al., *Nanotechnik für Mensch und Umwelt - Chancen fördern und Risiken mindern*. 2009.
- [17] Borm, P. J., Robbins D., Haubold S., et al., *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC*. Part Fibre Toxicol, 2006. **3** 11.
- [18] Zhang, L., Gu F. X., Chan J. M., et al., *Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **83** (5): 761-9.

- [19] Zweers, M. L., Engbers G. H., Grijpma D. W., et al., *Release of anti-restenosis drugs from poly(ethylene oxide)-poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles*. J Control Release, 2006. **114** (3): 317-24.
- [20] Yuan, X. B., Yuan Y. B., Jiang W., et al., *Preparation of rapamycin-loaded chitosan/PLA nanoparticles for immunosuppression in corneal transplantation*. Int J Pharm, 2008. **349** (1-2): 241-8.
- [21] Hofner, A. F., *Sirolimus, ein neues Immunsuppressivum*. Pharmazeutische Zeitung, 2003. **1**
- [22] Sehgal, S. N., *Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action*. Ther Drug Monit, 1995. **17** (6): 660-5.
- [23] Abraham, R. T., *Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling*. Curr Opin Immunol, 1998. **10** (3): 330-6.
- [24] Yatscoff, R., LeGatt D., Keenan R., et al., *Blood distribution of rapamycin*. Transplantation, 1993. **56** (5): 1202-6.
- [25] Marx, S. O., Jayaraman T., Go L. O., et al., *Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1995. **76** (3): 412-7.
- [26] Rensing, B. J., Vos J., Smits P. C., et al., *Coronary restenosis elimination with a sirolimus eluting stent: first European human experience with 6-month angiographic and intravascular ultrasonic follow-up*. Eur Heart J, 2001. **22** (22): 2125-30.
- [27] Sant, S., Poulin S. and Hildgen P., *Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles*. J Biomed Mater Res A, 2008. **87** (4): 885-95.
- [28] Luderer, F., Lobler M., Rohm H. W., et al., *Biodegradable Sirolimus-loaded Poly(lactide) Nanoparticles as Drug Delivery System for the Prevention of In-Stent Restenosis in Coronary Stent Application*. J Biomater Appl, 2010.
- [29] <http://www.magforce.de/german/produkte/nano-krebstherapie.html>.
- [30] Wagner, V. and Wechsler D., *Nanobiotechnologie II: Anwendungen in der Medizin und Pharmazie*. Zukünftige Technologien Consulting der VDI Technologiezentrum GmbH, 2004.
- [31] Tinkle, S. S., Antonini J. M., Rich B. A., et al., *Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease*. Environ Health Perspect, 2003. **111** (9): 1202-8.
- [32] Tan, M. H., Commens C. A., Burnett L., et al., *A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens*. Australas J Dermatol, 1996. **37** (4): 185-7.
- [33] Cross, S. E., Innes B., Roberts M. S., et al., *Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation*. Skin Pharmacol Physiol, 2007. **20** (3): 148-54.

- [34] Gamer, A. O., Leibold E. and van Ravenzwaay B., *The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin*. Toxicol In Vitro, 2006. **20** (3): 301-7.
- [35] Gurny, R., Poutier M., Vargas A., et al., *Nanoparticles for Drug Delivery: the Smaller, the Better?* NanoMed, Berlin 2006.
- [36] Mo, Y., Zhu X., Hu X., et al., *Cytokine and NO release from peripheral blood neutrophils after exposure to metal nanoparticles: in vitro and ex vivo studies*. Nanotoxicology, 2008. **2** (2): 79-87.
- [37] Limbach, L. K., Wick P., Manser P., et al., *Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress*. Environ Sci Technol, 2007. **41** (11): 4158-63.
- [38] Choi, H. S., Liu W., Misra P., et al., *Renal clearance of quantum dots*. Nat Biotechnol, 2007. **25** (10): 1165-70.
- [39] Umweltbundesamt, *Nanotechnik für Mensch und Umwelt - Chancen fördern und Risiken mindern*. 2009.
- [40] Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal P., Hall J. B., et al., *Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution*. Mol Pharm, 2008. **5** (4): 487-95.
- [41] Renwick, L. C., Donaldson K. and Clouter A., *Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles*. Toxicol Appl Pharmacol, 2001. **172** (2): 119-27.
- [42] Lin, W., Huang Y. W., Zhou X. D., et al., *In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **217** (3): 252-9.
- [43] Sayes, C. M., Reed K. L. and Warheit D. B., *Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles*. Toxicol Sci, 2007. **97** (1): 163-80.
- [44] Gojova, A., Guo B., Kota R. S., et al., *Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition*. Environ Health Perspect, 2007. **115** (3): 403-9.
- [45] Lockman, P. R., Koziara J. M., Mumper R. J., et al., *Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability*. J Drug Target, 2004. **12** (9-10): 635-41.
- [46] Oweida, A. J., Dunn E. A., Karlik S. J., et al., *Iron-oxide labeling of hematogenous macrophages in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis and the contribution to signal loss in fast imaging employing steady state acquisition (FIESTA) images*. J Magn Reson Imaging, 2007. **26** (1): 144-51.
- [47] Metz, S., Bonaterra G., Rudelius M., et al., *Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro*. Eur Radiol, 2004. **14** (10): 1851-8.

