



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Einfluss der nichtionischen Tenside Tween[®] 20,
Tween[®] 80 und Pluronic[®] F-68 auf die Interaktion
von Nanopartikeln mit Caco-2 Einzelzellen

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Isabella Andriik
Matrikel-Nummer:	0203917
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Wien, im Dezember 2008

VIELEN DANK

Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Bereitstellung des interessanten Themas und die tatkräftige Unterstützung bei der Verfassung meiner Diplomarbeit.

Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor und Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die Möglichkeit, die Arbeit mit Zellkulturen kennen zu lernen sowie der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft.

Frau Mag. Vera Kerleta für ihre engagierte Betreuung und positive Einstellung. Ebenso für ihre aufmunternden Worte, die mir stets geholfen haben, mich während der entbehrungsreichen, manchmal endlos erscheinenden Zeit der Diplomarbeit aufs Neue zu motivieren.

Meinen Studienkollegen, von denen mir viele zu Freunden geworden sind, für die schöne gemeinsame Zeit sowie die gegenseitige Unterstützung und Aufmunterung.

Meinen Freunden, die während des Studiums meine Launen ertragen haben und meinen Sorgen immer mit Verständnis begegnet sind. Durch ihre Einwürfe und aufrechten, ehrlichen Gespräche brachten sie mich immer wieder zu dem Schluss, das für mich richtige Studium gewählt zu haben.

Meinen Klavierlehrern, die mir mit Geduld und Ausdauer viel Bereicherndes vermitteln konnten. Sie haben auch durch wertvolle musikalisch-philosophische Gespräche für einen willkommenen Ausgleich zum naturwissenschaftlichen Studium gesorgt.

Meinen Eltern, die mir während meiner gesamten Studienzeit unterstützend zur Seite gestanden sind, mich nie unter Druck gesetzt haben und es mir dadurch ermöglichten meinen Interessen zu folgen.

**AUSDAUER IST
KONZENTRIERTE GEDULD**

Thomas Carlyle
(1795-1881)

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. ALLGEMEINER TEIL	3
2.1. Vorteile und Grenzen der oralen Applikation von Arzneistoffen.....	3
2.2. Nanopartikel.....	4
2.3. Tenside.....	5
2.3.1. Allgemeine Eigenschaften von	
- Pluronic® F-68.....	5
- Tween® 20.....	6
- Tween® 80.....	7
2.3.2. Einfluss von Pluronic® F-68, Tween® 20 und Tween® 80 auf die Eigenschaften von Zellen.....	7
2.4. Die Anwendung von Zellkulturen in der Pharmazie.....	9
2.4.1. Das Caco-2 Modell.....	9
3. MATERIALIEN UND METHODEN	11
3.1. Das Caco-2 Zellsystem.....	11
3.2. Lösungen.....	14
3.2.1. Pufferlösungen.....	14
3.2.2. Herstellung der Tensidlösungen.....	14
3.2.3. Herstellung der Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen.....	15
3.2.4. Bestimmung der Fluoreszenzintensität von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen.....	15
3.3. Bestimmung der Zytotoxizität der Tensidlösungen sowie der Zell-Viabilität und -Proliferation in Gegenwart von Tensiden.....	16
- Durchflusszytometrie.....	16
3.3.1. Bestimmung der Zytotoxizität mit Propidiumiodid.....	17
3.3.2. Proliferationstests.....	18
3.3.2.1. Viabilitätstest EZ4U.....	19
3.3.2.2. Proliferationstest - Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric).....	20

4. SPEZIELLER TEIL	23
4.1. Untersuchung der Nanopartikelinteraktion mit Caco-2 Einzelzellen	23
4.1.1. Interaktionsstudien von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen mit Caco-2 Einzelzellen in Gegenwart von 0,00025 % - 2,5 % Tween [®] 20	28
4.1.2. Interaktionsstudien von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen mit Caco-2 Einzelzellen in Gegenwart von 0,00025 % - 2,5 % Tween [®] 80	33
4.1.3. Interaktionsstudien von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen mit Caco-2 Einzelzellen in Gegenwart von 0,0005 % - 2,5 % Pluronic [®] F-68	38
4.1.4. Interaktionsstudien von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen mit Caco-2 Einzelzellen bei Nanopartikel-Konzentrationen von 0,159 mg/ml bis 0,318 mg/ml	42
4.2. Bestimmung der Zytotoxizität der Tensidlösungen mittels Propidiumiodid-Färbung von Caco-2 Einzelzellen	46
4.3. Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen in Gegenwart von Tensidlösungen mittels EZ4U-Test	48
4.4. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen in Gegenwart von Tensidlösungen mittels Cell Proliferation ELISA, BrdU-Test	51
4.4.1. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen in Gegenwart der Tenside Tween [®] 20, Tween [®] 80 und Pluronic [®] F-68	51
4.4.1.1. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen in Gegenwart von Tween [®] 20 und Tween [®] 80 Lösungen	52
4.4.1.2. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen in Gegenwart von Pluronic [®] F-68 Lösungen	57
4.4.2. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen nach dem Auftauen in Gegenwart von Pluronic [®] F-68 Lösungen	59
5. ZUSAMMENFASSUNG	62
6. ANHANG	66
6.1. Literaturverzeichnis	66
6.2. Lebenslauf	71

1. EINLEITUNG

Nanopartikuläre Formulierungen stellen ein vielversprechendes und zukunftsweisendes Gebiet in der pharmazeutisch-technologischen Forschung dar. Arzneistoffe, die in ihrer nativen Form wegen zu geringer Löslichkeit, Resorbierbarkeit oder Stabilität in oralen Formulierungen nicht wirksam sind, können in diese kolloidalen Trägersysteme eingearbeitet und damit dem Organismus verfügbar gemacht werden. Bedingt durch die enorme Oberfläche von Nanopartikeln ist eine erhöhte Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit und damit ein rascher Wirkungseintritt des Arzneistoffes gegeben. Weiters wird die Verweilzeit im Darm verlängert, wodurch die Arzneistoffaufnahme ins Blut und damit die Bioverfügbarkeit gesteigert wird. Die Anwendung kolloidaler oraler Drug Delivery Systeme hat den zusätzlich Vorteil, dass Wirkstoffe bei gleichem therapeutischen Effekt in wesentlich geringeren Dosierungen eingesetzt werden können, sodass dadurch eine Reduzierung der Nebenwirkungsrate erreicht werden kann [1].

Oberflächenaktive Verbindungen sind für die Herstellung und Stabilitätssteigerung von pharmazeutischen Produkten unerlässlich. In den letzten Jahren wurde erkannt, dass Tenside die Eigenschaften von Zellen auf vielfältige Weise auch positiv beeinflussen können. Sie sind Ausgangspunkt eines vielversprechenden Ansatzes, der es ermöglichen soll, die Resorption von Arzneistoffen zu erhöhen und deren Verweildauer in der Zelle zu verlängern [2]. Vor allem nichtionische Tenside haben sich dabei als besonders vorteilhaft erwiesen, da sie im Allgemeinen besser verträglich sind als ionische Tenside [3].

Im Rahmen der Diplomarbeit soll untersucht werden, ob Tensidlösungen die Interaktion von Nanopartikeln mit Einzelzellen beeinflussen. Getestet werden mehrere Konzentrationsbereiche der nichtionogenen Tenside Tween[®] 20, Tween[®] 80 und Pluronic[®] F-68. Durchgeführt werden die Studien mit Caco-2 Zellen, da diese ein anerkanntes *in-vitro* Modell zur Simulation des humanen Dünndarmepithels darstellen. Um das Ausmaß der Nanopartikelassoziation mit der Zelle detektieren zu können und einheitliche Eigenschaften der Partikel zu gewährleisten werden standardisierte fluoreszenzmarkierte Polystyrolnanopartikel verwendet. Das Ausmaß der Nanopartikel-Zell Wechselwirkung wird mittels Durchflusszytometrie erfasst. Diese Analysemethode ermöglicht es, neben der Anzahl der Zellen auch deren Durchmesser, Granularität und eventuell vorhandene Fluoreszenzmarkierung zu ermitteln.

Mit diesem Versuchsaufbau sollte geklärt werden, ob in Gegenwart der Detergentien die Interaktion von Nanopartikeln mit Caco-2 Einzelzellen beeinflusst wird und ob die Gegenwart von Tensiden die Lebensfähigkeit der Zellen verändert.

Um den Einfluss der Tensidlösungen auf die Viabilität der Caco-2 Zellen zu erfassen, bzw. deren potentiellen zytotoxischen Effekt festzustellen, werden Proliferations- und Zytotoxizitätstests durchgeführt. Zur Ermittlung der Zytotoxizität werden durchflusszytometrische Untersuchungen mit Propidiumiodid durchgeführt. Die Zellviabilität wird mit dem EZ4U-Test, die Proliferationsrate der Zellen mittels BrdU-Test bestimmt.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Vorteile und Grenzen der oralen Applikation von Arzneistoffen

Die orale Verabreichung von Arzneistoffen wird in der Arzneimitteltherapie bevorzugt. Sowohl für den Patienten als auch für das gesamte Gesundheitssystem weist eine perorale Therapie erhebliche Vorteile auf. Die perorale Einnahme von Medikamenten wird von den Patienten als angenehm empfunden, da sie unproblematisch und ortsunabhängig ist. Eine dadurch bedingte höhere Compliance kann sich wiederum positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken. Weiters ist die Herstellung der Arzneimittel und die Betreuung der Patienten wesentlich kostengünstiger, als dies bei parenteralen Darreichungsformen der Fall ist. Die Verabreichung eines Wirkstoffes als orale Formulierung kann jedoch durch seine Eigenschaften, wie z.B. geringe Löslichkeit, Resorbierbarkeit oder auch ungenügende Stabilität, limitiert sein.

Durch Inkorporation eines Arzneistoffes in ein kolloidales Trägersystem kann dieser für orale Verabreichung verfügbar gemacht werden. Mikro- oder Nanopartikel schützen den Arzneistoff vor enzymatischem Abbau im Magen-Darm-Trakt, können die Verweilzeit im Darm verlängern, und auch die Resorbierbarkeit von inkorporierten Wirkstoffen vermitteln, wodurch die Arzneistoffaufnahme ins Blut und damit die Bioverfügbarkeit erhöht wird. Orales Drug Delivery würde vor allem in der Chemotherapie große Vorteile gegenüber der gegenwärtigen Behandlung mittels Injektion oder Infusion bringen und einen wertvollen Beitrag zur Erhöhung der Lebensqualität der Patienten leisten [1].

Allerdings sind die meisten antitumoralen Arzneistoffe in ihrer nativen Form wegen zu geringer Löslichkeit, Stabilität oder Permeabilität gering bioverfügbar und daher für die Herstellung oraler Darreichungsformen nicht geeignet. Diese Wirkstoffe werden durch den First Pass Metabolismus, das Cytochrom P450-System und diverse Effluxpumpen eliminiert, bevor sie in den Blutkreislauf gelangen können [1]. Darüber hinaus besitzen Krebszellen viele Mechanismen, die darauf abzielen, zugeführte Arzneistoffe für die Tumorzelle unschädlich zu machen und zu eliminieren. Oft sind es mehrere Resistenzmechanismen, die gleichzeitig auftreten und durch ihre verschiedenen Eliminierungsstrategien zusammenspielen. Am schwierigsten zu behandeln sind Tumore des Multiple Drug Resistance (MDR) Phentyps [4]. Beispielsweise besitzen Krebszellen ein aktives Efflux System, bestehend aus verschiedenen Membrantransportern, die verabreichte zytotoxische Stoffe aus der Zelle in den Extrazellularraum ausschleusen. Von diesen ABC-Transportern (ATP-binding cassette)

kommt P-Glykoprotein (P-GP) und den Multidrug Resistance Related Proteinen (MRP) MRP1 und MRP2 eine große Bedeutung zu. Diese Transporter sind in Krebszellen häufig überexprimiert, vermindern auf diese Weise die Ansprechbarkeit des Tumors auf Chemotherapeutika und sind somit verantwortlich für Multiple Drug Resistance Typ 1 (MDR1) [5]. Eine mögliche Ursache für die Entwicklung einer Chemoresistenz von Krebszellen und die Entstehung von Tumoren sind Mutationen von Genen, die für die Apoptose verantwortlich sind. Häufig kommt es zu Punktmutationen des Tumorsuppressorgens, das für p53 kodiert, sodass dessen proapoptotische Aktivität verloren geht. Häufig sind auch antiapoptotische Proteine (wie Bcl2) in Tumorzellen überexprimiert [6]. Diese von Tumoren zur Unschädlichmachung von Arzneistoffen entwickelten Strategien verdeutlichen, dass jenen Substanzen oder Arzneiformen ein wachsender Stellenwert zukommt, welche diese Mechanismen in Krebszellen unterdrücken oder umgehen können.

Kolloidale Arzneistoffträger maskieren den Wirkstoff und können zur Umgehung der Multiple Drug Resistance beitragen. Das Polymer, welches den Wirkstoff umgibt, wird im Gegensatz zum Arzneistoff selbst von den Transportern der Tumorzelle nicht erkannt. Daher verbleiben die Nanopartikel in der Zelle und der Arzneistoff kann seine Wirkung entfalten. Die Anwendung kolloidaler oraler Drug Delivery Systeme hat zusätzlich den Vorteil, dass bei gleichem therapeutischen Effekt Wirkstoffe in wesentlich geringeren Dosierungen eingesetzt werden können, sodass die Nebenwirkungsrate und Toxizität gesenkt wird.

2.2. Nanopartikel

Unter Nanopartikeln versteht man in der Pharmazie Arzneistoffträgersysteme, die kleiner als 1 µm sind und aus biokompatiblen und bioabbaubaren Polymeren wie zum Beispiel PLGA (Polylactid-co-Glycolid), Polycaprolacton, Polycyanacrylat oder Polystyrol bestehen. Partikel dieser geringen Dimension haben nur eine kurze Verweilzeit im Magen, da sie ihn wie Flüssigkeiten passieren und rasch in den Darm gelangen, wo sie resorbiert werden können. Dadurch sind sie den abbauenden Enzymen im Magen nicht so lange ausgesetzt wie herkömmliche Arzneimittel.

Nanopartikel im Größenbereich von 70 bis 200 nm besitzen einen weiteren Vorteil: den so genannten Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effekt [7]. Die Endothelschicht der Blutgefäße von Tumoren ist, bedingt durch Hypervaskularisierung, lückenhaft und nicht

geschlossen wie in gesunden Blutgefäßen. Nanopartikel können somit in das Tumorgewebe diffundieren, gelangen aber nicht in gesundes Gewebe. Des Weiteren kommt es zur Anreicherung der Partikel im Krebsgewebe, da dieses kein funktionierendes Lymphsystem besitzt, das für den Abtransport von eingedrungenen Substanzen verantwortlich ist [8, 9].

Nanopartikel sind ein komplexes Gemisch, bei deren Herstellungsprozess eine Vielzahl von Substanzen erforderlich ist. Bei der Herstellung mittels (W/O)/W-Doppemulsionstechnik ist der Zusatz einer großen Menge Tensidlösung, wie Pluronic® F-68 unentbehrlich, um die Stabilität der Emulsion zu gewährleisten und die Koaleszenz der Teilchen zu verhindern. Im Zuge der Fertigstellung dieser Nanopartikel wird das als Hilfsmittel verwendete Tensid weitgehend abgetrennt. Im Endprodukt verbleibt ein Pluronic® Rest von ungefähr 1,6 %. Diese noch verbleibende Pluronic® Menge kann sowohl einen Einfluss auf die Nanopartikeleigenschaften wie die Partikelgröße ausüben, als auch auf deren Interaktion mit den Zellen [7].

2.3. Tenside

Oberflächenaktive Verbindungen sind für die Herstellung und Stabilitätserhöhung von pharmazeutischen Produkten unerlässlich. In den letzten Jahren wurde erkannt, dass Tenside auf vielfältige Weise die Eigenschaften von Zellen nicht nur negativ, sondern auch positiv beeinflussen können. Sie stellen einen viel versprechenden Ansatz dar, um die Resorption von Arzneistoffen zu erhöhen und deren Verweildauer in der Zelle zu verlängern [2]. Vor allem nichtionische Tenside haben sich dabei als besonders vorteilhaft erwiesen, da sie im Allgemeinen besser verträglich sind als ionische Tenside [3]. Vorwiegend anionische Tenside können Proteine aus der Zellmembran herauslösen oder die dichten Zellverbindungen lockern, sodass bei der Anwendung von Tensiden ab gewissen Konzentrationen ein Toxizitätsproblem resultiert. Aus diesem Grund sind nur wenige Tenside zur parenteralen Anwendung zugelassen.

2.3.1. Allgemeine Eigenschaften von

Poloxamere (Pluronic® F-68)

Pluronic® F-68, auch Poloxamer 188, ist ein nichtionisches Tensid aus der Gruppe der Block-Copolymere mit dem Aufbau A-B-A: ein zentraler hydrophober Polypropylenoxidteil (B) wird von zwei hydrophilen Polyethylenoxidketten (A) umgeben. Je nach Ethoxylierungsgrad

ist Pluronic[®] flüssig (L = liquid), pastös (P = paste) oder fest (F = flake). Pluronic[®] F-68 ist ein weißer Feststoff mit einem Molekulargewicht von 7680-9510 Da. Das Tensid Poloxamer 188 ist sehr leicht löslich in Wasser und Ethanol und praktisch unlöslich in Diethylether, Petrolether, Paraffin und fetten Ölen.

Blockpolymere finden aufgrund ihrer amphiphilen Struktur ein breites Anwendungsspektrum in der Pharma-, Kosmetik- und Nahrungsmittelindustrie. In der Pharmazie werden Poloxamere zur Erhöhung der Löslichkeit von Arzneistoffen, zur Verbesserung der Resorption bestimmter Wirkstoffe und zur Erhöhung der Benetzbarkeit und Haftfähigkeit auf Haut und Schleimhaut angewendet. Als Emulgatoren werden Pluronic[®] Blockpolymere in halbfesten Arzneiformen unter anderem in Mikroemulsionsgelen und für parenterale Fettemulsionen verwendet [10, 11, 12].

Polysorbate (Tween[®] 20 und Tween[®] 80)

Die nichtionischen Tenside Tween[®] 20 und Tween[®] 80 gehören zur Gruppe der Polyethylenglycol-Sorbitan-Fettsäureester, die auch Polysorbate genannt werden. Sie setzen sich aus 20 Ethylenoxid-Einheiten, einem Sorbitan und einer aus 12-18 Kohlenstoffatomen bestehenden Fettsäure zusammen. Tween[®] 20 und 80 sind mischbar mit Wasser und niedrigen Alkoholen, praktisch unlöslich in fetten Ölen und flüssigem Paraffin. Polysorbate sind gut verträglich und kaum toxisch. Sie werden daher vielfach als Zusatzstoff in Lebensmitteln, Futtermitteln, Arzneimitteln und Kosmetika eingesetzt, finden aber auch breite Anwendung in der biochemischen Industrie. Die Lebensmittelzusatzstoffnummer von Polysorbat 20 ist E432, jene von Polysorbat 80 E433. In der Pharmazie werden sie als Öl in Wasser O/W Emulgatoren, in Kombination mit W/O-Emulgatoren als Komplexemulgatoren und als Netzmittel eingesetzt. Weiters werden sie als Lösungsvermittler für wenig oder nicht wasserlösliche Substanzen, wie Aromen, ätherische Öle, Vitaminöle, Harze und wasserunlösliche Arzneistoffe verwendet [12, 13, 14, 15].

Tween[®] 20

Bei Tween[®] 20 (auch Polysorbat 20) wird der Fettsäureester mit Laurinsäure gebildet. Es handelt sich somit um Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat. Polysorbat 20 ist eine klare, gelbliche, ölige Flüssigkeit mit einer relativen Molekülmasse von 1228 Da und einer kritischen Mizellbildungskonzentration (critical micelle concentration, CMC) von 60 mg/l. Die erlaubte Tagesdosis (acceptable daily intake, ADI) von Tween[®] 20 beträgt 0-25 mg pro Kilogramm Körpergewicht [12, 14].

Tween® 80

Der Fettsäureanteil von Polysorbat 80 besteht zu etwa 70 % aus Ölsäure und einigen anderen Fettsäuren darunter Palmitinsäure. Bei Tween® 80 handelt es sich somit vorwiegend um Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat, einer gelben viskosen Flüssigkeit, die eine molare Masse von 1310 Da aufweist. Die CMC liegt zwischen 13 und 15 mg/l [12, 15].

2.3.2. Einfluss von Pluronic® F-68, Tween® 20 und Tween® 80 auf die Eigenschaften von Zellen

In den letzten Jahren rückte der potentielle Beitrag nichtionischer Tenside zur Verbesserung der Arzneistoffaufnahme in die Zelle nach oraler Applikation in den Mittelpunkt mehrerer Forschungsprojekte. Der Fokus lag dabei vor allem auf der gleichzeitigen Anwendung mit antitumoralen Wirkstoffen. Das Ziel dabei bestand darin, mit Hilfe dieser gut verträglichen oberflächenaktiven Verbindungen, die von Krebszellen häufig entwickelten Resistenzmechanismen zu unterdrücken und dadurch die Aktivität von Chemotherapeutika zu erhöhen. Darüber hinaus wird Pluronic® F-68 zur Behandlung von ischämischen Gefäßerkrankungen und Sichelzellanämie in Betracht gezogen [2, 16, 17].

Pluronic® F-68

Pluronic® F-68 kann, bedingt durch seine ambiphile Struktur und den A-B-A Aufbau als Triblock-Copolymer, mit der Zellmembran interagieren. Der hydrophobe Polypropylenoxidteil (B) des Blockpolymers kann sich in den hydrophoben Mittelteil der Phospholipiddoppelschicht einlagern während die beiden hydrophilen Polyethylenoxidketten (A) in den wässrigen Extrazellularraum ragen. Studien mit artifiziellen Lipidbilayern haben gezeigt, dass in Anwesenheit von Pluronic® die Membranfluidität steigt und die „Flip-Flop“-Aktivität der Phospholipidmoleküle zwischen den Lipidschichten verstärkt wird. Dies wiederum korreliert mit einer erhöhten Permeabilität der Membran für biologisch aktive Verbindungen, wie z.B. das Chemotherapeutikum Doxorubicin [18].

