

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**Impact of the growth support on the transcellular
transport of nanoparticles**

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag. pharm.)

Verfasserin/Verfasser:	Dietmar Emanuel Pixner
Matrikel-Nummer:	0205696
Studienrichtung/Studienzweig (lt. Studienblatt):	A 449 Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao.Univ.Prof.Mag.Dr. Michael WIRTH

Wien, im September 2010

Nur wer sein **Ziel** deutlich sieht, kann den Weg bestimmen, der ihn dorthin führt.
(Wolfgang Zielke)

Beharrlichkeit ist ein Hauptelement des **Erfolgs**. Wer lange genug an die Pforten schlägt, wird jemanden zu wecken vermögen.
(Henry Wadsworth Longfellow)

Alles was des Seins würdig ist, ist auch des **Wissens** würdig.
(Francis Bacon)

Die meisten Menschen haben Angst vor dem Tod, weil sie nicht genug aus ihrem Leben machen.
(Peter Ustinov)

Diese Diplomarbeit ist meinem Vater, Dietmar Pixner sen. gewidmet, dem es leider nicht vergönnt war, meinen studentischen Lebensweg mit mir gemeinsam zu beschreiten. Nichts desto trotz war die gemeinsame Zeit ausreichend mir Tugenden wie Zielstrebigkeit und Beharrlichkeit vorzuleben, die mich schon Ziele erreichen ließen und mich hoffentlich auch in Zukunft weiterhin meinen Zielen näherbringen. Dafür möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Weiterer Dank gilt vor allem Ao.Univ.Prof.Mag.pharm.Dr. Michael Wirth für die rasche Korrektur meiner Arbeit, die überaus kompetente Betreuung meines Themas und des angenehmen gegenseitigen Arbeitsklimas.

Ao.Univ.Prof.Mag.pharm.Dr. Franz Gabor für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung eines spannenden Themas für meine Diplomarbeit.

Mag.pharm.Dr. Christian Fillafer für die gute Betreuung und Mithilfe während der praktischen Arbeit an der Diplomarbeit.

Ao.Univ.Prof.Mag.pharm.Dr. Liselotte Krenn für die Bereitstellung der Ultra-Zentrifuge ohne die ein Teil der Versuche nicht durchführbar gewesen wären.

Und zu guter Letzt meiner Mutter, Brigitte Pixner, die mich während meiner gesamten Studienzeit nach Kräften unterstützt hat, und auch abseits der Uni jederzeit für mich mit Rat und Tat zur Seite stand.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
PROBLEMSTELLUNG	2
ERGEBNISSE	6
DISKUSSION	11
LITERATURVERZEICHNIS	16
Anhang A: Manuskript „Impact of the growth support on the transcellular transport of nanoparticles“	
ABSTRACT	17
1. INTRODUCTION	18
2. MATERIALS AND METHODS	20
3. RESULTS	24
4. DISCUSSION	31
5. CONCLUSION	36
6. REFERENCES	38
Anhang B: Weitere Experimente zu Partikelstabilität und Partikeltransport	40
LEBENS LAUF	49

PROBLEMSTELLUNG

Eine der grundlegenden Herausforderungen in der Pharmazeutischen Technologie besteht in der Entwicklung von Formulierungen für biotechnologisch hergestellte Arzneistoffe. Zu dieser Klasse von Wirkstoffen zählen Proteine, Peptide, Desoxyribonukleinsäuren (DNS) und Ribonukleinsäuren (RNS). Diese Makromoleküle zeichnen sich zwar durch eine hohe Wirksamkeit aus, ihre zumeist unzureichende Stabilität nach parenteraler oder peroraler Applikation stellt jedoch einen gravierenden Nachteil dar. Zu den die Stabilität und Resorption beeinträchtigenden Faktoren im Gastrointestinaltrakt zählen die Denaturierung aufgrund des sauren pH-Werts im Magen, die Degradation durch enzymatische Spaltung, sowie der zumeist stark limitierte transepitheliale Transport von hydrophilen Makromolekülen. Mit Hilfe neuartiger Formulierungen könnten diese Nachteile teilweise umgangen und dadurch die Bioverfügbarkeit von diesbezüglich problematischen Arzneistoffen erhöht werden. Dabei sind aus pharmazeutischer Sicht Formulierungen für die perorale Applikation erstrebenswert, da sie aufgrund der für den Patienten vergleichsweise einfachen Handhabung eine hohe Compliance zur Folge haben. Die Inkorporation therapeutischer Makromoleküle in bioabbaubare und biokompatible Nano- oder Mikropartikel stellt hier einen vielversprechenden Ansatz zur biopharmazeutischen Optimierung von peroralen Formulierungen dar.