- [48] Gupta, A. K. and Curtis A. S., *Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture*. J Mater Sci Mater Med, 2004. **15** (4): 493-6.
- [49] Berry, C. C., Wells S., Charles S., et al., *Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro*. Biomaterials, 2003. **24** (25): 4551-7.
- [50] Berry, C. C., Wells S., Charles S., et al., *Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation*. Biomaterials, 2004. **25** (23): 5405-13.
- [51] Brunner, T. J., Wick P., Manser P., et al., *In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility*. Environ Sci Technol, 2006. **40** (14): 4374-81.
- [52] Veranth, J. M., Kaser E. G., Veranth M. M., et al., *Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts*. Part Fibre Toxicol, 2007. **4** 2.
- [53] Donaldson, K., Beswick P. H. and Gilmour P. S., *Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity?* Toxicol Lett, 1996. **88** (1-3): 293-8.
- [54] Wang, B., Feng W., Wang M., et al., *Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice*. J Nanopart Res, 2008. **10** (2): 263-76.
- [55] Kanchan, V. and Panda A. K., *Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response*. Biomaterials, 2007. **28** (35): 5344-57.
- [56] Drucksache and 16/6337, *Bericht der Bundesregierung zum Veränderungsbedarf des bestehenden Rechtsrahmens für Anwendungen der Nanotechnologie*. 2007.
- [57] Haas, A., *Wenn Fresszellen Verdauungsstörungen haben - ungewöhnliche Phagosomenbiogenese in Makrophagen*. Biospektrum, 2002. **3** 1-5.
- [58] van Eeden, S. F., Klut M. E., Walker B. A., et al., *The use of flow cytometry to measure neutrophil function*. J Immunol Methods, 1999. **232** (1-2): 23-43.
- [59] Shive, M. S. and Anderson J. M., *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **28** (1): 5-24.
- [60] Buret, A. G., *Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: the example of tilimicosin*. Can J Vet Res, 2010. **74** (1): 1-10.
- [61] Hampton, M. B., Kettle A. J. and Winterbourn C. C., *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood, 1998. **92** (9): 3007-17.
- [62] Thomson, A., *The Cytokine Handbook*. Academic Press, San Diego, 1998.
- [63] Dinarello, C. A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118** (2): 503-8.

- [64] Kloth, S., Flad H. D. and Brandt E., *Detection of intracellular interleukin 2: evidence for novel immunologically related forms of the lymphokine*. Cytokine, 1994. **6** (4): 349-57.
- [65] Fehniger, T. A., Cooper M. A. and Caligiuri M. A., *Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13** (2): 169-83.
- [66] Meirer, B., *Auswirkungen perioperativer Hypothermie auf die Migration neutrophiler Granulozyten und die Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine*. 3. Medizinische Klinik, Technischen Universität München, 2003.
- [67] Cassatella, M. A., *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. Immunol Today, 1995. **16** (1): 21-6.
- [68] Cassatella, M. A., Meda L., Gasperini S., et al., *Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes*. Eur J Immunol, 1995. **25** (1): 1-5.
- [69] Lloyd, A. R. and Oppenheim J. J., *Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response*. Immunol Today, 1992. **13** (5): 169-72.
- [70] Bartneck, M., Keul H. A., Zwadlo-Klarwasser G., et al., *Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells*. Nano Lett, 2010. **10** (1): 59-63.
- [71] Zambaux, M. F., Faivre-Fiorina B., Bonneau F., et al., *Involvement of neutrophilic granulocytes in the uptake of biodegradable non-stealth and stealth nanoparticles in guinea pig*. Biomaterials, 2000. **21** (10): 975-80.
- [72] Gibaud, S., Demoy M., Andreux J. P., et al., *Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs*. J Pharm Sci, 1996. **85** (9): 944-50.
- [73] Abrikossova, N., Skoglund C., Ahren M., et al., *Effects of gadolinium oxide nanoparticles on the oxidative burst from human neutrophil granulocytes*. Nanotechnology, 2012. **23** (27): 275101.
- [74] Kojouri, G. A., Sadeghian S., Mohebbi A., et al., *The effects of oral consumption of selenium nanoparticles on chemotactic and respiratory burst activities of neutrophils in comparison with sodium selenite in sheep*. Biol Trace Elem Res, 2012. **146** (2): 160-6.
- [75] Goncalves, D. M., Chiasson S. and Girard D., *Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles*. Toxicol In Vitro, 2010. **24** (3): 1002-8.
- [76] Berg, A., Altrichter J., Drewelow B., et al., *Moxifloxacin and ciprofloxacin uptake by human neutrophils and their influence on viability, phagocytosis, oxidative burst, and chemotaxis*. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark 2005.
- [77] Berg, A., Drewelow B. and Mundkowski R., *Untersuchungen zur Kinetik und Dynamik der Fluorchinolone Moxifloxacin und Ciprofloxacin an Phagozyten*. 5. Forschungswerkstatt Moxifloxacin, 2005.