Pluronic® F-68 schützt Zellen vor mechanisch und chemisch bedingtem Stress und verlängert deren Überleben bei Nährstoffmangel, hohen Ionenkonzentrationen oder Hyperthermie [19]. Weiters wird Pluronic® F-68 eingesetzt, um Zellen vor Scherkräften zu schützen, die in Suspensionskulturen in großen Bioreaktoren auftreten [20, 21].

Aufgrund seines zytoprotektiven, antiadhäsiven und antithrombotischen Effekts stellt Pluronic® F-68 einen potentiellen Arzneistoff zur Behandlung akuter vaso-okklusiver Krisen der Sichelzellanämie [16] sowie akuter ischämischer vaskulärer Erkrankungen [22], wie dem

Schlaganfall und Myokardinfarkt, dar [17,23]. In einigen klinischen Studien konnte bei diesen Erkrankungen bereits ein positiver Effekt gezeigt werden. Die zusätzliche Behandlung mit hochgereinigtem Poloxamer 188 führte zu Schmerzlinderung, die die erwünschte Reduktion des Analgetikaverbrauches sowie eine Verkürzung des Krankenhausaufenthaltes ermöglicht. Pluronic® F-68 übt zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Wiederherstellung der Zellmembranintegrität von permeabilisierten Lipidbilayern aus, die durch diverse Traumata entstehen können. Die Zellmembran hat eine wichtige Transport- und Barrierefunktion zur Aufrechterhaltung der Zellaktivität. Wird die Zellmembran durch diverse Traumata, wie Erfrierungen, Verbrennungen oder Unfälle mit elektrischem Strom verletzt, kommt es zu starker Schädigung des Gewebes. Poloxamer 188 stellt daher ein viel versprechendes Agens dar, um den Heilungsprozess von geschädigtem Gewebe zu beschleunigen [24].

Andere Pluronic® Arten können mit therapieresistenten (MDR) Tumoren interagieren und zu einer Sensibilisierung der Tumore gegenüber Zytostatika führen. Pluronic® kann dabei verschiedene Mechanismen beeinflussen, die zu einer Resistenzentwicklung führen [4]. Das Tensid inhibiert P-Glykoprotein und die MRP ATPase Aktivität. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Absorption von P-GP und MRP Substraten in der Zelle. Ermittelt wurde dieser Effekt mit den Substraten Vinblastin und Doxorubicin, deren Anreicherung in der Zelle in Anwesenheit von Pluronic® P85, im Vergleich zur alleinigen Exposition der Zytostatika, deutlich gesteigert werden konnte [25]. Weiters hemmt Pluronic® das Glutathion (GSH)/Glutathion S-Transferase (GST) Detoxifikationssystem, das Fremdstoffe durch Konjugation mit GSH besser wasserlöslich und somit leichter eliminierbar macht [4]. Eine Formulierung von Doxorubicin mit Pluronic® L61 und F127 wurde in einer ersten klinischen Studie zur Behandlung von Patienten mit Tumoren in fortgeschrittenem Stadium getestet [26].

Tween® 20 und Tween® 80

Für die Polysorbate Tween® 20 und Tween® 80 konnte eine MDR-modulierende Aktivität nachgewiesen werden. Diese Tenside führen in Caco-2 monolayern zu einer Steigerung des apikal-basolateralen Transportes von Epirubicin und reduzieren zugleich dessen Ausscheidung von der basolateralen zur apikalen Seite. Somit kommt es netto zu einer Erhöhung der intrazellulären Akkumulation und intestinalen Absorption des Arzneistoffes [2]. Tween® 80 führt zu einer Erhöhung der Membranfluidität. Dies führt zu einer Konformationsänderung der membrangebundenen Transporter. P-Glycoprotein und andere

Transporter werden gehemmt, was zu einer Steigerung der oralen Absorption von P-GP Substraten führt [3].

2.4. Die Anwendung von Zellkulturen in der Pharmazie

Ein entscheidendes Kriterium für die Wirksamkeit oral applizierter Arzneimittel ist deren Permeationsfähigkeit durch das Darmepithel. Die klassisch galenischen Untersuchungsmethoden der Arzneistoffabsorption durch die Darmmukosa stellen reine *in-vitro* Systeme dar. Alternativ stehen *in-situ* oder *in-vivo* Tierversuche zu Verfügung. Eine gute Möglichkeit, um das intestinale Epithel unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen, ist die Verwendung von Zellmodellen. Seit etwa 1980 wurden gezielt Zellkulturmodelle für die Anwendung in der pharmazeutischen Forschung entwickelt. Sieht man von ethischen Bedenken beim Einsatz von Tierversuchen ab, so haben Zellkulturmodelle den Vorteil, dass sie mit geringerem Zeitaufwand, einfacher und besser automatisierbar durchzuführen sind. Darüber hinaus ist es mittels Zellsystemen möglich, Untersuchungen an humanen Zellen durchzuführen.

Man unterscheidet zwischen immortalisierten Zelllinien, die gut charakterisiert werden können und Primärkulturen, die direkt aus dem nativen Gewebe isoliert werden. Letztere zeigen üblicherweise ein heterogenes Verhalten, bleiben dabei aber dem nativen Zelltyp sehr ähnlich. Allerdings sind Zellmodellen auch Grenzen gesetzt, da sie immer nur einen Teilbereich abdecken und nicht das komplexe Geschehen im lebenden Organismus simulieren können. Mittels Zellkultursystemen ist es nicht möglich, Informationen über die Arzneistoffverteilung im gesamten Organismus zu erhalten. Daher können sie Tierversuche nicht zur Gänze ersetzen. Zur Simulierung des humanen Dünndarmepithels hat sich die Verwendung von Caco-2 Zellen als besonders geeignet herausgestellt [27, 28, 29].

2.4.1. Das Caco-2 Modell

Ursprünglich wurden Caco-2 Zellen 1974 von J. Fogh aus dem primären Adenokarzinom eines 72-jährigen Mannes kaukasischer Rasse isoliert. Bei Caco-2 Zellen handelt es sich um eine adhärente Zelllinie. Dies bedeutet, dass die Zellen für ihr Wachstum eine Oberfläche benötigen, an die sie sich anheften können. Im Laufe des Wachstums verringert sich durch Verdichtung der Zellen deren Durchmesser während gleichzeitig die Zellhöhe zunimmt. Ist die dichtest mögliche Anordnung der Zellen erreicht und keine zellfreie Stelle auf der Wachstumsunterlage mehr vorhanden, spricht man von Konfluenz.

Die Differenzierung beginnt mit Erreichen der Konfluenz spontan. Nach zwei bis drei Wochen liegt ein vollständig differenzierter monolayer vor, der eine funktionsfähige „brush border“-Membran mit Mikrovilli, zahlreichen Hydrolasen und Peptidasen besitzt. Der gebildete Zelltypus ist den humanen Enterozyten sehr ähnlich. Obwohl es sich um eine aus dem Colon stammende Tumorzelllinie handelt, deren funktionale Differenzierung eher dem fetalen Colon entspricht, ist das Caco-2 Modell heute ein anerkanntes *in-vitro* System zur Simulierung des humanen Dünndarms [27, 28, 30]

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Das Caco-2 Zellsystem

Die Materialien für die Zellkultur, die Handhabung der Caco-2 Zellen inklusive der Routinemethoden in der Zellkultur sowie die Arbeitsanleitungen zur Verwendung von Geräten werden, wie in der Diplomarbeit von Kerleta V. [27] beschrieben, übernommen. Lediglich die Subkultivierung der Zellen und die dabei verwendeten Materialien werden auf die Verwendung von Caco-2 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) Zellen angepasst. Weiters werden die Arbeitsschritte zur Langzeitlagerung von Zellen erläutert.

PBS-Puffer pH 7,2-7,3, steril

Zunächst wird eine zehnfach konzentrierte Stammlösung des PBS (Phosphate buffered saline) -Puffers durch Lösen der Salze in Aqua bidest. hergestellt:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	15,4 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Anschließend wird ein Teil der Lösung mit neun Teilen Aqua bidest. verdünnt und im Laminar Air Flow durch ein Millipore Durapore[®] Membranfilter mit einer Porenweite von 0,22 µm steril filtriert.

TrypLE[™] Select

TrypLE[™] Select (GIBCO[®] invitrogen[™], Lofer, Österreich) enthält ein rekombinantes, durch mikrobielle Fermentation hergestelltes Trypsin-ähnliches Enzym, das keine tierischen oder humanen Bestandteile enthält. Es wird zur vollständigen Dissoziation der adhären Zellen in Einzelzellen verwendet [31, 32].

Subkultivierung von adhären Zelllinien - praktische Vorgangsweise

Die Subkultivierung von Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen im Laminar Air Flow. Alle verwendeten Medien und Gefäße müssen keimfrei sein, um eine Kontamination der Zellen zu

verhindern. Die zum Passagieren der Caco-2 DSMZ Zellen benötigten Medien werden auf 37°C temperiert.

Das von den Zellen verbrauchte Medium wird aus der Gewebekulturflasche (75 cm²) abgesaugt. Anschließend werden 2 ml PBS-Puffer pH 7,2-7,3 zugesetzt, die Kulturflasche verschlossen und horizontal geschwenkt, bis der Zellrasen vollständig mit dem Puffer bedeckt ist. Danach wird die Lösung wieder abgesaugt. Dieser Vorgang dient zum Abwaschen noch verbleibender Mediumreste, welche die nachfolgende Zelldissoziation beeinträchtigen könnten. Nach Zugabe von 2 ml TrypLE™ Select und Schwenken der Gewebekulturflasche wird fünf bis zehn Minuten im Brutschrank bei leicht geöffnetem Schraubverschluss inkubiert.

Die Inkubation mit TrypLE™ Select ist beendet, sobald sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Vor Herausnehmen der Gewebekulturflasche aus dem Brutschrank wird diese verschlossen und die Zellen durch Klopfen mit der Hand von der Flaschenwand gelöst. Anschließend werden 10 ml RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-Medium zugesetzt und die abgelösten Zellen darin resuspendiert. Diese Zellsuspension wird in ein Steriline Röhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt und fünf Minuten bei Raumtemperatur und 1000 UpM zentrifugiert. Währenddessen wird der in der Kulturflasche verbliebene Rest der Zellsuspension mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 10 ml frisches RPMI-Medium vorgelegt. Durch die Zentrifugation werden die Zellen im Konus des Röhrchens konzentriert und der Überstand wird abgesaugt. Das Zellpellet wird in 2 ml RPMI resuspendiert. Zwei bis sieben Tropfen der erhaltenen Zellsuspension werden zur Weiterkultivierung der Zellen in die vorbereitete Gewebekulturflasche eingebracht. Die Flasche wird verschlossen und durch horizontale Bewegungen wird die Zellsuspension gleichmäßig am Flaschenboden verteilt. Bei leicht geöffnetem Schraubverschluss wird die Gewebekulturflasche im Brutschrank inkubiert und mindestens 24 Stunden nicht bewegt, um den initialen Anheftungsprozess nicht zu stören [27].

Die verbleibende Zellsuspension steht für Versuche zu Verfügung.

Langzeitlagerung von Zellen (Kryokonservierung)

Die Langzeitlagerung von Zellen ist notwendig, um die von der Zellbank erworbene, gut charakterisierte Kultur in geringer Passagezahl vorrätig zu haben, da es im Laufe der Subkultivierung zu Veränderungen der Zellen kommen kann und eine mögliche Kontamination der Zellkultur nie ausgeschlossen werden kann.

Zur Langzeitlagerung werden die Caco-2 DSMZ Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Um nach der Passagierung das RPMI-Medium von der Zellsuspension zu entfernen wird fünf Minuten lang bei 1000 UpM zentrifugiert und anschließend das Medium abgesaugt. Die Zellen werden in einem auf 4°C gekühlten, speziellen Einfriermedium resuspendiert, das aus RPMI-Medium mit zugesetztem 10 % FCS (fetal calf serum, Fetales Kälberserum) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) besteht. DMSO ist membranpermeabel und reduziert auf Grund seiner kryoprotektiven Eigenschaft die Kristallisation von intrazellulärem Wasser zu Eis. Die Gefrierpunktniedrigung erlaubt den Zellen, während des Einfriervorganges mehr Wasser an den Extrazellulärraum abzugeben. Damit wird die Bildung von Wasserkristallen im Intrazellulärraum verringert und die Beschädigung der Zellwände durch beim Einfrieren entstehende Wasserkristalle eingeschränkt.

Pro Kryoröhrchen werden $1-4 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml Medium eingefroren. Zunächst werden die Kryoröhrchen in der Nalgene[®] Mr.Frosty Kryobox (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) etwa 25 Minuten auf -20°C gekühlt und anschließend 12 Stunden bei -80°C gelagert. Die mit Isopropanol gefüllte Kryobox gewährleistet ein langsames Einfrieren der Zellen bei einer Einfrierrate von -1°C pro Minuten. Die tiefgefrorenen Proben können einige Monate lang bei -80°C gelagert werden. Zur jahrelangen Aufbewahrung werden sie in flüssigem Stickstoff gelagert, wobei auch die Temperatur der Gasphase von -150°C ausreichend ist [33, 34].

Auftauen von Zellen

Nach der Lagerung in flüssigem Stickstoff werden die im Kryoröhrchen befindlichen Zellen möglichst rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend werden sie in ein Steriline Röhrchen transferiert, welches bereits auf 37°C gewärmtes RPMI-Medium enthält. Nach fünf minütiger Zentrifugation bei 1000 UpM wird das Medium entfernt, welches das bei Raumtemperatur zytotoxische DMSO enthält. Danach werden die Zellen in neuen Flaschen angezüchtet wobei die ersten Passagen etwas langsamer wachsen können [27].

3.2. Lösungen

3.2.1. Pufferlösungen

20 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4, isoton

4,77 g HEPES (4-(2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure) werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und mit verdünnter NaOH auf den physiologischen pH-Wert 7,4 eingestellt. Um eine isotone Pufferlösung zu erhalten werden anschließend 6 g Natriumchlorid zugesetzt.

PBS-Puffer pH 7,2-7,3 mit Calcium und Magnesium, partikelfrei

CaCl ₂ – Stammlösung	50,0 ml
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,1 g
NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	0,764g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

CaCl₂-Stammlösung: 2,65 g CaCl₂ * 2 H₂O pro 1000 ml H₂O

Zur Herstellung der Calciumchlorid-Stammlösung werden 2,65 g Calciumchlorid in 1000 ml Aqua dest. gelöst. 50 ml der Stammlösung werden in ein 2000 ml Becherglas geleert, die eingewogenen Salze hinzugefügt und es wird mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Um eine partikelfreie Pufferlösung zu erhalten wird durch ein Millipore Durapore[®] Membranfilter mit einer Porenweite von 0,22 µm steril filtriert.

3.2.2. Herstellung der Tensidlösungen

Die Tenside Pluronic[®] F-68, Tween[®] 20 und Tween[®] 80 werden zur Herstellung von Lösungen in den jeweiligen Konzentration in 20 mM isotonem HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 gelöst.

Für die Bindungsstudien mit Caco-2 Zellen werden Tensidlösungen in den Konzentrationen 0,0005 %; 0,001 %; 0,005 %; 0,01 %; 0,05 %; 0,1 %; 0,2 %; 0,5 %; 1,0 %; 2,0 % und 5,0 % hergestellt.

Für die Untersuchung des Einflusses der Tenside auf die Zellproliferation werden Pluronic[®] F-68 Lösungen in den Konzentrationen 2,0 %; 4,0 %; 6,0 %; 8,0 % und 10,0 %

hergestellt. Tween[®] 20 und Tween[®] 80 Lösungen werden in den Konzentrationen 0,01 %; 0,05 %; 0,1 %; 0,2 %; 0,5 % benötigt. Die angegebenen Konzentrationen stellen Gewichtsprozent (w/w) dar.

3.2.3. Herstellung der Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen

Die Versuche werden mit standardisierten Polystyrol-Nanosphären in der Größe von 0,2 µm durchgeführt, die keinen Zusatz von Tensiden oder anderen Stabilisatoren enthalten. Es werden Fluoresbrite[™] plain YG.20 micro microspheres (2,54 % Feststoff-Latex, Durchmesser $0,217 \pm 0,015$ µm; Polyscience, Inc. Warrington, USA) verwendet, die bei einer Lagertemperatur von 4°C stabil sind [35]. Diese Nanopartikel-Suspension wird 1:80 (V/V) mit den Tensidlösungen verdünnt. Dies entspricht einer Nanopartikelkonzentration von 0,318 mg/ml. Als Referenzlösung dient eine mit 20 mM isotonem HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 im Verhältnis 1:80 verdünnte Nanopartikelösung.

Für einige Versuche werden Tensid-hältige Nanopartikel-Suspensionen in den Nanopartikelkonzentrationen 0,318 mg/ml, 0,254 mg/ml, 0,212 mg/ml und 0,159 mg/ml verwendet. Die Nanopartikel-Suspensionen werden mit einer 5 %igen Pluronic[®] F-68, einer 0,1 %igen Tween[®] 20 und einer 0,1 %igen Tween[®] 80 Lösung, die Referenzlösungen mit 20 mM isotonem HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 hergestellt.

3.2.4. Bestimmung der Fluoreszenzintensität von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen

Um zu gewährleisten, dass die hergestellten Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen vergleichbare Fluoreszenzintensitäten aufweisen und somit vergleichbare Mengen an Nanopartikeln in den Bindungsstudien mit den Caco-2 Einzelzellen zum Einsatz kommen, wird die Fluoreszenz der einzelnen Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen fluorimetrisch bestimmt.

Durchführung

Pro well einer 96-well Mikrotiterplatte (Iwaki, Bertoni, Wien, Österreich) werden 100 µl der Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspension pipettiert. Bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm, einer Emissionswellenlänge von 525 nm und einer Verstärkung von 109 wird die Fluoreszenzintensität im Mikrotiterplattenfluorimeter (Micro Plate Fluor Reader, Infinite[®] M200, Tecan, Grödig, Austria) bestimmt.

Mikrotiterplattenfluorimeter

Mit einem Mikrotiterplattenfluorimeter ist es möglich, innerhalb weniger Sekunden die Fluoreszenzintensität von bis zu 96 Proben in einer 96-well Mikrotiterplatte zu bestimmen. Die zu analysierende fluoreszenzmarkierte Substanz kann sowohl in Lösung als auch cytoadhärent oder cytoplasmatisch vorliegen [27].

3.3 Bestimmung der Zytotoxizität der Tensidlösungen sowie der Zell-Viabilität und -Proliferation in Gegenwart von Tensiden

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von Substanzen beziehungsweise der Proliferaton von Zellen existieren mehrere Methoden. Einerseits kann durch Durchflusszytometrie zwischen lebenden und toten Zellen einer Probe unterschieden werden, da diese auf Grund ihrer unterschiedlichen Granularität im erhaltenen 2D-Histogramm verschiedene Populationen bilden. Zusätzlich kann durch Färbung der DNA im Zellkern von toten Zellen mit Propidiumiodid und der erhaltenen Fluoreszenzintensität zwischen viablen und geschädigten Zellen differenziert werden. Andererseits ermöglichen speziell entwickelte Testsysteme die Bestimmung der Viabilität sowie der Proliferationsrate von Zellen [36, 37].

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren, das eine Quantifizierung und Analytik von Einzelzellen und Partikeln ermöglicht. Als high throughput Methode ermöglicht die Durchflusszytometrie eine multiparametrische Analyse von mehreren 1000 Zellen innerhalb weniger Minuten. Neben Durchmesser, Granularität und Anzahl von Zellen können mit dieser Methode Fluoreszenzmarkierungen detektiert werden, die durch verschiedene Fluorophore vermittelt werden können. Die Durchflusszytometrie findet vielfach Anwendung in der Medizin, Immunologie, Biotechnologie und Zellbiologie. Es können Informationen über die Größe der Zellen, deren Oberflächenbeschaffenheit und innere Struktur sowie eine eventuell vorhandene Fluoreszenzmarkierung gesammelt werden [27, 36].

Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Die zu untersuchenden Zellen werden zunächst hydrodynamisch fokussiert, wobei sie in der Hüllflüssigkeit (sheath flow) suspendiert und perlschnurartig aufgereiht werden. Die Einzelzellen gelangen nacheinander in die Messzelle, wo sie einen Laserstrahl passieren. Das von den Zellen gestreute Licht wird mit Hilfe eines optoelektronischen Detektionssystems,

das aus mehreren optischen Filtern und photo multiplier tubes besteht, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge detektieren, in einen elektrischen Impuls umgewandelt. Die Detektionsoptik umfasst den forward scatter (FS), den side scatter (SS) und Fluoreszenzdetektoren. Der forward scatter misst das Vorwärtsstreulicht. Das ist jenes Licht, das in Richtung des Laserstrahls gestreut wird. Das Ausmaß der gemessenen Intensität ist proportional zum Volumen der Zelle und gibt somit Auskunft über die Zellgröße. Der side scatter misst das im rechten Winkel zum Laserstrahl von der Zelle gebeugte Licht. Das Seitwärtsstreulicht liefert Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit der Zelle und deren innere Struktur. Gemeinsam mit dem Seitwärtsstreulicht wird die zellgebundene Fluoreszenz erfasst. Die Signalerfassung erfolgt mit Hilfe unterschiedlicher Emissionsfilter, den so genannten photo multiplier tubes. Die Messergebnisse werden in 2D-Histogrammen zusammengefasst, welche die Informationen des forward und side scatters enthalten [27, 36].

Durchführung

Die Proben werden mittels COULTER® EPICS® XL-MCL™ Flow Cytometer (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) analysiert.

200 µl der gereinigten Zellsuspension (50 µl Zellsuspension mit $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in PBS-Puffer pH 7,2-7,3 mit Calcium und Magnesium) werden in ein Messröhrchen eingebracht, welches bereits 1 ml partikelfreien, auf 4°C gekühlten PBS-Puffer pH 7,2-7,3 mit Calcium und Magnesium enthält. Zusätzlich ist ein Leerwert - ein analog zur Probe behandelter Ansatz ohne Analyt - Bestandteil jeder Messreihe [27].

3.3.1. Bestimmung der Zytotoxizität mit Propidiumiodid

Durch Färbung mit Propidiumiodid (PI) ist es möglich, tote Zellen in einer Zellpopulation zu identifizieren. PI ist membranimpermeabel und kann daher die intakte Membran von lebenden Zellen nicht passieren. In Zellen mit geschädigter Membran kann PI jedoch eindringen und interkaliert mit den Basen der DNA im Zellkern. Wenn der Farbstoff an die Nukleinsäure bindet, steigt die Fluoreszenzintensität auf das zwanzig- bis dreißig-Fache an. Außerdem verschiebt sich das Exzitationsmaximum um 20-30 nm nach rot, sowie das Emissionsmaximum um etwa 15 nm nach blau. Dieser Farbshift kann mittels Durchflusszytometrie erfasst werden [37].