- [78] Mundkowski, R., Berg A. and Drewelow B., *Untersuchungen zur Kinetik und Dynamik der Fluorchinolone Moxifloxacin und Ciprofloxacin an Phagozyten*. 3. Forschungswerkstatt Moxifloxacin, 2002.
- [79] Filipe, V., Hawe A. and Jiskoot W., *Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates*. Pharm Res, 2010. **27** (5): 796-810.
- [80] Datenblatt PLA-Particles (plain).
- [81] Carr, B. and Malloy A., *Nanoparticle measurement through visualization*. American Laboratory, 2008. **40** (14): 8-11.
- [82] Carr, B., Malloy A. and Warren J., *Nanoparticle tracking analysis*. Innovations in Pharmaceutical Technology, 2008. **26** 38-40.
- [83] Montes-Burgos, I., Walczak D., Hole P., et al., *Characterisation of nanoparticle size and state prior to nanotoxicological studies*. J Nanopart Res, 2009. **12** 47-53.
- [84] Wagner, S., *Shining example*. Nanotech, 2007. 34.
- [85] Nanosight, *Applications of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) in Nanoparticle Research*. 2009.
- [86] Rapamune - summary of medicinal product characteristics.
- [87] Heine, J., Jaeger K., Osthaus A., et al., *Anaesthesia with propofol decreases FMLP-induced neutrophil respiratory burst but not phagocytosis compared with isoflurane*. Br J Anaesth, 2000. **85** (3): 424-30.
- [88] Boyden, S., *The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes*. J Exp Med, 1962. **115** 453-66.
- [89] Paegelow, I., Trzeczak S., Bockmann S., et al., *Migratory responses of polymorphonuclear leukocytes to kinin peptides*. Pharmacology, 2002. **66** (3): 153-61.
- [90] FDA, *Reviewer Guidance': Validation of Chromatographic Methods*. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1994.
- [91] FDA, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001.
- [92] Ma, Y. J. and Gu H. C., *Study on the endocytosis and the internalization mechanism of aminosilane-coated Fe₃O₄ nanoparticles in vitro*. J Mater Sci Mater Med, 2007. **18** (11): 2145-9.
- [93] Jordan, A., Scholz R., Wust P., et al., *Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro*. J Magn Magn Mater, 1999. **194** 185-96.
- [94] Luehmann, T., Rimann M., Bittermann A. G., et al., *Cellular uptake and intracellular pathways of PLL-g-PEG-DNA nanoparticles*. Bioconjug Chem, 2008. **19** (9): 1907-16.

- [95] Moore, A., Weissleder R. and Bogdanov A., Jr., *Uptake of dextran-coated monocystalline iron oxides in tumor cells and macrophages*. J Magn Reson Imaging, 1997. **7** (6): 1140-5.
- [96] Harush-Frenkel, O., Debottin N., Benita S., et al., *Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353** (1): 26-32.
- [97] Schulze, E., Ferrucci J. T., Jr., Poss K., et al., *Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro*. Invest Radiol, 1995. **30** (10): 604-10.
- [98] Moore, A., Marecos E., Bogdanov A., Jr., et al., *Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model*. Radiology, 2000. **214** (2): 568-74.
- [99] Weissleder, R., Cheng H. C., Bogdanova A., et al., *Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging*. J Magn Reson Imaging, 1997. **7** (1): 258-63.
- [100] Fleige, G., Seeberger F., Laux D., et al., *In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking*. Invest Radiol, 2002. **37** (9): 482-8.
- [101] Arbab, A. S., Wilson L. B., Ashari P., et al., *A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging*. NMR Biomed, 2005. **18** (6): 383-9.
- [102] Douglas, K. L., Piccirillo C. A. and Tabrizian M., *Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors*. Eur J Pharm Biopharm, 2008. **68** (3): 676-87.
- [103] Fantoni, M., Tamburrini E., Pallavicini F., et al., *Influence of ofloxacin and pefloxacin on human lymphocyte immunoglobulin secretion and on polymorphonuclear leucocyte superoxide anion production*. J Antimicrob Chemother, 1988. **22** (2): 193-6.
- [104] Ballesta, S., Pascual A., Garcia I., et al., *Effect of linezolid on the phagocytic functions of human polymorphonuclear leukocytes*. Chemotherapy, 2003. **49** (4): 163-6.
- [105] Naess, A., Stenhaug Kilhus K., Nystad T. W., et al., *Linezolid and human polymorphonuclear leukocyte function*. Chemotherapy, 2006. **52** (3): 122-4.
- [106] Andersson, J. and Dahlgren U. I., *Effect of 2-hydroxyethyl-methacrylate (HEMA) on the phagocytic and respiratory burst activity of human neutrophils and monocytes*. Eur J Oral Sci, 2008. **116** (4): 369-74.
- [107] Saveyn, H., De Baets B., Hole P., et al., *Accurate particle size distribution determination by Nanoparticle Tracking Analysis based on 2-D Brownian dynamics simulation*. PSA, Stratford on Avon, UK, 2008.
- [108] Cedervall, T., Lynch I., Foy M., et al., *Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46** (30): 5754-6.

- [109] Cedervall, T., Lynch I., Lindman S., et al., *Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104** (7): 2050-5.
- [110] Lynch, I., Cedervall T., Lundqvist M., et al., *The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century*. Adv Colloid Interface Sci, 2007. **134-135** 167-74.
- [111] Absolom, D. R., Zingg W. and Neumann A. W., *Protein adsorption to polymer particles: role of surface properties*. J Biomed Mater Res, 1987. **21** (2): 161-71.
- [112] Gessner, A., Waicz R., Lieske A., et al., *Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption*. Int J Pharm, 2000. **196** (2): 245-9.
- [113] Lode, J., *Einfluß von oberflächenmodifizierenden Tensiden auf das pharmakokinetische Verhalten von PMMA-Nanopartikeln in tumortragenden Mäusen*. Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität, 1999.
- [114] Allemann, E., Gravel P., Leroux J. C., et al., *Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: evidence of complement C3 component involvement*. J Biomed Mater Res, 1997. **37** (2): 229-34.
- [115] Lundqvist, M., Stigler J., Elia G., et al., *Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105** (38): 14265-70.
- [116] Deng, Z. J., Mortimer G., Schiller T., et al., *Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles*. Nanotechnology, 2009. **20** (45): 455101.
- [117] Lee, S. H. and Ruckenstein E., *Adsorption of proteins onto polymeric surfaces of different hydrophilicities - a case study with bovine serum albumin*. J Colloid Interface Sci, 1988. **125** (2): 365-379.
- [118] Vittaz, M., Bazile D., Spennlehauer G., et al., *Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators*. Biomaterials, 1996. **17** (16): 1575-81.
- [119] Jeng, H. A. and Swanson J., *Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells*. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2006. **41** (12): 2699-711.
- [120] Reddy, K. M., Feris K., Bell J., et al., *Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems*. Appl Phys Lett, 2007. **90** (213902): 2139021-2139023.
- [121] Bazile, D. V., Ropert C., Huve P., et al., *Body distribution of fully biodegradable [¹⁴C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats*. Biomaterials, 1992. **13** (15): 1093-102.
- [122] Lin, W., Xu Y., Huang C., et al., *Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells*. J Nanopart Res, 2008. **11** 25-39.
- [123] Dwivedi, P., Misra A., Shanker R., et al., *Are nanomaterials a threat to the immune system?* Nanotoxicology, 2009. **3** (1): 19-26.