Durchführung

200 µl der gereinigten Zellsuspension (50 µl Zellsuspension mit $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in PBS-Puffer pH 7,2-7,3 mit Calcium und Magnesium) werden in ein Messröhrchen eingebracht, welches bereits 1 ml partikelfreien, auf 4°C gekühlten PBS-Puffer pH 7,2-7,3 mit Calcium und Magnesium enthält. In jedes Messröhrchen werden 2,7 µl 1,5 mM Propidiumiodid-Lösung in Aqua dest. zugesetzt und 2 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Proben im Flow Cytometer analysiert. Der Referenzwert wird mit einer Probe bestimmt, die 100 % tote Zellen enthält. Um die Zellen abzutöten werden der im 2 ml Eppendorfgefäß befindlichen 200 µl Zellsuspension (50 µl $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 150 µl PBS-Puffer pH 7,2-7,3 mit Calcium und Magnesium) 100 µl, auf -20°C gekühltes Methanol hinzugefügt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension in ein Messröhrchen übergeführt, welches bereits 1 ml partikelfreien, auf 4°C gekühlten PBS-Puffer pH 7,2-7,3 mit Calcium und Magnesium enthält, und wie die übrigen Proben mit 2,7 µl 1,5 mM PI-Lösung versetzt. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit wird durchflusszytometrisch vermessen.

3.3.2. Proliferationstests

Proliferationstests werden durchgeführt, um den Einfluss von Substanzen auf die Wachstumsfähigkeit von Zellen zu bestimmen und damit auch Hinweise auf die Zytotoxizität zu erhalten. Sie sind eine häufig angewandte Methode um beispielsweise Nahrungsmittel, Kosmetika oder Pharmazeutika hinsichtlich potentieller Effekte auf die Viabilität und Proliferation von Zellen zu untersuchen. Angewendet werden Proliferationstests weiters zur Quantifizierung der von Zytokinen und Wachstumsfaktoren induzierten Zellproliferation sowie zur Ermittlung der Sensitivität von Tumorzellen auf Zytostatika [38, 39, 40].

Entwicklung von Proliferationstests

Die klassische Methode zur Bestimmung der Zellproliferation erfolgt direkt durch Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop (Bestimmung des mitotischen Index) oder mit Hilfe eines elektronischen Teilchenzählers. Eine Weiterentwicklung stellt die indirekte Bestimmung der Anzahl an viablen Zellen durch die metabolische Aktivität der Zellpopulation dar. Seit etwa 1956 werden Tetrazoliumsalze zur Untersuchung der Zellviabilität eingesetzt. Diese farblosen oder schwach gefärbten Verbindungen werden von NAD-abhängigen Dehydrogenasen zu intensiv gefärbten Formazanderivaten metabolisiert. Diese Reduktion erfordert funktionsfähige Mitochondrien, die innerhalb weniger Minuten nach dem Absterben der Zelle

inaktiviert werden. Somit korreliert die Farbintensität des gebildeten Reaktionsproduktes mit der Anzahl an viablen Zellen.

Beispiele für Tests, die auf diesem Prinzip beruhen, sind der MTT, XTT WST-1 oder EZ4U Test [38, 39, 40].

Ein weiterer indirekter Parameter zur Bestimmung der Zellproliferation ist die Messung der DNA-Synthese-Rate. Diese am häufigsten eingesetzte Methode kann auf dem Einbau von [³H]-Thymidin in die DNA der Zelle beruhen. Da die Abtrennung des überschüssigen, nicht eingebauten [³H]-Thymidins komplizierte Versuchsanordnungen erfordert und entsprechende Sicherheitsvorkehrungen durch die Arbeit mit Radioisotopen notwendig sind, wurden nichtradioaktive Alternativen zur Bestimmung der DNA-Synthese-Rate etabliert. Mit der Verwendung des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU), das an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird und mit Hilfe eines Enzym-markierten Antikörpers quantifizierbar ist, gelang dies erstmals 1985 [39, 40].

3.3.2.1. Viabilitätstest EZ4U

Der EZ4U (Easy for you) - Test (BIOMEDICA, Wien, Österreich) ist ein einfach anzuwendender, schnell durchführbarer, verlässlicher und nichtradioaktiver Proliferations- und Zytotoxizitätstest. Dieser beruht auf der Verwendung eines wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes als Substrat und stellt eine Weiterentwicklung und Vereinfachung des klassischen MTT-Tests dar, der auf Grund der mangelnden Wasserlöslichkeit des umgesetzten Substrates einen zusätzlichen Solubilisierungsschritt erfordert [38].

Durchführung

Die Durchführung des EZ4U-Tests erfolgt laut Angabe des Herstellers mit einigen an die verwendete Zelllinie angepassten Modifikationen.

Pro well einer 96-well Mikrotiterplatte (Iwaki, Bertoni, Wien, Österreich) werden 3000 Zellen mit je 180 µl RPMI und 20 µl der zu untersuchenden Tensidlösung angesetzt und drei Tage lang kultiviert. Zur Bestimmung des Leerwertes werden die Zellen in RPMI ohne Tensidlösung kultiviert.

Zur Vorbereitung der Testlösung wird ein Fläschchen des lyophilisierten Substrates (SUB) in 2,5 ml Aktivatorlösung (ACT) gelöst und auf 37°C erwärmt. Die Lösung ist strohgelb gefärbt.

Das in der Mikrotiterplatte vorhandene Medium wird entfernt und es werden 200 µl auf 37°C vorgewärmtes frisches RPMI-Medium in jedes well pipettiert. Anschließend werden pro well 20 µl der frisch hergestellten gelben Substratlösung zugegeben. Die Platte wird an allen vier Seiten mit den Fingern angetippt um Substrat und Medium gut zu durchmischen. Danach wird 2,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C und inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit ist der Umsatz des Substrates zu den Formazanderivaten durch die entstandene ziegelrote Farbe deutlich erkennbar. Durch sanftes Antippen der Mikrotiterplatte an allen vier Seiten wird nochmals gemischt und anschließend die Absorption im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (mit 620 nm als Referenzwellenlänge) bestimmt. Die Messung der Absorption bei 620 nm dient als Leerwert für Absorptionen durch eventuell vorhandene Partikel und wird von den Messwerten bei 450 nm abgezogen. Bei jeder Messung wird die Absorption des rot gefärbten RPMI-Mediums bestimmt und von den analysierten Probewerten abgezogen [38].

3.3.2.2. Proliferationstest - Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)

Der Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Test (Roche Diagnostics GmbH, Wien, Österreich) ist ein kolorimetrischer Immunoassay zur Quantifizierung der Zellproliferation. Er basiert auf der Bestimmung der Inkorporation von 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) in die DNA während der DNA-Synthesephase und stellt so eine Alternative zum radioaktiven [³H]-Thymidintest dar.

Die klassische immunohistochemische Detektion von Zellen in der S-Phase sowie die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgt mittels Mikroskopie oder Durchflusszytometrie. Diese Methoden liefern zwar umfangreiche Daten, sind allerdings auch zeitaufwändig und erlauben es nicht, viele Proben gleichzeitig zu analysieren. Mit dem BrdU-Test steht eine präzise, schnelle und einfache Methode zu Verfügung, die high sample throughput erlaubt so wie es zur Routineuntersuchung von Zellen erforderlich ist [39].

Prinzip des BrdU Tests

Während des Zellzyklus in der S-Phase findet die DNA-Synthese statt. Der Cell Proliferaton ELISA Test beruht darauf, dass während der DNA-Synthese 5-Brom-2-desoxyuridin an Stelle der Base Thymidin in die DNA eingebaut wird. Nach Einbau von BrdU wird die DNA durch Zusatz der *Fix Denat*-Lösung denaturiert. Dies ist notwendig, damit der im folgenden Schritt

zugesetzte Peroxidase-markierte Antikörper an BrdU binden kann. Als Substrat für das Marker-Enzym wird 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt, das durch den Immunkomplex zu einem blauen Farbstoff oxidiert wird. Gestoppt wird die Enzymaktivität durch Zugabe von 1M Schwefelsäure, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Anzahl an proliferierenden Zellen [39, 40].

Durchführung

Die Durchführung des BrdU-Testes erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers, mit einigen durch den Versuchsaufbau begründeten Modifikationen.

17000 Zellen pro well werden in einer 96-well Mikrotiterplatte (Iwaki, Bertoni, Wien, Österreich) mit der zu untersuchenden Tensidlösung zwei beziehungsweise drei Tage kultiviert. Zur Vorbereitung des Tests wird das für die Zellen verwendete Medium auf 37°C vorgewärmt und damit das *BrdU labeling reagent* 1:100 verdünnt. Dies entspricht einer BrdU Konzentration von 100 µM. Dann wurde folgende Vorgangsweise gewählt:

1. Mit einer Pasteurpipette wird das Medium abgesaugt, in dem die Zellen kultiviert wurden. Danach werden pro well 180 µl frisches, auf 37°C vorgewärmtes RPMI-Medium hinzugefügt und 20 µl *BrdU labeling solution* zugesetzt. Durch Antippen der Platte mit den Fingern wird durchgemischt und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
2. Danach wird die *BrdU labeling solution* durch Absaugen aus den wells entfernt und 200 µl *FixDenat*-Lösung pro well zugefügt. Die Platte wird 30 Minuten bei Raumtemperatur (15-25°C) stehen gelassen. Durch das Reagens wird die DNA denaturiert. Während der 30-minütigen Wartezeit wird die *Anti-BrdU-POD stock solution* 1:100 mit der *Antibody dilution solution* zur *Anti-BrdU-POD working solution* verdünnt.
3. Die *FixDenat* Lösung wird abgesaugt, 100 µl *Anti-BrdU-POD working solution* zugegeben und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Die *Anti-BrdU-POD working solution* wird abgesaugt und es wird pro well drei Mal mit je 200 µl *Washing solution* (*Washing buffer* 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt) gewaschen.
5. Anschließend werden pro well 100 µl *Substrate solution* zugesetzt und die Platte zehn Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur gelagert. Das in der *Substrate solution* enthaltene TMB wird durch die Peroxidase des DNA-gebundenen Antikörpers zu einem blauen Farbstoff umgesetzt.

6. Es werden 25 μl *Stop solution* (1M H_2SO_4) zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Der blaue Farbstoff schlägt dadurch nach gelb um. Durch sanftes Antippen an allen vier Seiten der Mikrotiterplatte wird gemischt. Aus jedem well werden 100 μl in ein leeres well übergeführt.
7. Die Absorption wird bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm mit dem Mikrotiterplattenfluorimeter bestimmt [38].

4. SPEZIELLER TEIL

4.1. Untersuchung der Nanopartikelinteraktion mit Caco-2 Einzelzellen

In den folgenden Studien soll überprüft werden, ob und in welchem Ausmaß Tensidlösungen die Interaktion von Nanopartikeln mit Caco-2 Einzelzellen beeinflussen. Dazu werden unterschiedliche Konzentrationen der Tenside, Tween[®] 20, Tween[®] 80 und Pluronic[®] F-68 bei einer Inkubationsdauer von 60 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 4°C bzw. 37°C eingesetzt. Um die gebundene Nanopartikelmenge analysieren zu können, werden fluoreszenzmarkierte Nanosphären verwendet. Die Detektion erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Durch die unterschiedlichen Inkubationstemperaturen sollen Informationen über die Bedeutung der Zellaktivität für die Anheftung der Partikel an die Zellen bzw. deren Aufnahme in die Zelle gewonnen werden. Bei einer Umgebungstemperatur von 37°C ist der Zellstoffwechsel funktionsfähig, bei 4°C hingegen ist er deutlich herabgesetzt.

Datenanalyse

Die im Zuge der durchflusszytometrischen Analyse ermittelten Daten werden in zweidimensionalen (2D) Histogrammen dargestellt.

Im 2D-Histogramm werden die 3000 analysierten Einzelzellen jeder Probe aufgrund ihrer Eigenschaften zwei Populationen (gates) zugeordnet. Die Verteilung der Zellen auf unterschiedliche gates, die definierte Bereiche mit unterschiedlichen Intensitäten der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung umfassen, ermöglicht eine Beurteilung der Viabilität der Zellen: während im gate A (linke Seite des Histogramms) die viabilen Zellen erfasst werden, akkumulieren tote Zellen in gate B (rechte Seite des Histogramms). Mittels durchflusszytometrischer Analyse werden die Anzahl und der prozentuelle Anteil an Zellen in gate A und B bezogen auf die gemessene Gesamtzellzahl sowie der durchschnittliche Wert der Zellgranularität erhoben. Weiters wird für die Zellpopulation in jedem gate die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Zellen ermittelt. Diese ist direkt proportional zur gebundenen Nanopartikelmenge an der Zelloberfläche.

In den Abbildungen 1 und 2 werden exemplarisch 2D-Histogramme als Analysenergebnisse dargestellt. Aus Abb.1 geht die prozentuelle Verteilung der Zellpopulation in gate A und B hervor. Dabei befinden sich in gate A die viabilen und in gate B die toten Zellen. Die X-Achse beinhaltet die mit dem side scatter (SS) detektierte Zellgranularität, die Y-Achse den

mit dem forward scatter (FS) ermittelten Zelldurchmesser. Abb.2 zeigt die Fluoreszenzintensität der in gate A befindlichen Zellen.

Abbildung 1: 2D-Histogramm - Verteilung der Zellpopulation auf gate A und B

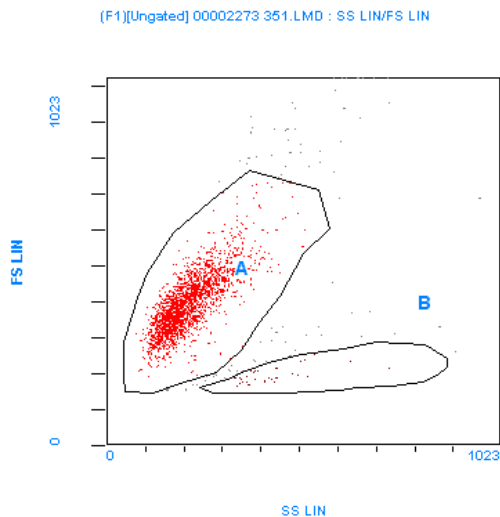
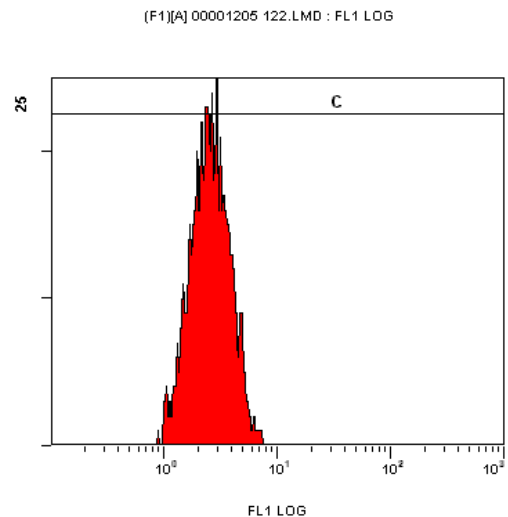


Abbildung 2: 2D-Histogramm - Fluoreszenzintensität der Zellen in gate A



Praktische Durchführung der Versuche mit Caco-2 Einzelzellen

Für diese Untersuchungen werden die aus der Subkultivierung verbleibenden Zellsuspensionen verwendet. Nach sorgfältiger Resuspendierung der Zellen wird die Zellzahl mit dem Hämocytometer bestimmt und anschließend auf $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Danach wird die Caco-2 Zellsuspension 60 Minuten bei 4°C aufbewahrt. Durch Lagerung bei dieser Temperatur wird die metabolische Aktivität der Zellen deutlich herabgesetzt. Somit ist gewährleistet, dass für die folgenden Interaktionsstudien bei 4°C und 37°C gleiche Ausgangsbedingungen herrschen. Die Versuche werden mit Caco-2 DSMZ Zellen der Passage 39 bis 81 durchgeführt. Die Versuche werden zumindest als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die durchflusszytomtrische Bestimmung erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm; die Emission wird bei 525 nm detektiert.

Durchführung

In ein 2 ml Eppendorfgefäß werden 50 µl der auf $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellten Zellsuspension pipettiert. Anschließend werden 50 µl der jeweiligen auf 4°C gekühlten Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspension in Tensidkonzentrationen von 0,0005 % bis 5,0 % und einer Nanopartikelkonzentration von 0,318 mg/ml zugesetzt. Als Referenz dient eine Nanopartikel-Suspension von 0,318 mg/ml in 20 mM isotonem HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4.

Da die Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen zum gleichen Teil mit der Zellsuspension verdünnt werden, sind die Caco-2 Einzelzellen absoluten Tensidkonzentrationen von 0,00025 % bis 2,5 % ausgesetzt.

Nach Zugabe der Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspension wird einige Sekunden lang am Vortex gemischt, um die Zellsuspension mit der Probelösung zu homogenisieren. Anschließend werden die Proben 60 Minuten bei 4°C bzw. 37°C inkubiert. Um die nicht gebundenen, fluoreszenzmarkierten Nanopartikel nach der Inkubation zu entfernen, wird zwei Mal mit auf 4°C gekühltem PBS-Puffer pH 7,2-7,3 mit Calcium und Magnesium gewaschen. Zunächst werden je Eppendorfgefäß 100 µl PBS zugesetzt, kurz am Vortex gemischt und bei 1000 UpM fünf Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Danach wird der Überstand (150 µl) vorsichtig mit einer Mikropipette abgehoben. Anschließend werden pro Eppendorfgefäß 150 µl PBS zugesetzt, resuspendiert, zentrifugiert und wieder 150 µl Überstand abgehoben. Zu den verbleibenden 50 µl der Probe werden 150 µl des PBS-Puffers zugesetzt, resuspendiert und anschließend, wie in Kapitel 3.3. beschrieben, durchflusszytometrisch analysiert.

Beziehung der gemessenen Daten auf den Referenzwert

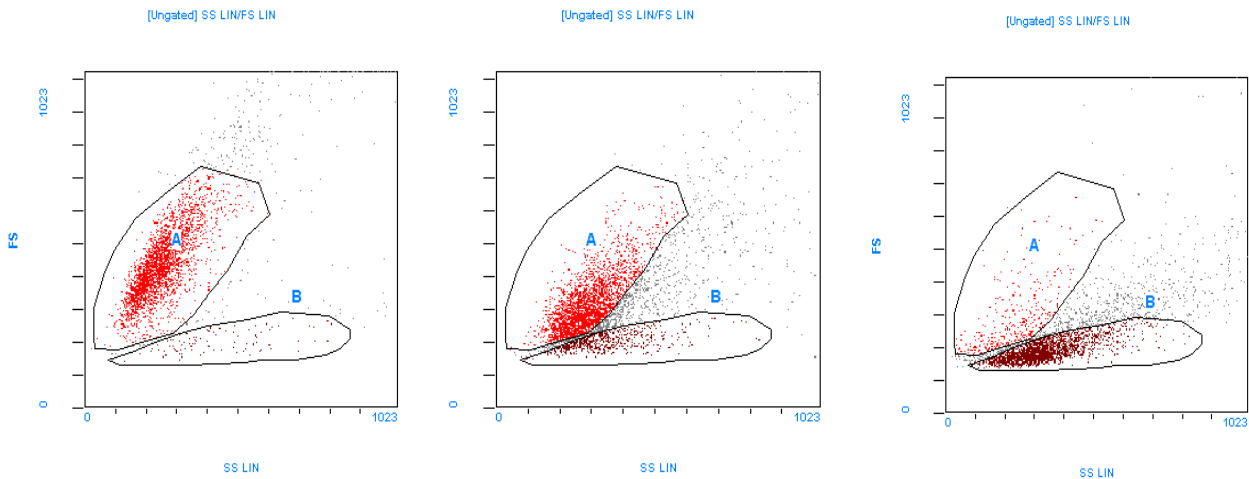
Die Messungen der Referenzproben ohne Tensidzusatz haben gezeigt, dass sich durchschnittlich 93 % der Zellen in gate A sowie 2,5 % in gate B befinden. Der auf 100 % fehlende Anteil an Zellen wurde in keinem der beiden gates erfasst. Dieser nicht detektierte Anteil umfasst Zellfragmente und Zellaggragate.

Die Fluoreszenzintensitäten der Referenzproben nach einstündiger Inkubation bei 4°C oder 37°C unterscheiden sich voneinander. Bei 4°C liegt der durchschnittliche Messwert bei 1,4 während er bei 37°C 2,6 beträgt. Um dennoch die Messergebnisse der beiden Temperaturen vergleichen zu können, wird die Intensität jedes Leerwertes als 100 % angenommen und gleich 0 gesetzt. Die Fluoreszenzintensitäten der Proben mit Tensid werden im Verhältnis dazu berechnet. Sie zeigen daher an, in welchem Verhältnis sie sich vom Referenzwert unterscheiden: ist beispielsweise die Fluoreszenzintensität der Proben gleich dem Referenzwert, so liegt sie bei 0; beträgt sie das Doppelte des Leerwertes, so liegt sie bei 2.

Durch den Vergleich mit der Referenzprobe scheint die relative Fluoreszenzintensität der Proben bei 4°C größer zu sein als bei 37°C. Dies liegt daran, dass bei einer Inkubation bei 37°C auch der Referenzwert höher ist. Die gemessenen tatsächlichen Fluoreszenzintensitäten der Proben sind hingegen, wie jene des Leerwertes, bei 37°C höher als bei 4°C.

Charakterisierung der Verteilung der Caco-2 Zellen im 2D-Histogramm nach einstündiger Inkubation mit Tensid-Lösungen

Abbildung 3: 2D-Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse der Viabilität von Caco-2 Einzelzellen in Gegenwart von Tensid:
90 % viable Zellen (links), 60 % viable Zellen (Mitte) und 11 % viable Zellen (rechts)



Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden von jeder Probe so viele Zellen erfasst, bis sich 3000 Zellen in gate A befinden. Kann diese Anzahl an viablen Zellen nicht erreicht werden, so wird die Messung nach fünf Minuten abgebrochen. Die Lage der gates wurde nach Messung von Proben einer lebenden und toten Zellpopulation eingestellt. Diese gates werden für alle weiteren Analysen beibehalten. Die Anzahl der angezeigten Punkte im gate korreliert nur ungefähr mit der tatsächlich im gate befindlichen Zellzahl, da auch mehrere Zellen einen Punkt im Histogramm ergeben können.