- [124] Wittmaack, K., *In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: particle number, surface area, or what?* Environ Health Perspect, 2007. **115** (2): 187-94.
- [125] Xia, T., Kovochich M., Liang M., et al., *Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties.* ACS Nano, 2008. **2** (10): 2121-34.
- [126] Yang, H., Liu C., Yang D., et al., *Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition.* J Appl Toxicol, 2009. **29** (1): 69-78.
- [127] Karlsson, H. L., Cronholm P., Gustafsson J., et al., *Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes.* Chem Res Toxicol, 2008. **21** (9): 1726-32.
- [128] Zhu, X., Wang J., Zhang X., et al., *The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*).* Nanotechnology, 2009. **20** (19): 195103.
- [129] Thode, K., Luck M., Semmler W., et al., *Determination of plasma protein adsorption on magnetic iron oxides: sample preparation.* Pharm Res, 1997. **14** (7): 905-10.
- [130] Oberdorster, G., Maynard A., Donaldson K., et al., *Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy.* Part Fibre Toxicol, 2005. **2** 8.
- [131] Hsiao, J. K., Chu H. H., Wang Y. H., et al., *Macrophage physiological function after superparamagnetic iron oxide labeling.* NMR Biomed, 2008. **21** (8): 820-9.
- [132] Zhang, Y., Kohler N. and Zhang M., *Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake.* Biomaterials, 2002. **23** (7): 1553-61.
- [133] Hsiao, J. K., Tai M. F., Chu H. H., et al., *Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5 T magnetic resonance at the single cell level.* Magn Reson Med, 2007. **58** (4): 717-24.
- [134] Gupta, A. K. and Gupta M., *Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles.* Biomaterials, 2005. **26** (13): 1565-73.
- [135] Le, Y., Yang Y., Cui Y., et al., *Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets.* Int Immunopharmacol, 2002. **2** (1): 1-13.
- [136] Webb, S., *The Role of Mediators in Sepsis Resolution.* Advances in Sepsis, 2002. **2** (1): 8-14.
- [137] Kurt-Jones, E. A., Mandell L., Whitney C., et al., *Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils.* Blood, 2002. **100** (5): 1860-8.
- [138] Means, T. K., Golenbock D. T. and Fenton M. J., *The biology of Toll-like receptors.* Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11** (3): 219-32.

- [139] Selvatici, R., Falzarano S., Mollica A., et al., *Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils*. Eur J Pharmacol, 2006. **534** (1-3): 1-11.
- [140] Daniels, R. H., Elmore M. A., Hill M. E., et al., *Priming of the oxidative burst in human neutrophils by physiological agonists or cytochalasin B results from the recruitment of previously non-responsive cells*. Immunology, 1994. **82** (3): 465-72.
- [141] Rossi, F., Della Bianca V. and de Togni P., *Mechanisms and functions of the oxygen radicals producing respiration of phagocytes*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1985. **8** (2): 187-204.
- [142] Gaudry, M., Combadiere C., Marquette C., et al., *Dissimilarities in superoxide anion production by human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate or phorbol dibutyrate*. Immunopharmacology, 1990. **19** (1): 23-32.
- [143] Kim-Park, W. K., Moore M. A., Hakki Z. W., et al., *Activation of the neutrophil respiratory burst requires both intracellular and extracellular calcium*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **832** 394-404.
- [144] Cox, J. A., Jeng A. Y., Sharkey N. A., et al., *Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C*. J Clin Invest, 1985. **76** (5): 1932-8.
- [145] Wrann, C. D., Winter S. W., Barkhausen T., et al., *Distinct involvement of p38-, ERK1/2 and PKC signaling pathways in C5a-mediated priming of oxidative burst in phagocytic cells*. Cell Immunol, 2007. **245** (2): 63-9.
- [146] Hussain, S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., et al., *In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells*. Toxicol In Vitro, 2005. **19** (7): 975-83.
- [147] Cheng, F. Y., Su C. H., Yang Y. S., et al., *Characterization of aqueous dispersions of Fe(3)O(4) nanoparticles and their biomedical applications*. Biomaterials, 2005. **26** (7): 729-38.
- [148] Apopa, P. L., Qian Y., Shao R., et al., *Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling*. Part Fibre Toxicol, 2009. **6** 1.
- [149] Park, S., Lee Y. K., Jung M., et al., *Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells*. Inhal Toxicol, 2007. **19 Suppl 1** 59-65.
- [150] Weisz, G., Leon M. B., Holmes D. R., Jr., et al., *Five-year follow-up after sirolimus-eluting stent implantation results of the SIRIUS (Sirolimus-Eluting Stent in De-Novo Native Coronary Lesions) Trial*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53** (17): 1488-97.
- [151] Morice, M. C., Serruys P. W., Barragan P., et al., *Long-term clinical outcomes with sirolimus-eluting coronary stents: five-year results of the RAVEL trial*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50** (14): 1299-304.