Wird die Viabilität der Caco-2 Zellen durch das Tensid nicht vermindert (Abb.3, links) ist die Granularität der Zellen sehr einheitlich. Dementsprechend zeigt das 2D-Histogramm eine Anhäufung der Zellen innerhalb von gate A. Der nicht detektierte Anteil ist sehr gering und weist einige Zellaggregate auf, die hohe Werte des forward scatters ergeben und sich im Histogramm oberhalb von gate A befinden.

Abbildung 3 (Mitte) zeigt eine Probe bei der sich bereits ein größerer Anteil von 14% der Zellpopulation in gate B befindet. Auch die Viabilität der in gate A detektierten Zellen scheint etwas beeinträchtigt zu sein, da sie nicht mehr in der Mitte des gates akkumulieren, sondern sie sich auf Grund der höheren side scatter Werte auf der rechten Seite des gates in der Nähe zum gate B befinden. Die höhere Anzahl an nicht detektierten Zellen ergibt sich daraus, dass die Zellgranularität im Vergleich zu viablen Zellen wesentlich höher ist und sie daher von keinem der beiden gates erfasst werden.

Abbildung 3 (rechts) stellt die Zellverteilung im 2D-Histogramm dar, wenn kaum noch viable Zellen in der Probe vorhanden sind. Durch einstündige Inkubation bei 37°C mit Tween[®] 20 ergibt sich solch eine Verteilung, wo etwa 10 % der analysierten Zellen in gate A als viable Zellen detektiert werden, während sich etwa 65 % der Zellen als nicht viable Zellen in gate B befinden.

4.1.1. Interaktionsstudien von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen mit Caco-2 Einzelzellen in Gegenwart von 0,00025 % - 2,5 % Tween® 20

Ziel des Versuches ist es festzustellen, ob die Interaktion von Nanopartikeln mit Caco-2 Zellen durch Zusatz einer Polysorbat 20 Lösung beeinflusst werden kann und die Zellviabilität dabei erhalten bleibt.

Durchführung

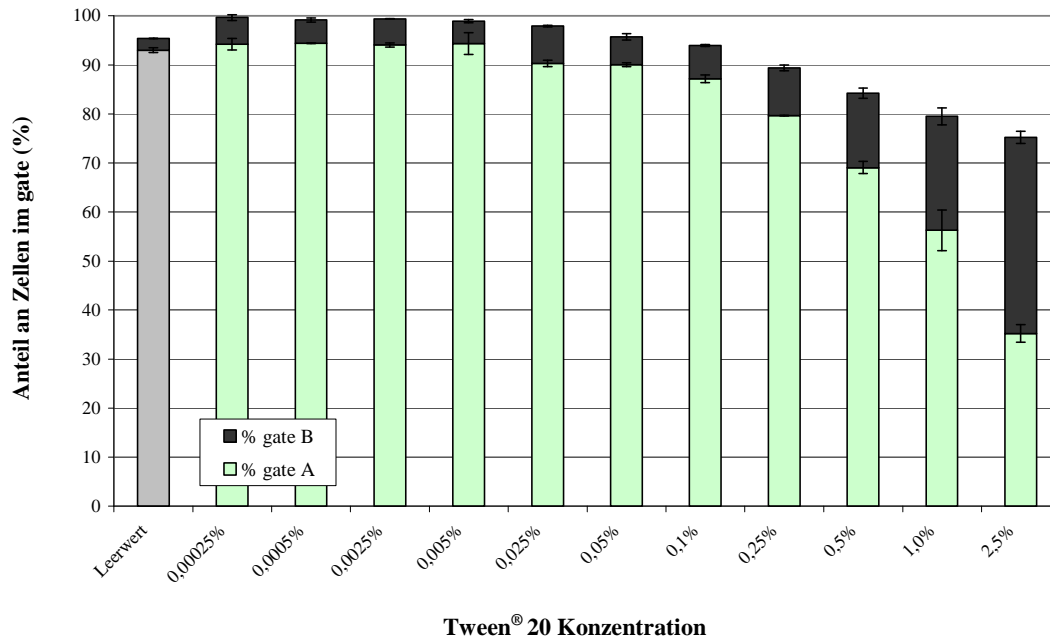
Der Zellsuspension werden Tween® 20-hältige Nanopartikel-Suspensionen (0,318 mg Nanopartikel/ml), deren Herstellung in Kapitel 3.2.3. beschrieben ist, in den Konzentrationen 0,0005 %; 0,001 %; 0,005 %; 0,01 %; 0,05 %; 0,1 %; 0,2 %; 0,5 %; 1 %, 2 % und 5 % zugesetzt. Dies entspricht den absoluten Tween® Konzentrationen von 0,00025 % bis 2,5 %. Inkubiert wird 60 Minuten bei 4°C oder 37°C.

Ergebnisse:

Tabelle 1: Anteil viabler und toter Zellen sowie zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 20-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 4°C

Tween® 20 Konzentration (%)	Viabile Zellen (% , gate A)	Tote Zellen (% , gate B)	Fluoreszenzintensität der viablen Zellen (RFU)
0,00025	94,21 ± 1,18	5,45 ± 0,58	0,00 ± 0,001
0,00050	94,42 ± 0,07	4,74 ± 0,42	0,38 ± 0,003
0,00250	94,05 ± 0,43	5,34 ± 0,05	1,65 ± 0,054
0,00500	94,33 ± 2,21	4,59 ± 0,29	2,23 ± 0,107
0,02500	90,28 ± 0,66	7,63 ± 0,17	2,96 ± 0,212
0,05000	90,03 ± 0,42	5,69 ± 0,64	3,07 ± 0,001
0,10000	87,19 ± 0,77	6,78 ± 0,23	2,50 ± 0,124
0,25000	79,66 ± 0,07	9,73 ± 0,58	1,06 ± 0,109
0,50000	69,07 ± 1,23	15,17 ± 1,05	0,05 ± 0,001
1,00000	56,27 ± 4,13	23,25 ± 1,72	-0,41 ± 0,029
2,50000	35,22 ± 1,78	40,00 ± 1,25	-0,73 ± 0,029
Leerwert	93,00 ± 0,48	2,37 ± 0,02	0,00 ± 0,000

Abbildung 4: Anteil viabler (gate A) und toter Zellen (gate B) von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 20 hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 4°C



Die in Abbildung 4 dargestellten Werte aus Tabelle 1 zeigen den prozentuellen Anteil an lebenden Zellen in gate A bzw. an toten Zellen in gate B im Vergleich zum Leerwert nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 4°C. Bei Tween® 20 Konzentrationen von 0,00025 % bis 0,1 % sind ebenso wie beim Referenzwert etwa 90 % der Zellen viabil. Bei weiter zunehmender Tensidkonzentration sinkt der Anteil an Zellen in gate A, während jener der toten Zellen in gate B kontinuierlich steigt. Bei einer Tween® 20 Konzentration von 2,5% befinden sich bereits 40 % der Zellen in gate B und nur noch 35,2 % in gate A.

Wie nachfolgend in Tabelle 2 und Abbildung 5 dargestellt, ist die nach einstündiger Inkubation bei 37°C beobachtete Tendenz gleich wie bei 4°C. Jedoch nimmt der Anteil an viabilen Zellen bereits ab einer Tween® 20 Konzentration von 0,25 % stärker ab. Von 0,00025 % bis 0,1 % befinden sich wie bei der Referenz etwa 93 % der Zellen in gate A. Ab 0,25 % Tween® 20 ist der Anteil an viabilen Zellen bereits reduziert und sinkt ab einer Tensidkonzentration von 0,5 % drastisch ab. So sind bei den höchsten gemessenen Tween® 20 Konzentrationen von 1 % und 2,5 % mehr als 65 % der Zellpopulation tot.

Tabelle 2: Anteil viabler und toter Zellen sowie zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 20-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 37°C

Tween® 20 Konzentration (%)	Viabile Zellen (% , gate A)	Tote Zellen (% , gate B)	Fluoreszenzintensität der viablen Zellen (RFU)
0,00025	92,95 ± 1,53	4,57 ± 0,91	0,24 ± 0,008
0,00050	92,20 ± 1,87	5,75 ± 0,58	0,34 ± 0,027
0,00250	91,57 ± 0,38	4,99 ± 0,60	1,27 ± 0,023
0,00500	91,55 ± 0,43	4,77 ± 0,47	2,10 ± 0,010
0,02500	90,85 ± 0,21	7,66 ± 0,99	2,34 ± 0,022
0,05000	93,46 ± 0,80	4,93 ± 0,54	2,50 ± 0,066
0,10000	93,66 ± 0,92	3,62 ± 0,11	1,51 ± 0,038
0,25000	83,21 ± 0,71	11,09 ± 0,34	0,74 ± 0,022
0,50000	55,55 ± 1,69	36,27 ± 0,54	-0,07 ± 0,001
1,00000	18,01 ± 0,76	65,56 ± 2,61	-0,41 ± 0,037
2,50000	13,63 ± 2,81	66,56 ± 4,77	-0,49 ± 0,093
Leerwert	93,00 ± 2,55	2,68 ± 0,77	0,00 ± 0,000

Abbildung 5: Anteil viabler (gate A) und toter Zellen (gate B) von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 20-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 37°C

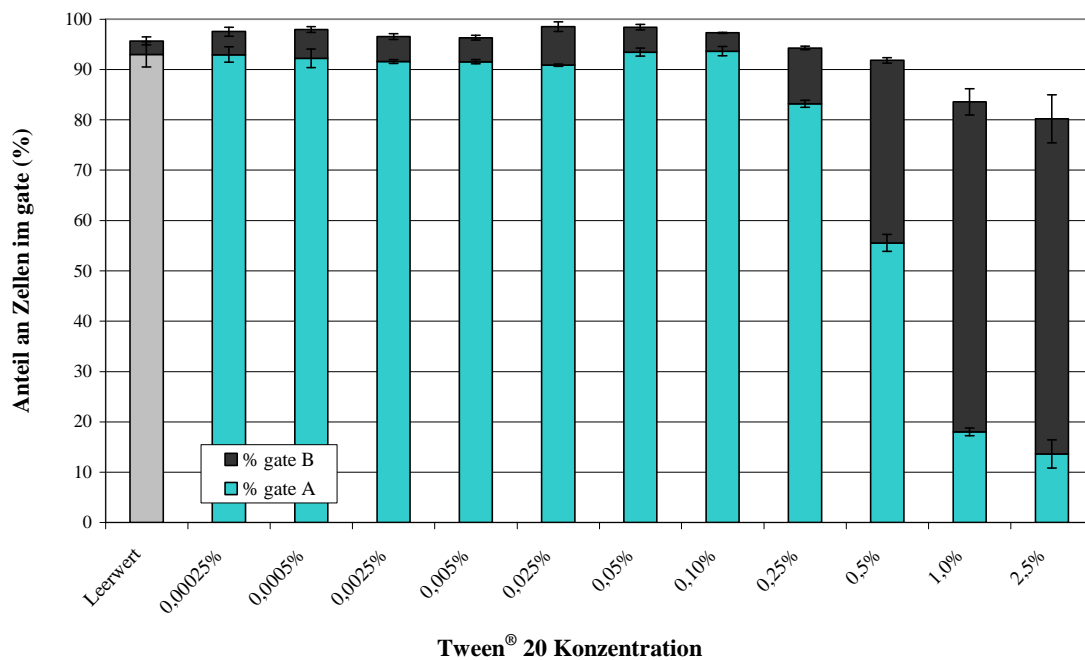


Abbildung 6: Fluoreszenzintensität von viablen Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 20-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 4°C beziehungsweise 37°C

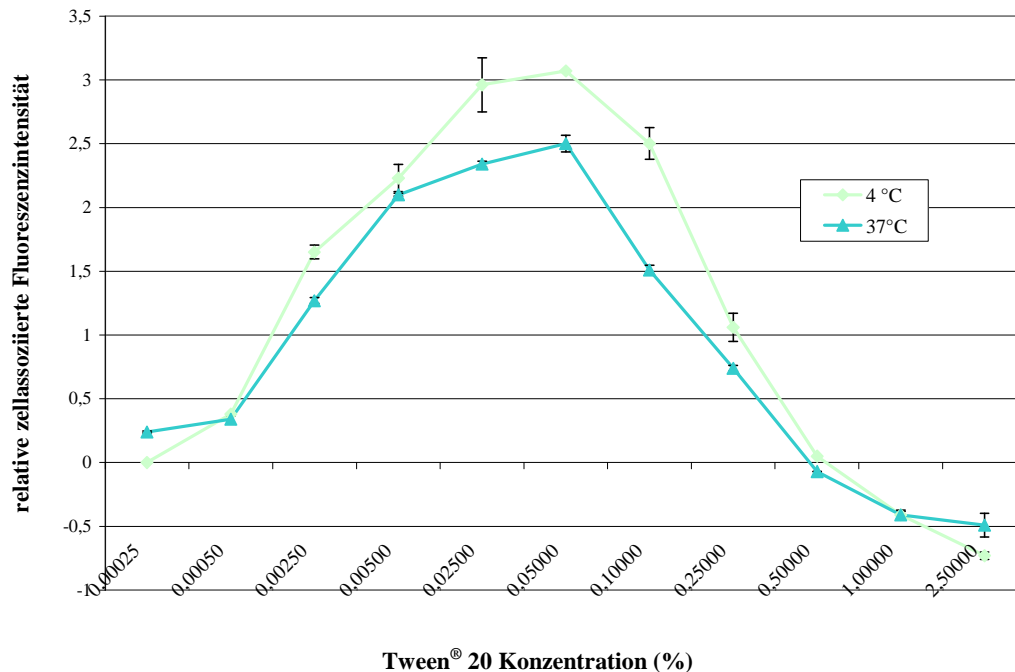


Abbildung 6 stellt die Fluoreszenzintensitäten der Caco-2 Einzelzellen in Abhängigkeit der Tween® 20 Konzentrationen, wie in Tabelle 1 und 2 angeführt, dar. Diese Messergebnisse machen deutlich, dass die Gegenwart von Tween® 20 die Nanopartikel-Zell Interaktion deutlich beeinflusst, wobei die Tendenzen von der Inkubationstemperatur unabhängig sind.

Bei einer Tween® 20 Zugabe von 0,00025 % und 0,0005 % ist die Interaktion zwischen Nanopartikeln und Caco-2 Einzelzellen vergleichbar mit dem Leerwert, sodass diese geringen Tensidkonzentrationen die Nanopartikel-Zell Interaktion nicht beeinflussen. Ab 0,0025 % steigt die zellgebundene Fluoreszenzintensität und erreicht bei 0,05 % Tween® 20 das Maximum. In diesem Maximum fluoreszieren die Caco-2 Zellen bei 4°C mit 3-facher Intensität und bei 37°C mit 2,5-facher Intensität im Vergleich zur Referenz. Bei höheren Tween® 20 Konzentrationen ist die Nanopartikelinteraktion mit der Zelle wieder geringer. Bei 0,5 % liegt die Fluoreszenzintensität im Bereich des Leerwertes, bei 1 % und 2,5 % ist sie sogar geringer als bei der Referenz.

Somit bewirkt die Gegenwart von geringen Mengen Tensid (bis 0,0005 %) keine Änderung der Interaktion zwischen Nanopartikeln und Dünndarmzellen. Eine weitere Erhöhung der Tensidkonzentration begünstigt die Assoziation von Nanopartikeln mit Caco-2 Zellen und erreicht bei 0,05 % Tween® 20 das Maximum, wobei diese Tensidkonzentrationen die

Viabilität der Zellen nicht verändern. Mit weiter steigender Tensidkonzentration nimmt die Nanopartikel-Zell Interaktion wieder ab, zusätzlich wird ab 0,25 % Tensid auch die Viabilität der Dünndarmzellen zunehmend beeinträchtigt. Ab 0,5 % Tween[®] 20 wird die Nanopartikel-Zell Wechselwirkung durch das Tensid soweit beeinträchtigt, dass die Anzahl der zellassozierten Partikel geringer ist als ohne Tensidzusatz und gleichzeitig innerhalb von einer Stunde eine beträchtliche Anzahl von Zellen durch das Tensid abstirbt.

4.1.2. Interaktionsstudien von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen mit Caco-2 Einzelzellen in Gegenwart von 0,00025 % - 2,5 % Tween® 80

Ziel des Versuches ist es festzustellen, ob die Interaktion von Nanopartikeln mit Caco-2 Zellen durch Zusatz einer Polysorbat 80 Lösung beeinflusst werden kann und die Zellviabilität dabei erhalten bleibt.

Durchführung

Der Zellsuspension werden Tween® 80-hältige Nanopartikel-Suspensionen (0,318 mg Nanopartikel/ml), deren Herstellung in Kapitel 3.2.3. beschrieben ist, in den Konzentrationen 0,0005 %; 0,001 %; 0,005 %; 0,01 %; 0,05 %; 0,1 %; 0,2 %; 0,5 %; 1 %, 2 % und 5 % zugesetzt. Dies entspricht den absoluten Tween® 80 Konzentrationen von 0,00025 % bis 2,5 %.

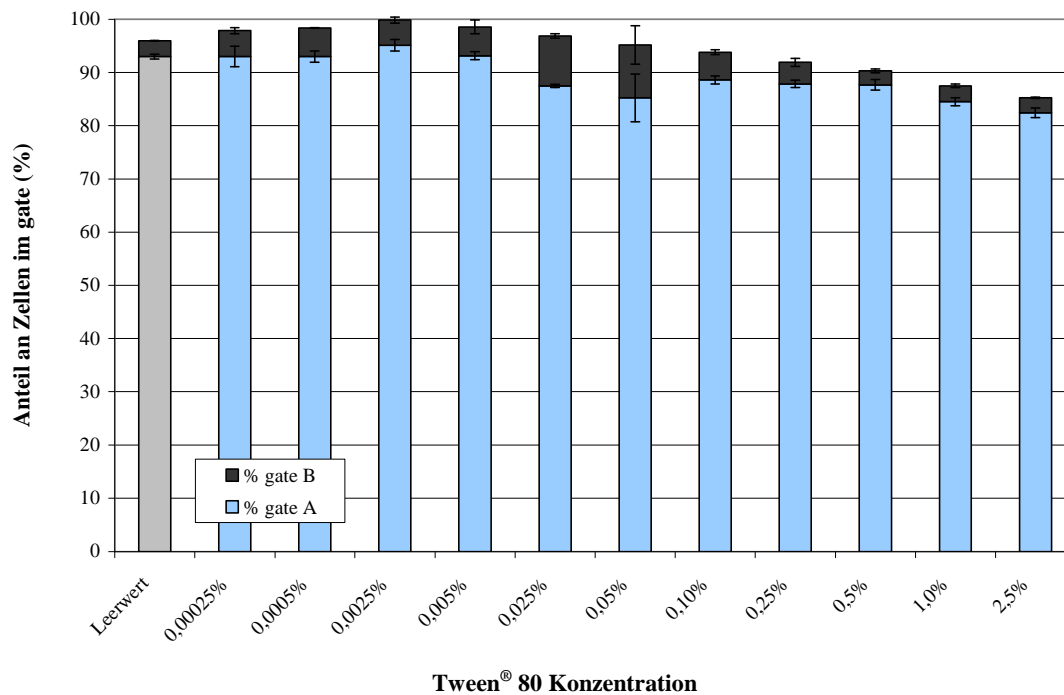
Inkubiert wird 60 Minuten bei 4°C oder 37°C.

Ergebnisse:

Tabelle 3: Anteil viabler und toter Zellen sowie zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 80-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 4°C

Tween® 80 Konzentration (%)	viabile Zellen (% gate A)	tote Zellen (% gate B)	Fluoreszenzintensität der viablen Zellen (RFU)
0,00025	93,00 ± 1,91	4,84 ± 0,57	0,12 ± 0,003
0,00050	93,00 ± 1,08	5,36 ± 0,81	0,81 ± 0,062
0,00250	95,12 ± 1,08	4,74 ± 0,56	0,92 ± 0,218
0,00500	93,17 ± 0,74	5,40 ± 1,32	1,85 ± 0,010
0,02500	87,48 ± 0,28	9,14 ± 0,42	2,12 ± 0,054
0,05000	85,22 ± 4,50	9,97 ± 3,59	2,27 ± 0,054
0,10000	88,61 ± 0,77	5,18 ± 0,45	1,59 ± 0,041
0,25000	87,84 ± 0,69	4,07 ± 0,74	0,43 ± 0,002
0,50000	87,68 ± 0,99	2,61 ± 0,35	-0,40 ± 0,001
1,00000	84,54 ± 0,75	2,94 ± 0,34	-0,75 ± 0,005
2,50000	82,43 ± 0,92	2,84 ± 0,13	-0,90 ± 0,003
Leerwert	93,00 ± 0,48	2,99 ± 0,02	0,00 ± 0,000

Abbildung 7: Anteil viabler (gate A) und toter Zellen (gate B) von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 80-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 4°C



Die in Abbildung 7 dargestellten Werte aus Tabelle 3 zeigen den prozentuellen Anteil an lebenden Zellen in gate A bzw. an toten Zellen in gate B im Vergleich zum Leerwert nach 60-minütiger Inkubation bei 4°C. Bei Tween® 80 Konzentrationen von 0,00025 % bis 0,005 % befinden sich etwa 93 % der Zellen in gate A, während der Anteil an toten Zellen etwa 5 % beträgt. Diese Verteilung der Zellpopulation entspricht jener der Referenzprobe. Ist die zugesetzte Tensidmenge größer, nimmt der Anteil an viablen Zellen geringfügig ab. In Konzentrationen von 0,025 % bis 2,5 % sind zwischen 82 % und 89 % der Zellen viabil. Der Anteil an toten Zellen ändert sich mit steigender Tween® 80 Konzentrationen kaum, sodass sich in allen gemessenen Konzentrationen 3-9 % der Zellen in gate B befinden.

Nach einstündiger Inkubation bei 37°C ist die Verteilung der analysierten Einzelzellen, dargestellt in Tabelle 4 und Abbildung 8, ähnlich wie bei 4°C. Bei Tween® 80 Konzentrationen von 0,00025 % bis 1,0 % sind zwischen 81 % und 95 % der Zellen viabil während 4,4 - 8 % der Zellen tot sind und in gate B akkumulieren. Bei einer Tensidkonzentration von 2,5 % sinkt der Anteil an Zellen in gate A auf 74,5 % und jener der toten Zellen steigt auf 15,2 %.

Tabelle 4: Anteil viabler und toter Zellen sowie zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 80-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 37°C

Tween® 80 Konzentration (%)	Viabile Zellen (% , gate A)	Tote Zellen (% , gate B)	Fluoreszenzintensität der viabilen Zellen (RFU)
0,00025	90,83 ± 1,91	6,68 ± 0,76	0,15 ± 0,078
0,00050	92,46 ± 0,51	6,00 ± 0,76	0,41 ± 0,044
0,00250	94,05 ± 0,85	5,41 ± 0,41	0,56 ± 0,097
0,00500	94,93 ± 2,28	4,37 ± 1,16	1,55 ± 0,036
0,02500	92,33 ± 1,01	6,33 ± 0,43	1,63 ± 0,071
0,05000	92,26 ± 0,80	5,77 ± 0,54	1,87 ± 0,022
0,10000	90,10 ± 0,92	5,79 ± 0,11	0,96 ± 0,039
0,25000	84,39 ± 0,71	6,82 ± 0,34	0,09 ± 0,022
0,50000	81,56 ± 0,17	8,07 ± 0,54	-0,46 ± 0,021
1,00000	84,31 ± 1,07	7,57 ± 2,65	-0,78 ± 0,001
2,50000	74,48 ± 3,14	15,18 ± 1,58	-0,89 ± 0,004
Leerwert	93,00 ± 0,69	4,75 ± 0,14	0,00 ± 0,000

Abbildung 8: Anteil viabler (gate A) und toter Zellen (gate B) von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 80-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 37°C

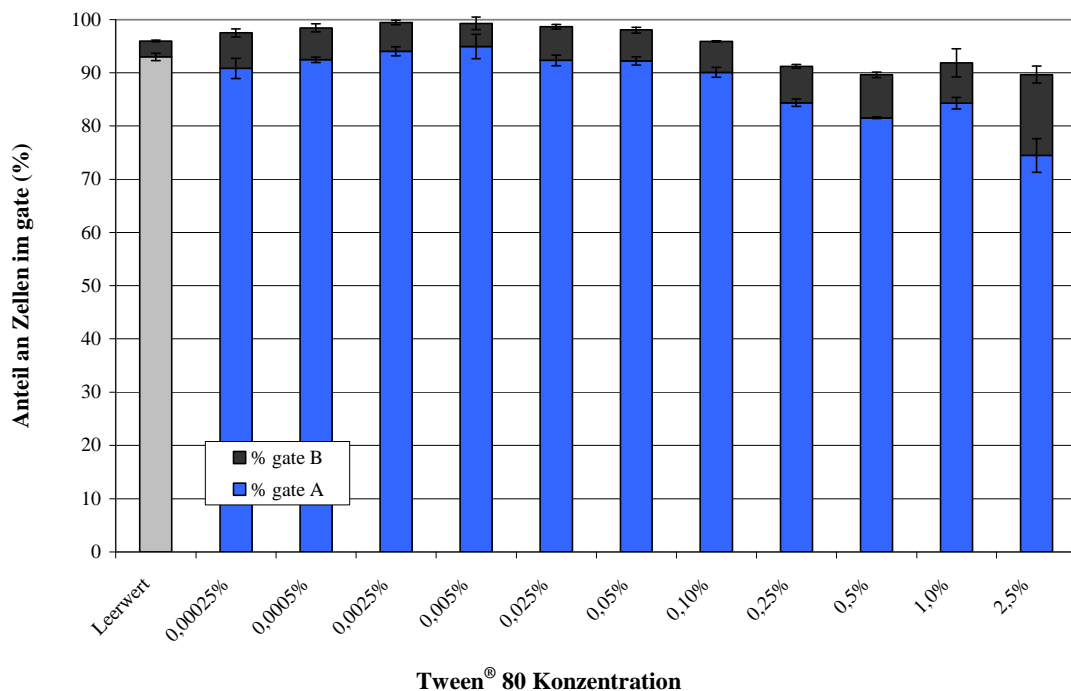
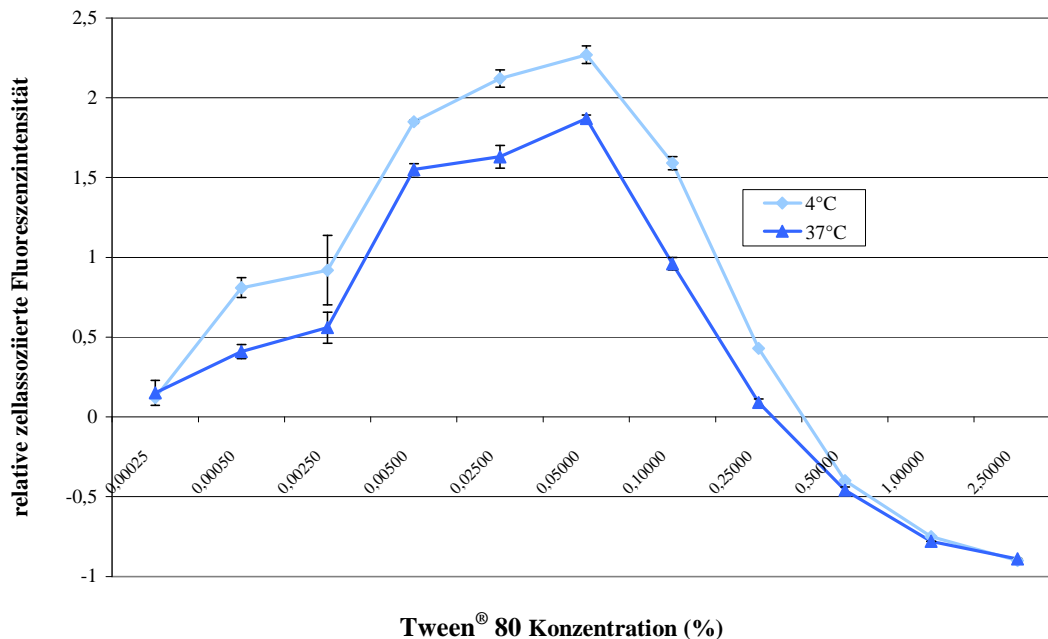


Abbildung 9: Fluoreszenzintensität von viablen Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Tween® 80-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 4°C beziehungsweise 37°C



In Abbildung 9 sind die, in Tabelle 3 und 4 angeführten, Fluoreszenzintensitäten der Caco-2 Einzelzellen dargestellt, die eine einstündige Inkubation bei 4°C bzw. 37°C mit Tween® 80-hältigen Nanopartikel-Suspensionen ergibt. Wie bei den Untersuchungen mit Tween® 20 ist auch bei Tween® 80 die Tendenz der Nanopartikel-Zell Interaktionen unabhängig von der Inkubationstemperatur. Bei einer Tween® 80 Konzentration von 0,00025 % ist die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Caco-2 Einzelzellen vergleichbar mit dem Leerwert. Bei Inkubation mit 0,0005 % und 0,0025 % Tween® 80 steigt die relative zellgebundene Fluoreszenzintensität auf 0,5 bzw. 1,0. Bei weiter zunehmender Tensidkonzentration steigt die Nanopartikelassoziation an die Caco-2 Zelle steil an und erreicht in Gegenwart von 0,05 % Tween® 80 ihr Maximum mit der 2,3-fachen (Referenz bei 4°C) bzw. der 1,9-fachen (Referenz bei 37°C) Intensität. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Nanopartikel-Zell Interaktion wieder ab, wobei die Fluoreszenzintensität ab 0,5 % geringer ist als jene der Leerwerte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sehr geringe Tween® 80 Konzentrationen (0,00025 %) die Nanopartikel-Zell Interaktion nicht beeinflussen. Bei steigender Tensidkonzentration bis 0,5 % wird die Wechselwirkung zwischen Polystyrolnanopartikeln und Caco-2 Zellen begünstigt und erreicht die bis zu 2,3-fache Intensität der Referenzprobe.

Bei weiterer Erhöhung der Tween[®] 80 Konzentrationen nimmt die an die Zelle gebundene Nanopartikelmenge wieder ab und ist ab einer Tensidzugabe von 0,25 % geringer als jene der Referenzprobe. Die Zellviabilität wird in Gegenwart von 0,00025- bis 1,0 %iger Tween[®] 80 Lösung nicht beeinflusst und bei Zusatz von 2,5 % nur geringfügig beeinträchtigt.

4.1.3. Interaktionsstudien von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen mit Caco-2 Einzelzellen in Gegenwart von 0,0005 % - 2,5 % Pluronic® F-68

Ziel des Versuches ist es festzustellen, ob die Interaktion von Nanopartikeln mit Caco-2 Zellen durch Zusatz einer Poloxamer 188 Lösung beeinflusst werden kann und die Zellviabilität dabei erhalten bleibt.

Durchführung

Der Zellsuspension werden Pluronic® F-68-hältige Nanopartikel-Suspensionen (0,318 mg Nanopartikel/ml), deren Herstellung in Kaptiel 3.2.3. beschrieben ist, in den Konzentrationen 0,001 %; 0,01 %; 0,1 %; 0,2 %; 0,5 %; 1 %, 2 % und 5 % zugesetzt. Dies entspricht den absoluten Pluronic® Konzentrationen von 0,0005 % bis 2,5 %.

Inkubiert wird 60 Minuten bei 4°C oder 37°C.

Ergebnisse:

Tabelle 5: Anteil viabler und toter Zellen sowie zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Pluronic® F-68-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 4°C

Pluronic® F-68 Konzentration (%)	viabile Zellen (% , gate A)	tote Zellen (% , gate B)	Fluoreszenzintensität der viabilen Zellen (RFU)
0,00050	92,82 ± 1,48	6,55 ± 0,34	0,00 ± 0,001
0,00500	93,15 ± 1,45	5,76 ± 0,96	0,03 ± 0,044
0,05000	93,34 ± 0,72	2,11 ± 0,24	0,11 ± 0,072
0,10000	93,84 ± 0,56	1,49 ± 0,09	0,23 ± 0,036
0,25000	93,39 ± 0,53	2,17 ± 0,19	0,31 ± 0,001
0,50000	93,34 ± 0,36	2,78 ± 0,26	0,50 ± 0,058
1,00000	92,88 ± 0,81	3,26 ± 0,20	0,59 ± 0,050
2,50000	92,85 ± 0,56	3,26 ± 0,18	1,26 ± 0,035
Leerwert	93,00 ± 0,48	2,78 ± 0,03	0,00 ± 0,000

Die in Abbildung 10 dargestellten Werte aus Tabelle 5 zeigen den prozentuellen Anteil an lebenden Zellen in gate A und toten Zellen in gate B im Vergleich zum Leerwert nach einstündiger Inkubation bei 4°C mit Pluronic® F-68-hältigen Nanopartikel-Suspensionen.

Bei den analysierten Konzentrationen von 0,0005 % bis 2,5 % beträgt der Anteil an viabilen Zellen vergleichbar mit dem Leerwert etwa 93 %. Der Anteil an toten Zellen in gate B variiert zwischen 1,5 % und 6,5 % und liegt ebenso im Bereich der Tensid-freien Referenzproben.

Abbildung 10: Anteil viabler (gate A) und toter Zellen (gate B) von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Pluronic® F-68-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 4°C

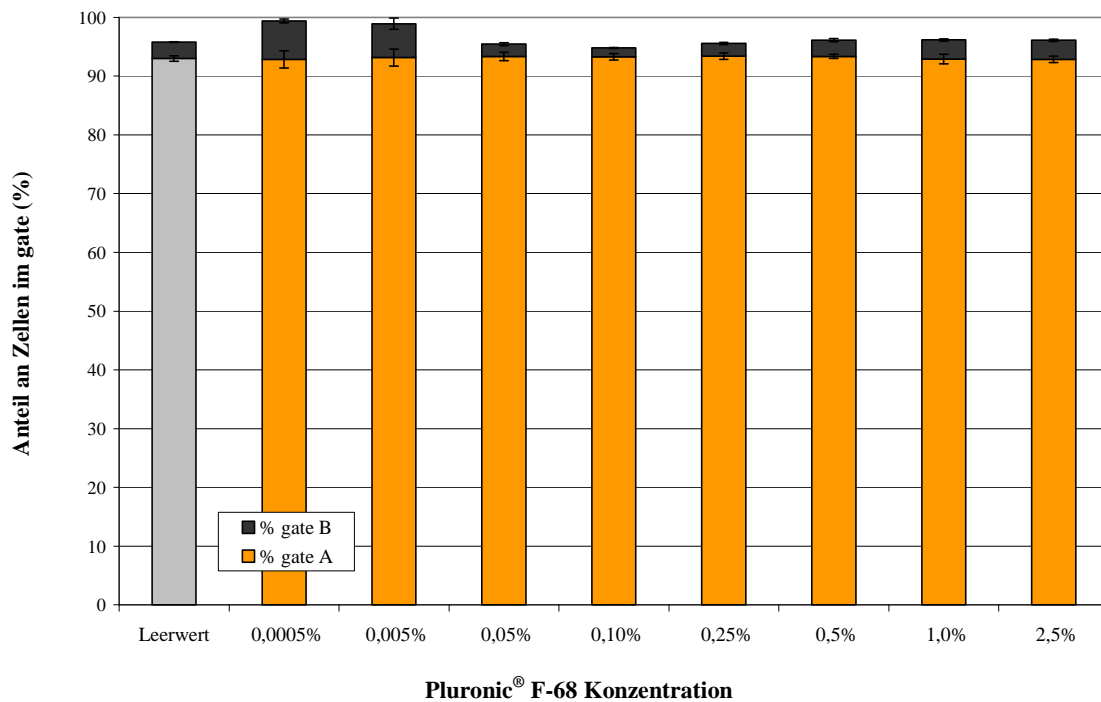


Tabelle 6: Anteil viabler und toter Zellen sowie zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Pluronic® F-68-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 37°C

Pluronic® F-68 Konzentration (%)	viabile Zellen (% , gate A)	tote Zellen (% , gate B)	Fluoreszenzintensität der viabilen Zellen (RFU)
0,00050	92,54 ± 0,90	4,79 ± 0,77	0,01 ± 0,041
0,00500	92,19 ± 1,24	4,50 ± 0,15	0,00 ± 0,034
0,05000	94,98 ± 0,54	0,86 ± 0,04	0,02 ± 0,033
0,10000	94,90 ± 0,85	2,81 ± 0,21	0,08 ± 0,066
0,25000	94,02 ± 0,27	1,03 ± 0,29	0,10 ± 0,019
0,50000	94,47 ± 2,03	2,14 ± 0,50	0,26 ± 0,037
1,00000	93,81 ± 0,66	2,27 ± 0,13	0,30 ± 0,119
2,50000	91,01 ± 1,44	2,20 ± 0,08	0,69 ± 0,131
Leerwert	93,00 ± 1,13	3,97 ± 0,39	0,00 ± 0,000

Abbildung 11: Anteil viabler (gate A) und toter Zellen (gate B) von Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Pluronic® F-68-hältiger Nanopartikel-Suspensionen bei 37°C

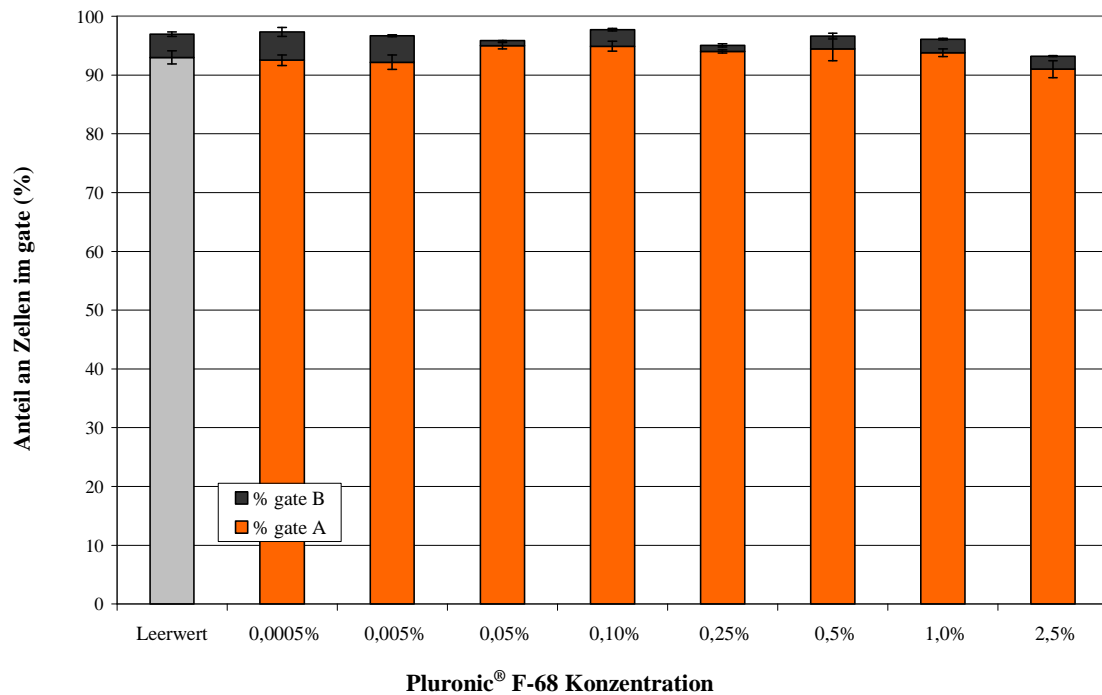


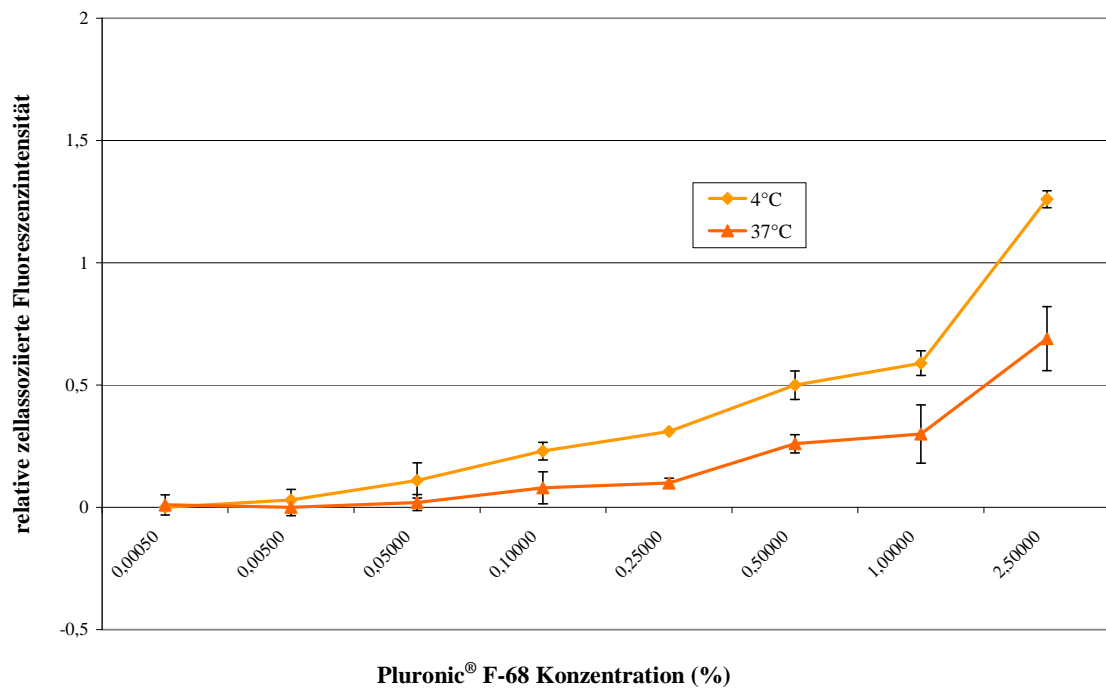
Tabelle 6 und Abbildung 11 zeigen, dass Pluronic® F-68 in Konzentrationen von 0,0005 - 2,5 % auch nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C keinen Einfluss auf die Viabilität der Caco-2 Zellen ausübt.

In Abbildung 12 sind die in Tabelle 5 und 6 angegebenen Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation bei 4°C bzw. 37°C dargestellt. Die Messergebnisse zeigen, dass bis zu einer Pluronic® F-68 Konzentration von 0,25 % die Nanopartikel-Zell Interaktion im Vergleich zur Referenz nicht beeinflusst wird. In Gegenwart von 0,5 % und 1,0 % Tensid steigt die relative Fluoreszenzintensität auf 0,3 bzw. 0,6 an. Der Zusatz von 2,5 % Pluronic® F-68 wird in dieser Messreihe das Maximum der Nanopartikel-Zell Interaktion erreichen. Im Vergleich zur jeweiligen Referenzlösung ist die zellassoziierte Fluoreszenzintensität und damit die zellassoziierte Nanopartikelmenge nach Inkubation bei 4°C deutlich höher als bei 37°C. Die Absolutwerte - die gemessenen Fluoreszenzintensitäten - sind hingegen nach Inkubation bei 37°C höher als bei 4°C.

Insgesamt bewirkt die Co-Inkubation mit 0,0005 - 2,5 % Pluronic® F-68 eine kontinuierliche Steigerung der Assoziation von Nanopartikeln mit Caco-2 Einzelzellen. Die Zellviabilität bleibt dabei erhalten. Pluronic® F-68 übt somit nach einstündiger Inkubation in

Konzentrationen bis zu 2,5 % keinen schädlichen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen aus, begünstigt aber die Interaktion mit Nanopartikeln.

Abbildung 12: Fluoreszenzintensität von viablen Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation mit Pluronic® F-68-hältigen Nanopartikel-Suspensionen bei 4°C beziehungsweise 37°C



4.1.4. Interaktionsstudien von Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen mit Caco-2 Einzelzellen bei Nanopartikel-Konzentrationen von 0,159 mg/ml bis 0,318 mg/ml

Es sollte untersucht werden, ob auch bei geringerer Nanopartikelkonzentration (kleiner als 0,318 mg/ml) der eingesetzten Tensidlösungen die Fluoreszenzintensität der analysierten Caco-2 Einzelzellen höher ist als bei der Referenzlösung und somit die Assoziation von Nanopartikeln mit den Zellen begünstigt wird. Es sollte durch den Versuch ausgeschlossen werden, dass die gemessene erhöhte zellassoziierte Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit den Tensidlösungen nur auf eine zu konzentrierte Nanopartikel-Suspension zurückzuführen ist.