- [152] Tanabe, K., Degertekin M., Regar E., et al., *No delayed restenosis at 18 months after implantation of sirolimus-eluting stent*. Catheter Cardiovasc Interv, 2002. **57** (1): 65-8.
- [153] Verrecchia, T., Spenlehauer G., Bazile D., et al., *Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers*. J Control Release, 1995. **36** 49-61.
- [154] Verrecchia, T., Huve P., Bazile D., et al., *Adsorption/desorption of human serum albumin at the surface of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a solvent evaporation process*. J Biomed Mater Res, 1993. **27** (8): 1019-28.
- [155] Murdock, R. C., Braydich-Stolle L., Schrand A. M., et al., *Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique*. Toxicol Sci, 2008. **101** (2): 239-53.
- [156] Schulze, C., Kroll A., Lehr C., et al., *Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media*. Nanotoxicology, 2008. **2** (2): 51-61.
- [157] Haddadi, A., Elamanchili P., Lavasanifar A., et al., *Delivery of rapamycin by PLGA nanoparticles enhances its suppressive activity on dendritic cells*. J Biomed Mater Res A, 2008. **84** (4): 885-98.
- [158] Hosoi, H., Dilling M. B., Liu L. N., et al., *Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells*. Mol Pharmacol, 1998. **54** (5): 815-24.
- [159] Gomez-Cambronero, J., *Rapamycin inhibits GM-CSF-induced neutrophil migration*. FEBS Lett, 2003. **550** (1-3): 94-100.
- [160] Luhmann, T., Rimann M., Bittermann A. G., et al., *Cellular uptake and intracellular pathways of PLL-g-PEG-DNA nanoparticles*. Bioconjug Chem, 2008. **19** (9): 1907-16.
- [161] Gref, R., Luck M., Quellec P., et al., *'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000. **18** (3-4): 301-313.
- [162] Jhunjhunwala, S., Raimondi G., Thomson A. W., et al., *Delivery of rapamycin to dendritic cells using degradable microparticles*. J Control Release, 2009. **133** (3): 191-7.
- [163] Fernandez-Urrusuno, R., Fattal E., Rodrigues J. M., Jr., et al., *Effect of polymeric nanoparticle administration on the clearance activity of the mononuclear phagocyte system in mice*. J Biomed Mater Res, 1996. **31** (3): 401-8.
- [164] Mosquera, J. A., Hernandez J. P., Valero N., et al., *Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes*. Virol J, 2005. **2** 26.
- [165] Berkow, R. L. and Dodson R. W., *Volume dependent polymorphonuclear leukocytes fractions isolated by counterflow centrifugal elutriation: PMN volume does not correlate with PMN age*. J Leukoc Biol, 1987. **41** (6): 518-26.