Dazu werden jene Tensidkonzentrationen eingesetzt, die in den Kapiteln 4.1.1. - 4.1.3. beschriebenen Studien, die Nanopartikel-Zell Interaktion am günstigsten beeinflusst haben. Dies ist bei 0,05 %iger Tween[®] 20, 0,05 %iger Tween[®] 80 Lösung und 2,5 %iger Pluronic[®] F-68 Lösung der Fall. Inkubiert werden die Caco-2 Einzelzellen 60 Minuten bei 4°C bzw. 37°C.

Durchführung

Die Nanopartikel-Suspensionen werden in den Konzentrationen 0,318 mg/ml, 0,254 mg/ml, 0,212 mg/ml und 0,159 mg/ml eingesetzt. Die Suspensionen werden mit einer 0,1 %igen Tween[®] 20, 0,1 %igen Tween[®] 80 und einer 5 %igen Pluronic[®] F-68 Lösung sowie mit 20 mM isotonem HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 als Referenzlösung, wie im Kapitel 3.2.3. beschrieben, hergestellt.

Nach Zugabe der Tensidlösungen zur Zellsuspension ergeben sich die absoluten Tween[®] Konzentrationen von 0,05 % und die Pluronic[®] Konzentration von 2,5 %. Nach einer Inkuabationszeit von 60 Minuten bei 4°C bzw. 37°C wird durchflusszytometrisch analysiert. Um zu gewährleisten, dass die Nanopartikel-Suspensionen der vier Verdünnungen aller Tenside vergleichbare Fluoreszenzintensitäten aufweisen, wird deren Absorption photometrisch mit dem Mikrotiterplattenfluorimeter bestimmt.

Da die Fluoreszenzintensitäten (Tabelle 7) der Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen in den jeweiligen Konzentrationen untereinander vergleichbar sind, kann ein Einfluss der Tenside auf die Fluoreszenzausbeute der Nanopartikeln ausgeschlossen werden. Somit wird

beim folgenden Versuch in Gegenwart von Caco-2 Zellen nur die Nanopartikel-Zell Interaktion erfasst.

Tabelle 7: Fluoreszenzintensitäten der Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen mit 0,318 - 0,159 mg Nanopartikel/ml

Tenside	Nanopartikel-konzentration 0,318 mg/ml	Nanopartikel-konzentration 0,254 mg/ml	Nanopartikel-konzentration 0,212 mg/ml	Nanopartikel-konzentration 0,159 mg/ml
Leerwert	27115 ± 241	21323 ± 710	17956 ± 270	13691 ± 125
<u>0,1% Tween® 20</u>	28216 ± 358	23308 ± 45	19281 ± 15	14079 ± 125
<u>0,1% Tween® 80</u>	27421 ± 460	22755 ± 170	18398 ± 355	14079 ± 71
<u>5% Pluronic® F-68</u>	27025 ± 136	22390 ± 457	18295 ± 36	13883 ± 12

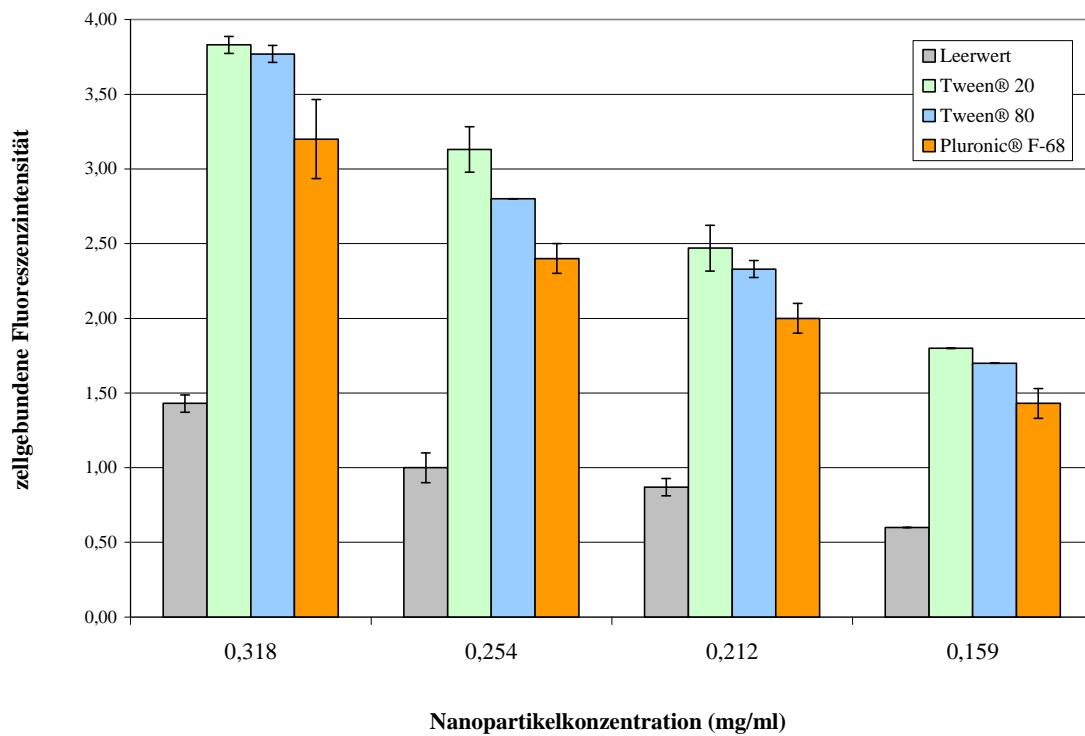
Ergebnisse:

Der Anteil an viablen Zellen in gate A beträgt nach einstündiger Inkubation sowohl bei 4°C als auch bei 37°C etwa 92 %. In den Tabellen 8 und 9 sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten angeführt, die in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt werden.

Tabelle 8: Zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität viabler Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation bei 4°C mit Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen in unterschiedlichen Nanopartikel-Konzentrationsbereichen

Tenside	Nanopartikel-konzentration 0,318 mg/ml	Nanopartikel-konzentration 0,254 mg/ml	Nanopartikel-konzentration 0,212 mg/ml	Nanopartikel-konzentration 0,159 mg/ml
Leerwert	1,43 ± 0,058	1,00 ± 0,100	0,87 ± 0,058	0,60 ± 0,001
<u>0,1% Tween® 20</u>	3,83 ± 0,058	3,13 ± 0,153	2,47 ± 0,153	1,80 ± 0,002
<u>0,1% Tween® 80</u>	3,77 ± 0,058	2,80 ± 0,001	2,33 ± 0,058	1,70 ± 0,001
<u>5% Pluronic® F-68</u>	3,20 ± 0,265	2,40 ± 0,100	2,00 ± 0,100	1,43 ± 0,100

Abbildung 13: Zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität viabler Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation bei 4°C mit Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen in unterschiedlichen Nanopartikel-Konzentrationsbereichen



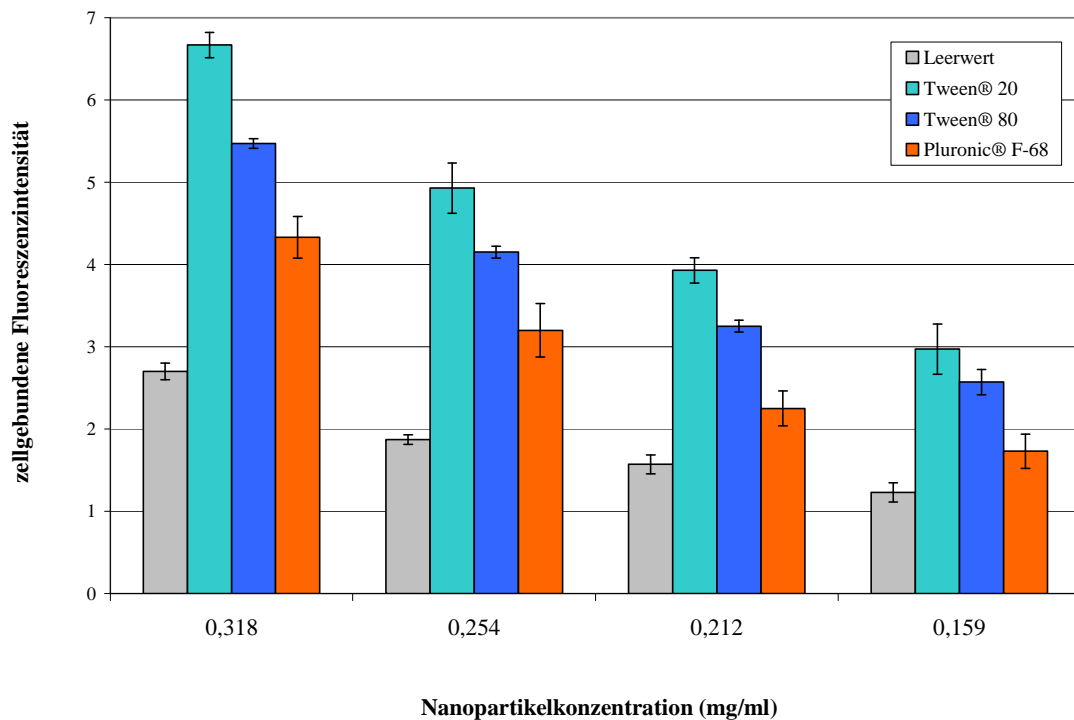
In Gegenwart der Tenside sind unabhängig von der Nanopartikelkonzentration nach einstündiger Inkubation, sowohl bei 4°C als auch bei 37°C die Fluoreszenzintensitäten der Caco-2 Zellen deutlich höher als jene der Referenz ohne Tensidzusatz. Auch bei einer sehr geringen Konzentration der Nanosphären (0,159 mg/ml) steigt die zellassoziierte Nanopartikel-Menge. Somit begünstigen diese Tenside die Wechselwirkung zwischen Dünndarmzellen und Nanopartikeln, da immer ein bestimmter Anteil der Nanopartikel zusätzlich an die Zelle bindet als bei der Referenzprobe.

Werden die Referenzwerte von den Probewerten abgezogen, so ergeben sich nach einstündiger Inkubation bei 37°C höhere Fluoreszenzintensitäten als bei 4°C.

Tabelle 9: Zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität viabler Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C mit Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen in unterschiedlichen Nanopartikel-Konzentrationsbereichen

Tenside	Nanopartikel-konzentration 0,318 mg/ml	Nanopartikel-konzentration 0,254 mg/ml	Nanopartikel-konzentration 0,212 mg/ml	Nanopartikel-konzentration 0,159 mg/ml
Leerwert	2,70 ± 0,100	1,87 ± 0,058	1,57 ± 0,116	1,23 ± 0,116
0,1% Tween® 20	6,67 ± 0,153	4,93 ± 0,306	3,93 ± 0,153	2,97 ± 0,306
0,1% Tween® 80	5,47 ± 0,058	4,15 ± 0,071	3,25 ± 0,071	2,57 ± 0,153
5% Pluronic® F-68	4,33 ± 0,252	3,20 ± 0,325	2,25 ± 0,212	1,73 ± 0,208

Abbildung 14: Zellgebundene nanopartikuläre Fluoreszenzintensität viabler Caco-2 Einzelzellen nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C mit Tensid-hältigen Nanopartikel-Suspensionen in unterschiedlichen Nanopartikel-Konzentrationsbereichen



4.2. Bestimmung der Zytotoxizität der Tensidlösungen mittels Propidiumiodid-Färbung von Caco-2 Einzelzellen

Die Färbung mit Propidiumiodid (PI) ist eine sensitive Methode, um zwischen lebenden und toten Zellen einer Population zu unterscheiden. PI dringt in Zellen mit perforierter Membran ein und färbt diese durch Interkalation mit der DNA. Die DNA im Zellkern viabler Zellen mit intakter Zellmembran ist für PI jedoch nicht zugänglich [35].

Mit Hilfe dieses Farbstoffes soll verifiziert werden, dass bei der durchflusszytometrischen Bestimmung die in gate A befindlichen Caco-2 Zellen tatsächlich lebensfähig sind.

Im Versuch werden jene Tensidkonzentrationen eingesetzt, die bei den durchflusszytometrischen Analysen die größte Zunahme der Nanopartikelinteraktion mit Caco-2 Zellen hervorrufen. Somit werden 0,05 %ige Tween[®] 20 und Tween[®] 80 sowie 2,5 %ige Pluronic[®] F-68 Lösungen verwendet. Die Versuche werden mit Tensidlösungen ohne Nanopartikel-Zusatz durchgeführt, um zu vermeiden, dass die Fluoreszenz der Partikel den durch Propidiumiodid hervorgerufenen Farbshift überlagern.

Die Versuche werden mit Caco-2 DSMZ Zellen der Passage 53 und 63 durchgeführt.

Durchführung

In ein 2 ml Eppendorfgefäß werden 50 µl Zellsuspension ($5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) und 50 µl der jeweiligen auf 4°C gekühlten Tensidlösung in 20 mM isotonem HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 eingebracht, einige Sekunden lang am Vortex gemischt und die Proben 60 Minuten bei 4°C bzw. 37°C inkubiert. Um die überschüssige Tensidlösung nach der Inkubation zu entfernen, wird zwei Mal mit auf 4°C gekühltem PBS-Puffer pH 7,2-7,3 mit Calcium und Magnesium gewaschen. Zunächst werden je Eppendorfgefäß 100 µl PBS zugesetzt, kurz am Vortex gemischt und bei 1000 UpM fünf Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Danach wird der Überstand (150 µl) vorsichtig mit einer Mikropipette abgehoben. Anschließend werden pro Eppendorfgefäß 150 µl PBS zugesetzt, resuspendiert, zentrifugiert und 150 µl Überstand abgehoben. Zu den verbleibenden 50 µl der Probe werden 150 µl des PBS-Puffers zugesetzt, resuspendiert und anschließend, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, durchflusszytometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 575 nm analysiert. Die Probe mit 100% toten Zellen wird wie in Kapitel 3.3.1. beschrieben hergestellt.

Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigen, dass alle in gate A befindlichen Zellen tatsächlich viabil sind und die toten Zellen in gate B akkumulieren. Die gemessene Fluoreszenzintensität in gate A liegt bei allen Proben bei 0,1 und entspricht somit der Eigenfluoreszenz der Zellen. Die in gate B befindlichen Zellen weisen hingegen eine Fluoreszenzintensität im Bereich zwischen 6,5 und 10 auf. Dieser Wert wurde auch von der Probe mit 100 % toten Zellen erreicht.

Da die gemessenen Proben des Versuches sehr einheitliche Ergebnisse aufweisen, werden die Daten nicht in einer Tabelle angegeben.

4.3. Bestimmung der Viabilität von Caco-2 Zellen in Gegenwart von Tensidlösungen mittels EZ4U-Test

Das Ziel des folgenden Versuches besteht darin, den Einfluss von Tensidlösungen unterschiedlicher Konzentration auf die Viabilität von Caco-2 Zellen zu untersuchen. Im Unterschied zum Toxizitätstest mit Propidiumiodid ist beim EZ4U Viabilitätstest die Funktionalität der Mitochondrien die Grundlage für die Beurteilung der Viabilität. Zusätzlich werden nicht Caco-2 Einzelzellen 60 Minuten lang mit den Tensidlösungen inkubiert, sondern es wird ein artifizielles Dünndarmepithel in Form eines Caco-2 monolayers in einer 96-well Mikrotiterplatte eingesetzt. Diese Zellen werden in Gegenwart der Tensidlösungen drei Tage kultiviert, wodurch deren Einfluss sowohl auf die Wachstumsrate als auch auf die Viabilität untersucht werden kann. Die Zellzahl wird indirekt durch Analyse der Farbintensität des gebildeten Reaktionsproduktes der zugesetzten Substratlösung ermittelt. Untersucht werden Tensidlösungen von Tween[®] 20, Tween[®] 80 und Pluronic[®] F-68.

Durchführung

Caco-2 DSMZ Zellen der Passagezahl 56 werden in einer 96-well Mikrotiterplatte (Iwaki, Bertoni, Wien, Österreich) angesetzt. Pro well werden 3000 Zellen in 180 µl RPMI-Medium ausgesät und pro well 20 µl der Tensidlösungen hinzugefügt. Tween[®] 20 und Tween[®] 80 werden in den Konzentrationen 0,05 %, 0,1 % und 0,2 % zugesetzt; dies entspricht aufgrund der 1:10 Verdünnung mit der Zellsuspension in RPMI-Medium den absoluten Konzentrationen von 0,025 %, 0,05 % und 0,1 %. Die Pluronic[®] F-68 Zugabe erfolgt in den Konzentrationen 2 %, 4 %, 6 %, 8 % und 10 % und entspricht daher den absoluten Konzentrationen von 0,2 % bis 1 %.

Nach dreitägiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wird der EZ4U-Test, wie in Kapitel 3.3.2.1. beschrieben, durchgeführt. Das gebildete Formazanderivat, dessen Farbintensität mit der Anzahl an viablen Zellen korreliert, wird photometrisch im Mikrotiterplattenfluorimeter bestimmt.

Ergebnisse

In Tabelle 10 und Abbildung 15 sind die Absorptionswerte der Proben dargestellt, wobei die Farbintensität des Mediums von den Messwerten abgezogen ist.

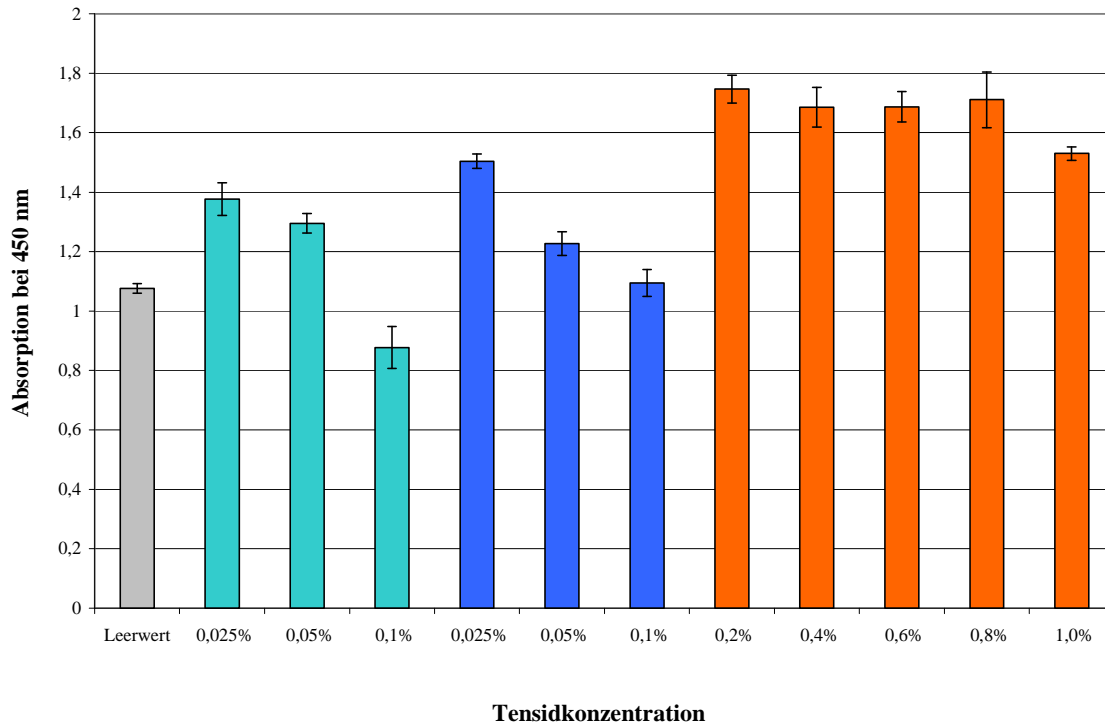
Der Leerwert spiegelt die Zellviabilität ohne Tensidzusatz wieder. Im Vergleich dazu ist die Farbintensität des gebildeten Reaktionsproduktes bei Inkubation mit 0,2 bis 1,0 %iger Pluronic® F-68 Lösungen um 42 - 62 % größer. Bei den beiden Tween® Arten ist die Viabilität der Caco-2 Zellen abhängig von der Tensidkonzentration. Wie bereits in den Interaktionsstudien (siehe Kapitel 4.1.1.) gezeigt werden konnte, bewirken höhere Tween® 20 Konzentrationen eine erhebliche Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Caco-2 Zellen. Während bei 0,025 % Tween® 20 die Farbintensität um 28 % höher ist als jene der Referenz, nimmt bei steigender Tween® 20 Konzentration die Anzahl an viablen Zellen jedoch deutlich ab. In Gegenwart einer 0,1 %igen Tween® 20 Lösung ist die Farbintensität des Substrates und damit die Zellviabilität um 18,5 % geringer als jene des Leerwertes. In ähnlicher Weise, jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Tween® 20, bewirkt der Zusatz von 0,025 % Tween® 80 eine Steigerung der Zellviabilität um 40 %, die bei zunehmender Tensidkonzentration wieder abnimmt und bei 0,1 % Tween® 80 im Bereich des Leerwertes liegt.

Bei der dreitägigen Kultivierung mit Pluronic® F-68 steigt die Zellviabilität im Vergleich zur Referenzprobe. In Gegenwart von 0,2 - 0,8 % Pluronic® F-68 ist die gemessene Absorption um 57 - 62 % höher als jene des Leerwertes. Bei Zusatz von 1,0 % Tensid ist dieser Viabilitäts-stigernde Effekt mit 42 % etwas geringer ausgeprägt.

Tabelle 10: Viabilität von Caco-2 Zellen nach dreitägiger Inkubation mit Tween® 20, Tween® 80 und Pluronic® F-68 Lösungen (EZ4U-Test)

Tensid-Konzentration (%)	<u>Tween® 20</u>	<u>Tween® 80</u>	<u>Pluronic® F-68</u>	Leerwert
0,025	1,377 ± 0,055	1,504 ± 0,024		
0,050	1,295 ± 0,033	1,227 ± 0,040		
0,100	0,877 ± 0,070	1,094 ± 0,046		
0,200			1,747 ± 0,047	
0,400			1,686 ± 0,067	
0,600			1,687 ± 0,051	
0,800			1,711 ± 0,094	
1,000			1,530 ± 0,023	
				1,076 ± 0,016

Abbildung 15: Viabilität von Caco-2 Zellen nach dreitägiger Inkubation mit Tween® 20, Tween® 80 und Pluronic® F-68 Lösungen (E4U-Test)
hellgrau: Leerwert; grün: Tween® 20; blau: Tween® 80, orange: Pluronic® F-68



Somit bewirkt die Gegenwart von 0,2 - 1,0 % Pluronic® F-68 eine Erhöhung der Zellviabilität um das etwa 1,5-fache des Leerwertes. Bei Zugabe von Tween® 20 in geringen Konzentrationen (0,025 % und 0,05 %) wird die Viabilität ebenfalls positive beeinflusst. Bei 0,1 % Tween® 20 ist jedoch ein geringer zellschädigender Effekt zu beobachten, da die Zellviabilität nur noch 82 % der Referenzprobe beträgt. Werden Caco-2 Zellen mit Tween® 80 drei Tage lang kultiviert, so kommt es in Gegenwart von 0,025 % zu einer 1,4-fachen Steigerung der Viabilität im Vergleich zur Referenz. In Konzentrationen bis 0,1 % Tween® 80 ist kein zytotoxischer Effekt zu beobachten.

4.4. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen in Gegenwart von Tensidlösungen mittels Cell Proliferation ELISA, BrdU-Test

Mit dem Cell Proliferation ELISA, BrdU-Test steht eine Methode zu Verfügung, welche die quantitative Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen durch Einbau von 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) in die DNA während der Synthesephase ermöglicht. Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgt indirekt über die Bindungsrate eines Enzym-markierten BrdU-Antikörpers durch Bestimmung der Farbintensität des gebildeten Oxidationsproduktes von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), welche mit der Menge an proliferierenden Zellen korreliert (siehe Kapitel 3.3.2.2.). Es soll überprüft werden, ob die Gegenwart von Tensidlösungen die Proliferation von Caco-2 Zellen beeinflusst. Untersucht werden die Tenside Tween[®] 20 und 80 im Konzentrationsbereich von 0,001 % - 0,05 % sowie 0,2 % - 1,0 % Pluronic[®] F-68.

Für diese Versuche werden Caco-2 Zellen in einer 96-well Mikrotiterplatte angesetzt und für zwei und drei Tage in Gegenwart der Tensidlösungen kultiviert, wie in Kapitel 3.3.2.2. beschrieben. Als Zellmaterial dienen einerseits frisch subkultivierte Zellen, andererseits aufgetaute Caco-2 Zellen, die zuvor in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert wurden. Das Einfrieren und Auftauen bedeutet Stress für die Zellen. Folglich müssen die Zellen einige Male passagiert werden, bis sie ihren üblichen Metabolismus bzw. ihre gewohnte Wachstumsrate erreicht haben.

Die Durchführung des BrdU-Tests erfolgt wie unter 3.3.2.2. beschrieben. Die im Mikrotiterplattenfluorimeter bei 450 nm bestimmte TMB-Farbintensität korreliert mit der DNA-Synthese-Rate und daher mit der Zellproliferationsrate in der Probe.

4.4.1. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen in Gegenwart der Tenside Tween[®] 20, Tween[®] 80 und Pluronic[®] F-68

Pro well einer 96-well Mikrotiterplatte (Iwaki, Bertoni, Wien, Österreich) werden 180 µl Zellsuspension, die 17.000 frisch subkultivierte Zellen in RPMI-Medium und 20 µl der zu untersuchenden Tensidlösung enthält 48 bzw. 72 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Danach wird der Cell Proliferation ELISA, der BrdU-Test, durchgeführt. Als Leerwert dient ein Ansatz, der an Stelle von Tensidlösung 20 µl ein 20 mM isotoner HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4 zugesetzt wurde.

4.4.1.1. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen in Gegenwart von Tween® 20 und Tween® 80 Lösungen

In diesem Versuch soll geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß die Gegenwart von Tween® 20 und Tween® 80 Lösungen die Proliferationsrate von Caco-2 Zellen beeinflusst.

Zunächst sollen Tween® 20 und 80 Lösungen in den Konzentrationen von 0,01 %, 0,02 % und 0,05 % untersucht werden. Da die zugesetzten Tensidlösungen in den wells 1:10 mit der Zellsuspension verdünnt werden, werden sie zehnfach konzentriert eingesetzt. Für den Versuch werden Caco-2 DSMZ Zellen der Passagezahl 39 verwendet.

Ergebnisse

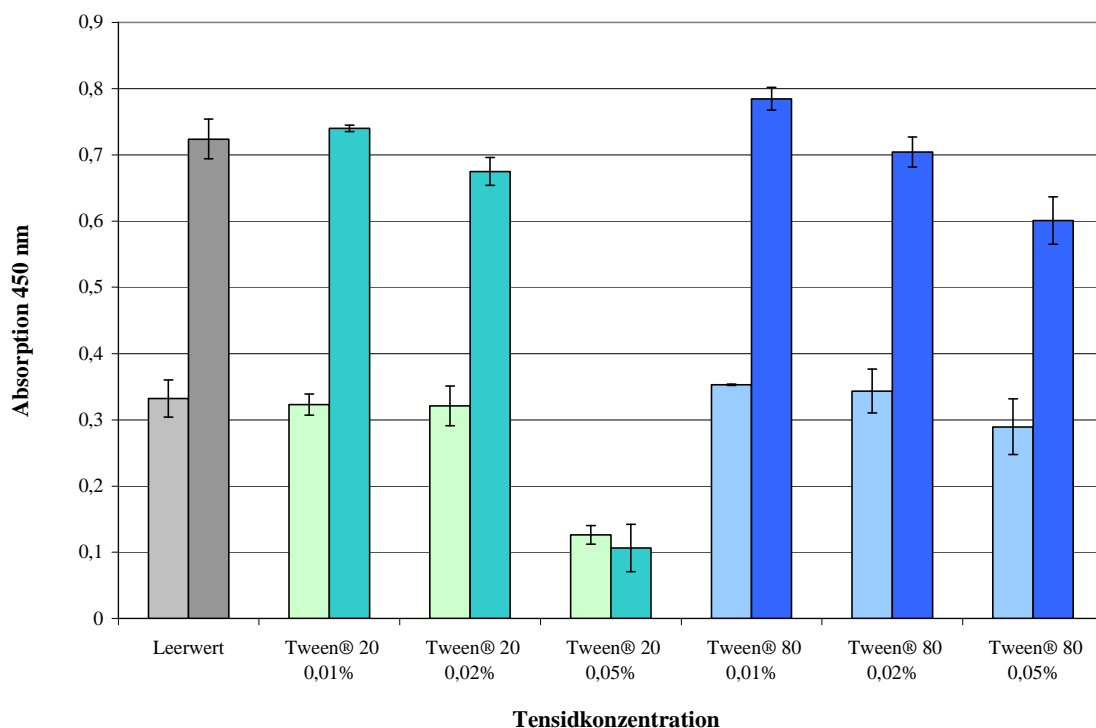
Tabelle 11 und Abbildung 16 zeigen die Farbintensitäten des gebildeten Reaktionsproduktes, das zur Anzahl an proliferierenden Zellen korreliert, nach einer Inkubationszeit von zwei und drei Tagen. Nach 48 Stunden entspricht bei Zusatz von 0,01 % Tween® 20 die Proliferationsrate der Zellen in etwa jener der Referenzprobe. Bei 0,02 % Tween® 20 ist die gemessene Absorption etwas geringer als jene des Leerwertes. Die Inkubation mit 0,05 %iger Tween® 20 Lösung führt zu einer starken Abnahme der Zahl proliferierender Zellen, die nur mehr 38 % des Leerwertes beträgt. Nach 72-stündiger Inkubation ist ein ähnlicher Effekt wie nach 48 Stunden erkennbar, der jedoch stärker ausgeprägt ist. Der zytotoxische Effekt der 0,5 %igen Tween® 20 Lösung verursacht nach 72 Stunden eine Abnahme der DNA-Syntheserate der Zellen auf 14,7 % der Referenzprobe.

Die zwei- und dreitägige Inkubation mit 0,01 %iger Tween® 80 Lösung führt zu einer geringfügigen Erhöhung der Farbintensität im Vergleich zum Leerwert und hat somit positiven Einfluss auf die Caco-2 Zellproliferation. Bei Tensidzusatz von 0,02 % ist die Absorption nach 48 Stunden gleich bleibend, nach 72 Stunden hingegen nimmt sie etwas ab und erreicht 97% der Referenz. Bei der höchsten gemessenen Konzentration von 0,05 % sinkt die Anzahl proliferierender Zellen auf 87 % bei zweitägiger und auf 83 % bei dreitägiger Inkubation. Somit ist die Zytotoxizität von Tween® 80 Lösungen bei kurzer Inkubation wesentlich geringer als jene von Tween® 20 Lösungen. Eine Verlängerung der Expositionsdauer könnte jedoch eine vergleichbare Zytotoxizität ergeben.

Tabelle 11: Relative Proliferationsrate von Caco-2 Zellen nach 48- und 72 stündiger Inkubation mit Tween® 20 und Tween® 80 Lösungen (BrdU-Test)

Tensidkonzentration	Inkubation 48 Stunden (Absorption bei 450 nm)	Inkubation 72 Stunden (Absorption bei 450 nm)
Leerwert	0,3320 ± 0,028	0,7239 ± 0,030
<u>Tween® 20 0,01%</u>	0,3228 ± 0,016	0,7399 ± 0,005
<u>Tween® 20 0,02%</u>	0,3209 ± 0,030	0,6749 ± 0,021
<u>Tween® 20 0,05%</u>	0,1264 ± 0,014	0,1064 ± 0,036
<u>Tween® 80 0,01%</u>	0,3529 ± 0,001	0,7848 ± 0,017
<u>Tween® 80 0,02%</u>	0,3434 ± 0,033	0,7043 ± 0,023
<u>Tween® 80 0,05%</u>	0,2894 ± 0,042	0,6008 ± 0,036

Abbildung 16: Relative Proliferationsrate von Caco-2 Zellen nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit Tween® 20 und Tween® 80 Lösungen (BrdU-Test)
Helle Farben stellen die 48 Stunden, dunkle Farben die 72 Stunden-Werte dar.



Diese Messergebnisse machen deutlich, dass der Zusatz von 0,01 % Tween® 20 sowie von 0,01 % und 0,02 % Tween® 80 bei zwei- und dreitägiger Inkubation keinen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt. In Gegenwart von 0,02 %iger Tween® 20 Lösung und 0,05 %iger

Tween[®] 80 Lösung kommt es zu einer geringfügigen Reduktion der Zellzahl, die Inkubation mit 0,05 % Tween[®] 20 führt hingegen zu einer deutlichen Abnahme der Anzahl an proliferierenden Zellen. Möglicherweise kommt es bei hohen Tensidkonzentrationen zur Stabilisierung von Membranproteinen und dadurch zur Veränderung der Struktur der Zellmembran, die sekundär die Proliferationsrate der Zellen einschränkt [41].

Um festzustellen, ob die Tenside Tween[®] 20 und 80 in geringeren Konzentrationen die Zellproliferation möglicherweise positiv beeinflussen, werden Versuche mit Caco-2 DSMZ Zellen der Passagezahl 78 in Gegenwart von 0,001 % und 0,005 % Tween[®] durchgeführt. Um diese Tween[®] Konzentrationen zu erreichen werden 0,01- bzw. 0,05 %ige Tensidlösungen zugefügt.

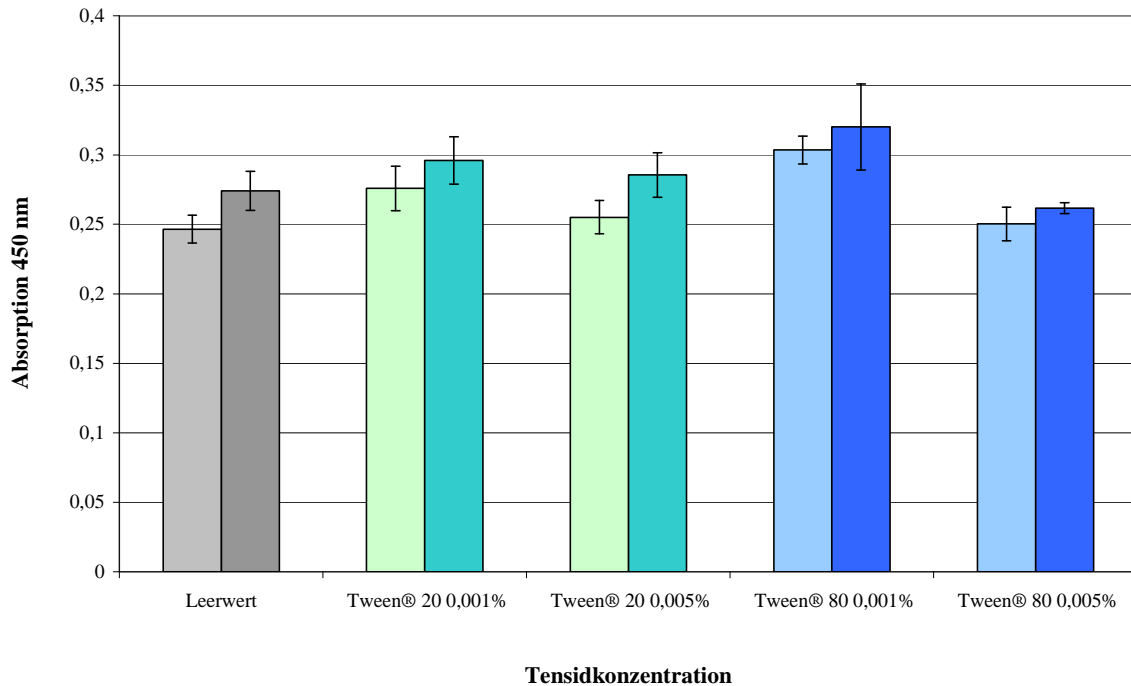
Ergebnisse

Wie die in Tabelle 12 und Abbildung 17 dargestellten Messwerte zeigen, üben geringste Tensidkonzentrationen von 0,001 % und 0,005 % Tween[®] 20 oder Tween[®] 80 keinen negativen Einfluss auf die Zellproliferation aus, sondern scheinen diese eher zu begünstigen. Bei 0,001 % Tensidzusatz ist die Farbintensität bei beiden Tween[®] Arten höher als bei der Referenzprobe. In Gegenwart von Tween[®] 20 und 48-stündiger Inkubation steigt die Zellproliferation um 12 %, nach 72 Stunden um 8 % im Vergleich zum Leerwert. Bei Tween[®] 80 ist der wachstumsfördernde Effekt noch ausgeprägter und resultiert in einer 23 %igen Steigerung nach 2 Tagen bzw. einer 16 %igen nach 3 Tagen. In Gegenwart von 0,05 % Tensid ist das Ausmaß der Farbintensität mit der Referenz zu vergleichen.

Tabelle 12: Relative Proliferationsrate von Caco-2 Zellen nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit Tween[®] 20 und Tween[®] 80 Lösungen (BrdU-Test)

Tensidkonzentration	Inkubation 48 Stunden (Absorption bei 450 nm)	Inkubation 72 Stunden (Absorption bei 450 nm)
Leerwert	0,2465 ± 0,010	0,2740 ± 0,014
<u>Tween[®] 20 0,001%</u>	0,2758 ± 0,016	0,2960 ± 0,017
<u>Tween[®] 20 0,005%</u>	0,2551 ± 0,012	0,2856 ± 0,016
<u>Tween[®] 80 0,001%</u>	0,3035 ± 0,010	0,3201 ± 0,031
<u>Tween[®] 80 0,005%</u>	0,2503 ± 0,012	0,2616 ± 0,004

Abbildung 17: Relative Proliferationsrate von Caco-2 Zellen nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit Tween® 20 und Tween® 80 Lösungen (BrdU-Test)
Helle Farben stellen die 48 Stunden, dunkle Farben die 72 Stunden-Werte dar



Insgesamt bewirkt eine zwei- und dreitägige Kultivierung von Caco-2 Zellen mit 0,001 %iger Tween® 20 oder Tween® 80 Lösung eine Steigerung der Proliferationsrate. Im Konzentrationsbereich von 0,005 % bis 0,02 % Tensid wird die Wachstumsfähigkeit der Zellen nicht beeinflusst. Eine weitere Steigerung des Zusatzes von 0,05 % Tween® 20 reduziert die Anzahl proliferierender Zellen. Wie die Interaktionsstudien (Kapitel 4.1.1. und 4.1.2.) und die Untersuchung der Zellviabilität (Kapitel 4.3.) zeigen auch die Ergebnisse des BrdU-Tests, dass die Zytotoxizität von Tween® 20 konzentrationsabhängig ist. Tween® 80 ist für Caco-2 Zellen besser verträglich; ab einer Konzentration von 0,05 % wird die Zellproliferation im Vergleich zum Leerwert nur geringfügig beeinträchtigt. Bis zu einer Konzentration von 0,02 % ist eine gute Verträglichkeit der Caco-2 Zellen mit Tween® 20 und Tween® 80 gegeben.

4.4.1.2. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen in Gegenwart von Pluronic® F-68 Lösungen

Da Pluronic® F-68 in allen eingesetzten Konzentrationen bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen die Zellviabilität am wenigsten beeinflusst hat, sollte in den folgenden Versuchen geklärt werden, ob die Proliferationsrate von Caco-2 Zellen durch Pluronic® F-68 Lösungen gesteigert werden kann.

Durchführung

Für den Versuch werden Caco-2 DSMZ Zellen der Passagezahl 78 eingesetzt. Diesen werden Pluronic® F-68 Lösungen in den Konzentrationen 2 %, 4 %, 6 %, 8 % und 10 % zugesetzt. Auf Grund der 1:10 Verdünnung mit der Zellsuspension in RPMI-Medium entspricht dies absoluten Tensidkonzentrationen von 0,2 % - 1,0 %.

Ergebnisse

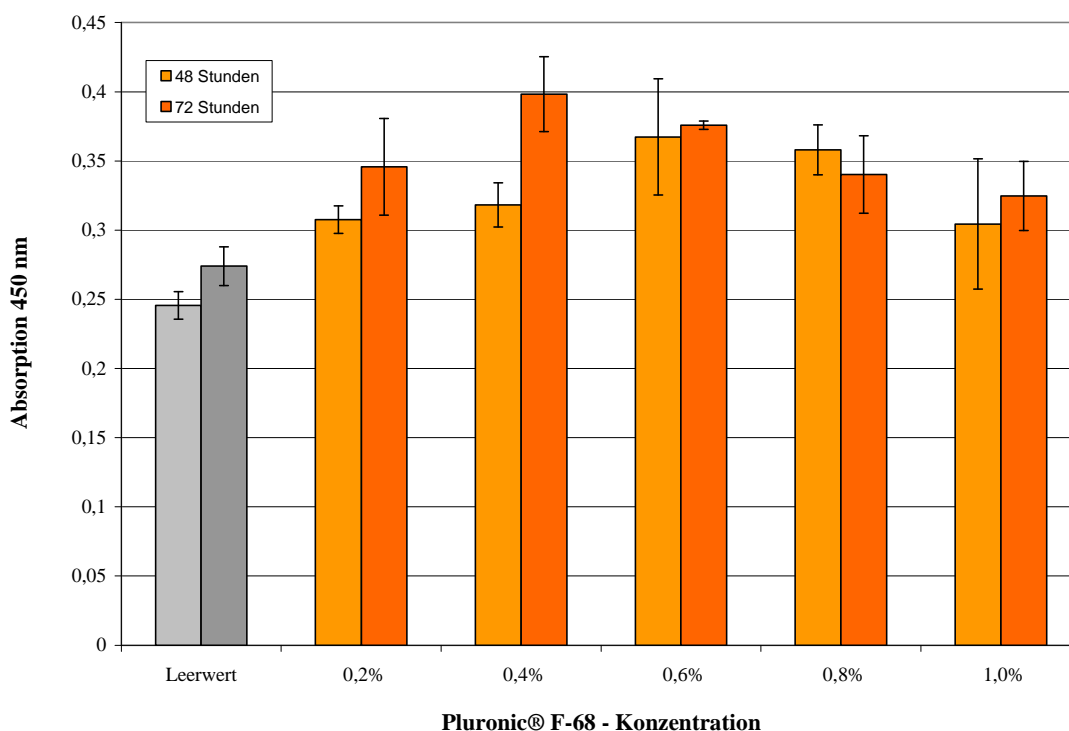
Wie aus Tabelle 13 und Abbildung 18 ersichtlich ist, bewirkt der Zusatz von Pluronic® F-68 im Konzentrationsbereich von 0,2 % - 1,0 % eine Erhöhung der Farbintensität des gebildeten Reaktionsproduktes und somit eine Steigerung der Proliferationsrate von Caco-2 DSMZ Zellen sowohl nach 48- als auch nach 72-stündiger Inkubation. Nach zweitägiger Zellkultivierung ist die gemessene Farbintensität in Gegenwart von 0,2 % Pluronic® F-68 um 25 % höher als jene der Referenzprobe, wobei mit zunehmender Tensidkonzentration auch die Anzahl an proliferierenden Zellen steigt. Diese erreicht bei 0,6 % und 0,8 % Pluronic® ihr Maximum mit der etwa 1,5-fachen Farbintensität des Leerwertes. Bei Zugabe von 1,0 % Tensid nimmt die Proliferationsrate der Caco-2 Zellen wieder geringfügig ab und entspricht etwa der Absorption in Gegenwart von 0,2 % Pluronic® F-68.

Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden ist der Effekt, den Pluronic® F-68 auf die Proliferation von Caco-2 Zellen ausübt, ähnlich wie nach 48 Stunden. Jedoch wird die höchste Absorption bereits bei einem Tensidzusatz von 0,4 % erreicht. Diese ist um 45 % höher als jene der Referenzprobe.