- [166] Oyler, A. R., Armstrong B. L., Dunphy R., et al., *Mass balance in rapamycin autoxidation*. J Pharm Biomed Anal, 2008. **48** (5): 1368-74.
- [167] Zhou, C. C., Stewart K. D. and Dhaon M. K., *An intramolecular ionic hydrogen bond stabilizes a cis amide bond rotamer of a ring-opened rapamycin-degradation product*. Magn Reson Chem, 2005. **43** (1): 41-6.
- [168] Il'ichev, Y. V., Alquier L. and Maryanoff C. A., *Degradation of rapamycin and its ring-opened isomer: Role of base catalysis*. Arkivoc, 2007. **12** 110-31.
- [169] Hirota, K., Hasegawa T., Hinata H., et al., *Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded PLGA microspheres by alveolar macrophages*. J Control Release, 2007. **119** (1): 69-76.
- [170] Woltman, A. M., de Fijter J. W., Kamerling S. W., et al., *Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages*. Blood, 2001. **98** (1): 174-80.
- [171] Walters, J. D., Zhang F. and Nakkula R. J., *Mechanisms of fluoroquinolone transport by human neutrophils*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43** (11): 2710-5.
- [172] Wessely, R., Blaich B., Belaiba R. S., et al., *Comparative characterization of cellular and molecular anti-restenotic profiles of paclitaxel and sirolimus. Implications for local drug delivery*. Thromb Haemost, 2007. **97** (6): 1003-12.
- [173] Barnett, M. L., Lamb K. A., Costello K. M., et al., *Characterization of interleukin-8 receptors in human neutrophil membranes: regulation by guanine nucleotides*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1177** (3): 275-82.
- [174] Shen, H., Wu G., Liu G., et al., *Effects of rapamycin on the differentiation and function of macrophages in vitro*. Agricultural Sciences in China, 2009. **8** (5): 620-27.
- [175] Das, S., Haddadi A., Veniamin S., et al., *Delivery of rapamycin-loaded nanoparticle down regulates ICAM-1 expression and maintains an immunosuppressive profile in human CD34+ progenitor-derived dendritic cells*. J Biomed Mater Res A, 2008. **85** (4): 983-92.
- [176] Chen, C. C., Chueh J. Y., Tseng H., et al., *Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends*. Biomaterials, 2003. **24** (7): 1167-73.
- [177] Bala, I., Hariharan S. and Kumar M. N., *PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2004. **21** (5): 387-422.
- [178] Gee, I., Trull A. K., Charman S. C., et al., *Sirolimus inhibits oxidative burst activity in transplant recipients*. Transplantation, 2003. **76** (12): 1766-8.
- [179] Mayer-Scholl, A., Averhoff P. and Zychlinsky A., *How do neutrophils and pathogens interact?* Curr Opin Microbiol, 2004. **7** (1): 62-6.
- [180] Mitzner, S. R., Freytag J., Sauer M., et al., *Use of human preconditioned phagocytes for extracorporeal immune support: introduction of a concept*. Ther Apher, 2001. **5** (5): 423-32.

8 Abbildungs-, Tabellen- und Gleichungsverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abb. 1.1: Überblick über ADME-Prozesse.....	8
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Abwehrmechanismen der PMN gegenüber partikulärer Xenobiotika	12
Abb. 3.1: Oxidation des nicht fluoreszierenden Dihydrorhodamin zum grün fluoreszierenden Rhodamin 123.....	24
Abb. 3.2: Aufbau einer Chemotaxiskammer	24
Abb. 4.1: Partikelgrößen von PLA-NP und SRL-PLA-NP nach 60 min Inkubation in humaner Albumin-PBS-Lösung (40 g/l) bei 37°C	28
Abb. 4.2: Partikelgrößen von cFeO-NN, uFeO-NP und uZnO-NP nach 5 min Inkubation in PBS, 10% Biseko®/PBS, humanem Plasma und Lösungen von humanem Albumin (40 g/l) oder Fibrinogen (2,5 g/l) in PBS bei 37°C	29
Abb. 4.3: Partikelgrößen von SRL-PLA-NP und PLA-NP nach 5 min Inkubation in PBS, 10% Biseko®/PBS, humanem Plasma und Lösungen von humanem Albumin (40g/l) oder Fibrinogen (2,5 g/l) in PBS bei 37°C ..	30
Abb. 4.4: Partikelanzahl/ml von cFeO-NP, uFeO-NP, uZnO-NP, SRL-PLA-NP und PLA-NP in PBS, 10% Biseko®/PBS oder humanem Plasma....	31
Abb. 4.5: Anteil lebender PMN im Vergleich zur Kontrolle (100%) nach 19 h Inkubation mit uZnO-NP	32
Abb. 4.6: Anteil lebender PMN im Vergleich zur Kontrolle (100%) nach 19 h Inkubation mit ZnSO ₄	33
Abb. 4.7: Migrationsindizes (MI) humaner PMN nach Inkubation mit cFeO-NP, uFeO-NP oder uZnO-NP unter Stimulation mit fMLP (Kontrolle: 100%).	34
Abb. 4.8: Phagozytose-Indizes (PI) von PMN nach Inkubation mit cFeO-NP (Kontrolle: 100%).	35
Abb. 4.9: Phagozytose-Indizes (PI) von PMN nach Inkubation mit uFeO-NP (Kontrolle: 100%).	35
Abb. 4.10: Phagozytose-Indizes (PI) von PMN nach Inkubation mit uZnO-NP (Kontrolle: 100%).	36