Tabelle 13: Relative Proliferationsrate von Caco-2 Zellen nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit Pluronic® F-68 Lösungen (BrdU-Test)

Pluronic® F-68 Konzentration	Inkubation 48 Stunden (Absorption bei 450 nm)	Inkubation 72 Stunden (Absorption bei 450 nm)
Leerwert	0,2456 ± 0,010	0,2740 ± 0,014
<u>0,20%</u>	0,3075 ± 0,010	0,3458 ± 0,035
<u>0,40%</u>	0,3182 ± 0,016	0,3983 ± 0,027
<u>0,60%</u>	0,3674 ± 0,042	0,3758 ± 0,003
<u>0,80%</u>	0,3581 ± 0,018	0,3402 ± 0,028
<u>1,00%</u>	0,3044 ± 0,047	0,3247 ± 0,025

Abbildung 18: Relative Proliferationsrate von Caco-2 Zellen nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit Pluronic® F-68 Lösungen (BrdU-Test)



Zusammenfassend resultiert aus diesem Versuch, dass sowohl nach zwei- als auch nach dreitägiger Kultivierung der Caco-2 Zellen in Gegenwart von Pluronic® F-68 Lösungen die Proliferation gesteigert wird. Der größte Effekt wird im Konzentrationsbereich von 0,4 % - 0,6 % erzielt. Dies bedeutet, dass nicht nur ein zytotoxischer Effekt von Pluronic® F-68 ausgeschlossen werden kann, sondern dass dieses Tensid sogar einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum ausübt.

4.4.2. Bestimmung der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen nach dem Auftauen in Gegenwart von Pluronic® F-68 Lösungen

Das für die Langzeitlagerung von Zellen notwendige einmalige Einfrieren und Auftauen bedeutet Stress für die Zellen und bedingt, dass diese nach dem Auftauen einige Passagen benötigen, um ihre übliche Wachstumsrate zu erreichen. Da in den vorangegangenen Versuchen ein wachstumsfördernder Effekt von Pluronic® auf Caco-2 Zellen gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 4.4.3 und 4.4.1.2.), sollte in der folgenden Versuchsreihe untersucht werden, ob die Erholung der Caco-2 Zellen durch Zusatz von Pluronic® F-68 schneller voranschreitet als ohne Tensidzusatz.

Durchführung

Caco-2 DSMZ Zellen der Passagezahl 33, die zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt sind, werden aufgetaut. Das Kryoröhrchen, welches die eingefrorene Zellsuspension enthält, wird im Wasserbad bei 37°C möglichst rasch aufgetaut. Danach wird die Zellsuspension in ein Steriline Röhrchen transferiert, das bereits 10 ml auf 37°C temperiertes RPMI-Medium enthält, und resuspendiert. Anschließend wird fünf Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wird das Pellet in 2 ml RPMI resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

In einer 96-well Mikrotiterplatte (Iwaki, Bertoni, Wien, Österreich) werden pro well 180 µl RPMI-Medium mit 17.000 Zellen und 20 µl der zu untersuchenden Pluronic® Lösungen für zwei und drei Tage inkubiert. Pluronic® F-68 wird in den Konzentrationen 2 %, 4 %, 6 %, 8 % und 10 % zugegeben, was aufgrund der 1:10 Verdünnung mit der Zellsuspension eine absolute Pluronic® Konzentrationen von 0,2 % bis 1,0 % ergibt.

Der BrdU-Test wird nach einer Inkubationsdauer von 48 und 72 Stunden durchgeführt.

Ergebnisse

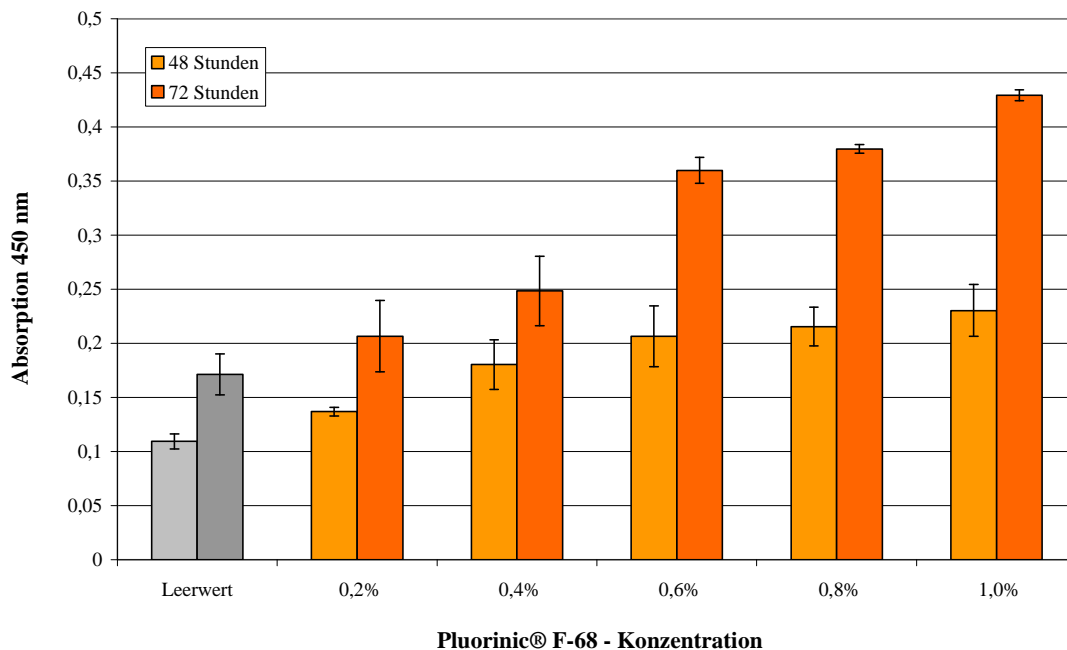
In Tabelle 14 und Abbildung 19 sind die gemessenen Absorptionswerte dargestellt. Sowohl nach zwei- als auch nach dreitägiger Inkubation ist die Proliferationsrate der Caco-2 Zellen mit Pluronic® Lösungen höher als ohne Tensidzusatz. Bereits der Zusatz von 0,2 % Pluronic® erhöht die Proliferationsrate um 20 - 25 % und nimmt mit steigender Tensidkonzentration weiter zu. Nach 48-stündiger Inkubation in Gegenwart von 1,0 % Pluronic® F-68 ist die Proliferationsrate um 110 % höher als jene der Referenzprobe. Bei 72-stündiger

Inkubationszeit ist der Unterschied zum Leerwert noch deutlicher und erreicht bei Zusatz von 1,0 % Pluronic® F-68 die 2,5-fache Zellzahl der Referenzprobe.

Tabelle 14: relative Proliferationsrate von frisch aufgetauten Caco-2 Zellen nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit Pluronic® F-68 Lösungen (BrdU-Test)

Pluronic® F-68 Konzentration	Inkubation 48 Stunden (Absorption bei 450 nm)	Inkubation 72 Stunden (Absorption bei 450 nm)
Leerwert	0,1092 ± 0,007	0,1712 ± 0,019
<u>0,20%</u>	0,1368 ± 0,004	0,2065 ± 0,033
<u>0,40%</u>	0,1803 ± 0,023	0,2484 ± 0,032
<u>0,60%</u>	0,2065 ± 0,028	0,3592 ± 0,012
<u>0,80%</u>	0,2154 ± 0,018	0,3797 ± 0,004
<u>1,00%</u>	0,2303 ± 0,024	0,4292 ± 0,005

Abbildung 19: relative Proliferationsrate von frisch aufgetauten Caco-2 Zellen nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit Pluronic® F-68 Lösungen (BrdU-Test)



Die Erhöhung der Zellproliferation durch Pluronic® F-68 ist bei frisch aufgetauten Zellen deutlicher ausgeprägt als bei Zellen, die durch mehrmaliges Passagieren bereits equilibriert

sind. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der zytoprotektiven Eigenschaft von Pluronic[®] liegen, die zu einer beschleunigten Stabilisierung von durch das Auftauen etwas in Mitleidenschaft gezogenen Zellen führt. Der zytoprotektive Effekt von Pluronic[®] F-68 wurde in diversen Studien nachgewiesen. So schützt Pluronic[®] Zellen vor mechanisch und chemisch bedingtem Stress und verlängert deren Überleben bei Nährstoffmangel, hohen Ionenkonzentrationen oder Hyperthermie [19]. Weiters wird das Tensid eingesetzt, um Zellen vor Scherkräften zu schützen, die beispielsweise in Suspensionskulturen in großen Bioreaktoren auftreten [20, 21]. Zellen welche nach der Subkultivierung angesetzt werden, sind in ihrer Funktion kaum beeinträchtigt, sodass sich der zytotoxischer Effekt von Pluronic[®] F-68 nicht so deutlich auswirkt wie bei jenen Zellen, die nach dem Auftauen mit dem Tensid kultiviert wurden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Oft wird die Verarbeitung von Arzneistoffen zu oralen Formulierungen durch mehrere Faktoren erschwert: zu geringe Löslichkeit, vorzeitige Inaktivierung, zu geringe Resorbierbarkeit und damit ungenügende Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes erfordern für den Patienten unangenehme und teurere Applikationsstrategien. Dennoch könnte ein derartiger „Problem-Wirkstoff“ für eine orale Verabreichung dadurch verfügbar gemacht werden, dass er in ein kolloidales Trägersystem inkorporiert wird. Zur Löslichkeitsverbesserung und Stabilitätssteigerung von Arzneimitteln werden Tenside eingesetzt. Diese sind aber nicht nur für die Herstellung und Lagerung vieler Arzneimittel von Bedeutung; einige von ihnen können, beispielsweise durch Blockierung von P-Glykoproteinen, zu Erhöhung der Resorption und damit zu einer längeren Verweildauer des Wirkstoffes in der Zelle beitragen, wodurch eine höhere Effizienz des Arzneistoffes erreicht wird. Dies gilt vor allem für die weniger toxischen nichtionogenen Tenside [1, 2, 3, 25].

Aber auch bei der Herstellung von Nanopartikeln, nicht nur nach der (W/O)/W-Doppelemulsionstechnik, werden Tensidlösungen in großer Menge zugesetzt. Hierfür wird unter anderem Pluronic® F-68 verwendet, welches im Endprodukt zu etwa 1,6 % verbleibt [4]. Somit besteht die Möglichkeit, dass diese verbleibende Tensidmenge einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Nanopartikeln und Zellen ausübt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die nichtionischen Tenside Tween® 20, Tween® 80 und Pluronic® F-68 auf die Interaktion von Nanopartikeln mit Caco-2 DSMZ Einzelzellen ausüben. Weiters wurden diese Tenside hinsichtlich ihres zytotoxischen Effekts bzw. ihrer Auswirkung auf die Zellviabilität und Zellproliferation untersucht. Zur Simulation des humanen Dünndarmepithels diente das Caco-2 Zellmodell welches in der pharmazeutischen Forschung und Industrie als *ex-vivo in-vitro* Testsystem anerkannt ist.

Die Interaktionsstudien zeigten, dass bereits nach einstündiger Inkubation in Gegenwart von Tensiden deutlich unterschiedliche Assoziationsbeziehungen zwischen Nanopartikeln und Dünndarmzellen vorherrschen, als ohne Tensidzusatz. Da Tenside die Eigenschaft besitzen, sich in die Zellmembran einzulagern und dadurch zu modifizieren, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Tenside zu einer Änderung der Oberflächenbeschaffenheit der Zelle führen und diese somit für die Bindung der Nanopartikel attraktiver machen.

Im Vergleich zu Tensid-freien Medien bewirkt ein Gehalt von 0,05 %iger Tween[®] 20, Tween[®] 80 oder 2,5 %iger Pluronic[®] F-68 eine maximale Steigerung der Assoziation von Nanopartikeln mit Caco-2 Zellen. Ab 0,0025 % kommt es in Gegenwart beider Tween[®] Arten zu einer gesteigerten Nanopartikelbindung an die Zelloberfläche, wobei das Maximum bei 0,05 % mit der 2,8 - 3,5-fachen Intensität der Referenz erreicht wird. In höheren Konzentrationsbereichen wird der positive Effekt auf die Nanopartikel-Zell Interaktion wieder geringer. Ab einem Tensidgehalt von > 0,5 % kehrt sich der Effekt sogar um und resultiert in einer Abnahme der Nanopartikelbindung an die Zelle. Zusätzlich bewirkt ein Tween[®] 20 Gehalt > 0,25 % eine deutliche Reduktion des Anteils an viablen Zellen. Bei Tween[®] 80 hingegen konnte nach einstündiger Inkubation im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,00025 - 2,5 % kein nachteiliger Effekt auf die Zellviabilität festgestellt werden.

Pluronic[®] F-68 ist ebenfalls im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,005 - 2,5 % für Caco-2 Zellen gut verträglich. Die Versuche haben gezeigt, dass die Interaktion von Nanopartikeln mit Dünndarmzellen bei Pluronic[®] F-68 Zugabe bis 0,25 % nicht beeinflusst wird. Steigende Konzentrationen im Bereich von 0,5 - 2,5 % Pluronic[®] F-68 erhöhen die Nanopartikelassoziation mit der Zelle um das bis zu 2,3-fache der Referenzprobe.

Obwohl bereits durch die Versuchsanordnung bei der Ermittlung der Nanopartikel-Zell Interaktion nur viable Zellen erfasst wurden, sollte mit Hilfe weiterer Tests (EZ4U und Cell Proliferation ELISA) untersucht werden, ob eine mögliche Einschränkung der Viabilität und Proliferation der Zellen durch die Tenside erfolgt bzw. ob die eingesetzten Detergentien möglicherweise einen positiven Effekt auf die Viabilität und Proliferationsrate von Caco-2 Zellen ausüben können.

Im Rahmen der Versuche konnte festgestellt werden, dass Tween[®] 20 bis zu einem Gehalt von 0,05 % die Viabilität von Caco-2 Zellen geringfügig erhöht, ab einer Konzentration von 0,1 % nimmt sie jedoch ab. Während Tween[®] 20 in Konzentrationsbereichen bis 0,02 % keinen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt, wirkt ein Gehalt von 0,05 % Tensid jedoch zellschädigend, was sich in einer Reduktion der Zahl proliferierender Zellen äußert.

Im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,001 - 0,05 % beeinflusst Tween[®] 80 die Proliferation der Caco-2 Zellen kaum. Die Zellviabilität wird in Gegenwart von Tween[®] 80 bis 0,05 % positiv beeinflusst, während in höheren Konzentrationen (0,1 %) kein Einfluss feststellbar ist.

Im Gegensatz dazu bewirkt die Zugabe von Pluronic® F-68 (0,2 - 1,0 %) sowohl eine Steigerung der Viabilität als auch der Proliferationsrate von Caco-2 Zellen. Besonders deutlich zeigte sich der proliferationsfördernde Effekt bei Zellen, die nach dem Auftauen in 0,2 - 1,0 % Pluronic® F-68-hältigem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Die Zellproliferation stieg dabei um das bis zu 2,5-fache im Vergleich zu jenen Zellen, die in Tensidfreiem Medium kultiviert wurden.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse der in dieser Diplomarbeit durchgeführten Studien folgendes: Sind in einer Nanopartikel-Suspension entsprechende Tenside vorhanden, so beeinflussen diese die Zelleigenschaften und damit auch die Nanopartikelassoziation mit der Zelle. Somit sollte in Studien über die Interaktion von Nanopartikeln mit Zellen ein äußerst wahrscheinlicher, durch Tenside hervorgerufener Effekt auf die Assoziationsrate und Viabilität bzw. Proliferationsrate berücksichtigt werden. Zusätzlich stellt die Steigerung der Nanopartikelassoziation an die Zellen in Gegenwart der Tenside Tween® 20, Tween® 80 und Pluronic® F-68 einen interessanten Ausgangspunkt dar, um möglicherweise die Resorptionsrate von Nanopartikeln zu erhöhen.

Somit könnte - aufgrund der im Zuge der Versuche ermittelten Ergebnisse - die Präsenz von nichttoxischen Tensiden in Nanopartikeln bei peroraler Gabe einen Ansatzpunkt darstellen, die Resorptionsrate von „Problem-Arzneistoffen“ in Form von Nanopartikeln zu steigern und damit deren Wirksamkeit zu erhöhen.

6. ANHANG

6.1. Literaturverzeichnis

- [1] Win, K.Y., Feng, S.S., 2005. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials* 26, 2713-2722

- [2] Lo, Y.L., 2003. Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines, *Journal of Controlled Release* 90, 37-48

- [3] Rege, B.D., Kao, J.P.Y., Polli, J.E., 2002. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 16, 237-246

- [4] Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Alakhov, V.Y., 2002. Pluronic[®] block copolymers for overcoming drug resistance in cancer, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 759-779

- [5] <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2381>

- [6] Minko, T., Batrakova, E.V., Li, S., Li, Y., Pakunlu, R.I., Alakhov, V.Y., Kabanov, A.V., 2005. Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug-resistant cancer cells, *Journal of Controlled Release* 105, 269-278

- [7] Fillafer, C., Wirth, M., Gabor, F., 2007. Stabilizer-Induced Viscosity Alteration Biases Nanoparticle Sizing via Dynamic Light Scattering, *Langmuir* 23, 8699-8702

- [8] <http://schwalbe.org.chemie.uni-frankfurt.de/oc/oc2b/schnorr-nanorohr.pdf>

- [9] <http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/volltexte/2007/7451/pdf/wolflicht.pdf>

- [10] http://www.pharmasolutions.basf.de/pdf/Statements/Technical%20Informations/Pharma%20Soltiones/EMP%20030737e_Lutrol%20F%2068.pdf

- [11] http://www.basf.com/performancechemical/pdfs/Pluronic_F68.pdf
- [12] Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch, 2004. 9.Auflage, Verlag Walter de Gruyter
- [13] <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/p5927pis.pdf>
- [14] <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v05je47.htm>
- [15] <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/P5188pis.pdf>
- [16] Adams-Graves, P., Kedar, A., Koshy, M., Steinberg, M., Veith, R., Ward, D., Crawford, R., Edwards, S., Bustrack, J., Emanuele, M., 1997. RheothRx (Ploxamer 188) Injection for the Acute Painful Episode of Sickle Cell Disease: A Pilot Study, *Blood*, Vol.90, No. 5, 2041-2046
- [17] Schaer, G.L., Spaccavento, L.J., Browne, K.F., Kruger, K.A., Krichbaum, D., Phelan, J.M., Fletcher, W.O., Grines, C.L., Edwards, S., Jolly, M.K., Gibbons, R.J., 1996. Beneficial Effects of RheothRx Injection in Patients Receiving Thrombolytic Therapy for Acute Myocardial Infarction, *Circulation* 94, 298-307
- [18] Yaroslavov, A.A., Melik-Nubarov, N.S., Menger, F.M., 2006. Polymer-Induced Flip-Flop in Biomembranes, *Accounts of Chemical Research* 39, 702-710
- [19] Hellung-Larsen, P., Assaad, F., Pankratova, S., Saitz, B.L., Skovgaard, L.T., 2000. Effects of Pluronic F-68 on *Tetrahymena* cells: protection against chemical and physical stress and prolongation of survival under toxic conditions, *Journal of Biotechnology* 76, 185-195
- [20] Xu, D., Wu, T., Wu, X., Zhang, Y., Chen, Y., 1995. Studies of protective properties of pluronic and other agents on the hybridoma cell culture, *Chinese Journal of Biotechnology* 11, 101-7
- [21] Gigout, A., Buschmann, M.D., Jolicoeur, M., 2008. The Fate of Pluronic F-68 in Chondrocytes and CHO Cells, *Biotechnology and Bioengineering* 100 (5), 975-987

- [22] Emanuele, R.M., 1998. FLOCOR: a new anti-adhesive, rheologic agent, Expert Opinion on Investigational Drugs 7 (7), 1193-200 (Wiley InterScience DOI 10.1002/bit. 21840)
- [23] Modi, N.B., 1999. Flocor (CytRx Corp), Drugs 366-74
- [24] Lee, R.C., Hannig, J., Matthews, K.L., Myerov, A., Chen, C.T., 1999. Pharmaceutical Therapies for Sealing of Permeabilized Cell Membranes in Electrical Injuries, Annals of the New York Academy of Science 888, 266-73
- [25] Batrakova, E.V., Li, S., Alakhov, V.Y., Elmquist, W.F., Miller, D.W., Kabanov, A.V., 2003. Sensitization of Cells Overexpressing Multidrug-Resistant Proteins by Pluronic P85, Pharmaceutical Research 20(10), 1581-90
- [26] Danson, S., Ferry, D., Alakhov, V, Margison, J., Kerr, D., Jowle, D., Brampton M., Halbert, G., Ranson, M., 2004. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer, British Journal of Cancer 90, 2085-2091
- [27] Kerleta, V., 2005. Flowcytometrische Untersuchungen zur Interaktion von Lektin-funktionalisierten Nanopartikeln, Diplomarbeit, Universität Wien
- [28] Fogh, J., Fogh, J.M, Orfeo, T.M., 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice, Journal of the National Cancer Institute 59 (1), 221-6
- [29] <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>
- [30] Bohninger, B., 2005. Entwicklung und Vergleich von Analysenmethoden zur Charakterisierung von DNA-Polyethylen-Komplexen, Diplomarbeit, Universität Wien
- [31] https://extranet.fisher.co.uk/webfiles/de/documents/fs07_0373_DE.pdf
- [32] <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3959%20Tryple%20select.pdf>

- [33] <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/d8418pis.pdf>
- [34] http://darwin.bth.rwth-aachen.de/opus3/volltexte/2007/1961/pdf/Neyzen_Svenja.pdf
- [35] <http://www.polysciences.com/SiteData/poly/Assets/DataSheets/238.pdf>
- [36] <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>
- [37] <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01304.pdf>
- [38] http://www.bmgrp.com/fileadmin/countries/bmgrp.com/pdfs/BI-5000_EZ4U_PI.pdf
- [39] <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/11647229001a.pdf>
- [40] <http://www.dent.med.uni-muenchen.de/exponent-0.96.4/index.php?section=73>
- [41] Oberle, R.L., Moore, T.J., Krummel, D.A., 1995. Evaluation of Mucosal Damage of Surfactants in Rat Jejunum and Colon, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 33, 75-81

6.2. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Isabella Andrlík
Geburtsdatum: 9. November 1983
Geburtsort: Wien, Österreich

Ausbildung:

1990-1994 Volksschule
4., Schäfergasse 3

1994-2002 Realgymnasium
BRG IV, Waltergasse 7

Juni 2002 Matura

Oktober 2002 Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien

Oktober 2003 -
Juni 2006 Studium der Instrumental- und Gesangspädagogik (IGP) Klavier
an der Universität für Musik und darstellende Kunst Wien

März -
Oktober 2008 Diplomarbeit an der Universität Wien
am Department für pharmazeutische Technologie
und Biopharmazie

Sommersemester und
Wintersemester 2008: Tutorin im Praktikum Industrielle Arzneimittelherstellung
am Department für pharmazeutische Technologie
und Biopharmazie