Abb. 4.11: „oxidative burst“-Aktivität (BI) von PMN nach Inkubation mit 200 mg Metall/I unter Stimulation mit <i>E.Coli</i> (Kontrolle: 100%).	37
Abb. 4.12: Freisetzung von IL-1 β aus PMN nach 4 h, 6 h und 20 h Inkubation mit uZnO-NP (Kontrolle: 100%).....	38
Abb. 4.13: Freisetzung von IL-6 aus PMN nach 20 h Inkubation mit cFeO-NP, uFeO-NP oder uZnO-NP (Kontrolle: 100%).	39
Abb. 4.14: Zeit- und konzentrationsabhängige Freisetzung von IL-6 aus PMN im Vergleich zur Kontrolle (100%) nach Inkubation mit uZnO-NP (n=1).39	
Abb. 4.15: Sekretion von IL-8 aus PMN nach 20 h Inkubation mit cFeO-NP, uFeO-NP oder uZnO-NP (Kontrolle: 100%)	40
Abb. 4.16: PMN-assoziierte Konzentrationen von Sirolimus nach Inkubation mit dem Arzneistoff SRL oder SRL-PLA-NP (1.04% w/w SRL).....	41
Abb. 4.17: Prozentanteil in PMN inkorporierter PE-markierter PLA-NP und SRL-PLA-NP nach einstündiger Inkubation.....	42
Abb. 4.18: Phagozytose-Indizes (PI) humane PMN nach Inkubation mit SRL, PLA-NP oder SRL-PLA-NP über 1-4 h (Kontrolle: 100%).	43
Abb. 5.1: Berechnete Anzahl an intrazellulären Nanopartikeln im Verhältnis zur Sirolimus-Konzentration (extrapolierte Trendline).....	55

8.2 Tabellen

Tab. 1.1: Wirkungen einiger Interleukine	13
Tab. 3.1: Detektoreinstellungen am Durchflusszytometer für die Messung der PE-Markierung	20
Tab. 3.2: Geräte der LC-MS-MS-Messung.....	21
Tab. 3.3: Parameter der LC-MS-MS-Messung	21
Tab. 3.4: Detektoreinstellungen am Durchflusszytometer für die Messung der Phagozytose- und „oxidative burst“-Aktivität	23

8.3 Gleichungen

Gleichung 3.1: Stokes-Einstein-Gleichung.....	17
Gleichung 3.2: Berechnung des Lokomotionsindex	25
Gleichung 3.3: Berechnung des chemotaktischen Index	25
Gleichung 3.4: Berechnung des Migrationsindex.....	25
Gleichung 5.1: Berechnung des Gesamtvolumens inkorporierter NP	55

9 Anhang

9.1 Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe. Die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 13.09.2012

Sandra Möller

9.2 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. B. Drewelow für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R.G. Mundkowski für die Idee und Einführung in das spannende Forschungsgebiet, die gute Betreuung und ständige Unterstützung verbunden mit einer immerwährenden Diskussionsbereitschaft, für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die verständnisvolle und soziale Arbeitsatmosphäre sowie für seinen unerschütterlichen Enthusiasmus.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Mitstreiterin R. Kegler für die vertrauensvolle und freundschaftliche Zusammenarbeit. Sie trug dazu bei, dass die oftmals schwierige Organisation und Bewältigung eines langen Labortages mit einer gewissen Prise an Humor erträglich und vor allem ergebnisreich endeten.

Großer Dank gebührt ebenso Frau L. Krause für ihre verständliche und geduldige Einführung in die LC- bzw. LC-MS-MS-Messungen. Sie half oftmals bei der Beseitigung vieler Probleme des Laboralltags und sorgte mit ihrer humorvollen Art für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Pharmakologie für das angenehme Arbeitsklima.

Meinem Mann danke ich von ganzem Herzen für seine Unterstützung, sein immer offenes Ohr und sein Verständnis für manch lange Nächte. Er hat mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt.

9.3 Publikationsliste

Möller S, Kegler R, Sternberg K, Mundkowski RG.

Influence of sirolimus-loaded nanoparticles on physiological functions of native human polymorphonuclear neutrophils. Nanomedicine 2012 Feb 7. [Epub ahead of print] (IF = 6,692)

9.4 Tagungsbeiträge

König S, Drewelow B, Schubert J, Mundkowski RG.

Influence of metal oxide nanoparticles on polymorphonuclear neutrophils.

3rd International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials, Birmingham, September 2008 (Poster).

König S, Schubert J, Drewelow B, Mundkowski RG.

Assessing toxicodynamics of metal oxide nanoparticles in human phagocytes.

Pittcon, Chicago, März 2009 (Poster).

König S, Drewelow B, Schubert J, Mundkowski RG.

Influence of metal oxide nanoparticles on polymorphonuclear neutrophils.

NanoMed, Berlin, März 2009 (Poster).