Eine Grundvoraussetzung für die Internalisation von Nanopartikeln ist deren Bindung an die apikale Plasmamembran von Zellen des gastrointestinalen Epithels. Sollten die Teilchen danach auch in die Zellen aufgenommen werden, könnte ein Teil dieser Partikel zur basolateralen Zellmembran transportiert und dort exocytiert werden. Die primäre Interaktion wirkstoffbeladener Teilchen mit Zellen könnte dabei durch Modifikation der Partikeloberfläche mit bioadhäsiven Molekülen noch weiter erhöht werden, wodurch sich eine verlängerte Verweildauer ergäbe. Um die Wechselwirkung

kolloidalen Wirkstoffträgersysteme mit epitheliale Gewebe grundsätzlich zu untersuchen, können zellkulturbasierte *in vitro* Testsysteme verwendet werden. Aus biopharmazeutischer Sicht kommt dabei Resorptionsmodellen eine herausragende Bedeutung zu. Diese werden eingesetzt, um nicht nur die Bindung von Teilchen an das Gewebe sondern auch das Ausmaß des Transports über den Zelllayer hinweg zu untersuchen. Für eine Simulation der intestinalen Epithelbarrier haben sich Caco-2 Zellmonolayer aufgrund ihrer strukturellen und funktionalen Ähnlichkeit mit dem humanen Dünndarmepithel bewährt (Hidalgo et al., 1989). Diese Zellen könnten demnach auch für Transportstudien mit Nanopartikeln in Resorptionsmodellen verwendet werden. Ein derartiges System besteht aus einem apikalen und einem basolateralen Kompartiment, die durch eine Filtermembran voneinander getrennt sind (Abbildung 1). Die Filtermembran dient hierbei als Wachstumsunterlage für die Kultivierung des Zelllayers. Damit auch mehrere Versuche gleichzeitig durchgeführt werden können, sind solche Transportsysteme kommerziell im Mikrotiterplattenformat erhältlich (Abbildung 2).

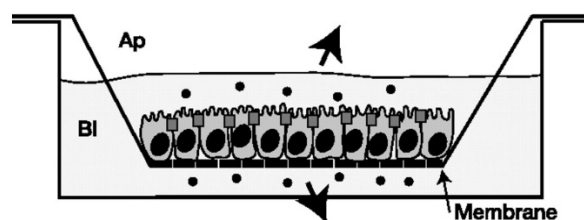


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines zellbasierten Resorptionsmodells.

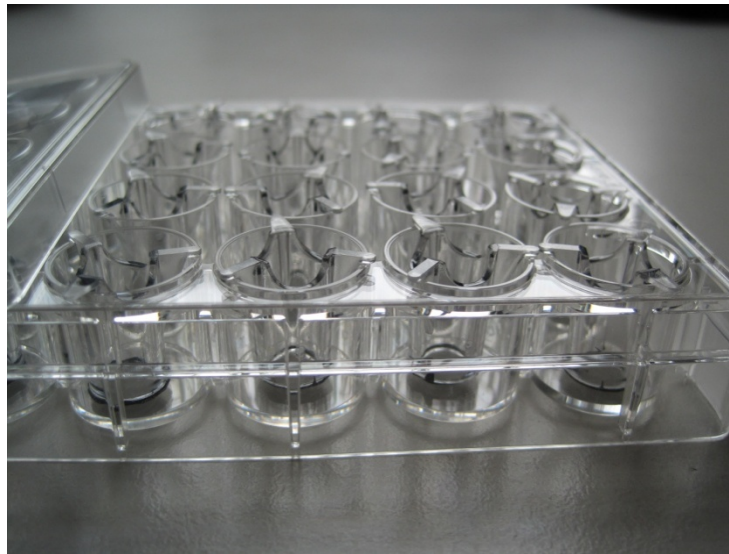


Abbildung 2: Mikrotiterplatte mit Filtereinsätzen

Um variablen Versuchsanforderungen gerecht zu werden, sind verschiedene Filtermembranen in diese Systeme integriert. Die Membranen unterscheiden sich dabei in ihrem Grundmaterial, ihrer Dicke, Porenweite und auch Porendichte. Für Transportversuche mit Wirkstoffmolekülen und Nanopartikeln werden hauptsächlich Membranen mit Porendurchmessern $\leq 3 \mu\text{m}$ verwendet.

In diesen Transportmodellen soll die Permeation eines Analyten durch einen Zelllayer charakterisiert werden. Allerdings könnte die integrierte Filtermembran eine zusätzliche Diffusionsbarriere darstellen und somit die gemessene Transportrate beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit soll daher der Einfluss der Filtermembraneigenschaften auf die Permeabilität von nanopartikulären Wirkstoffträgern in einem intestinalen Resorptionsmodell untersucht werden. Dazu werden die Transportraten von fluoreszenzmarkierten Polystyrolnanopartikeln mit einer Größe von 200 nm (bzw. 100 nm; siehe Anhang B) über Caco-2 Monolayer hinweg bestimmt. Die Zelllayer werden dabei auf Filtermembranen mit unterschiedlicher Porenweite (0.4 μm , 1 μm , 3 μm) und unterschiedlicher Porendichte kultiviert. Darüber hinaus sollen

Edelstahlgitter mit 25 μm Maschenweite hinsichtlich ihrer Eignung als poröse Wachstumsfläche für Zellen näher untersucht werden. Schließlich werden mögliche Vorteile dieses Gitters diskutiert und die Ergebnisse mit denen der kommerziell erhältlichen Filtermembranen verglichen.



Abbildung 3: Mikrotiterplatteneinsätze mit Filtermembran (rechts) oder aufgeklebtem Edelstahlgitter (links)

ERGEBNISSE

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte zur Publikation

„Impact of the growth support on the transcellular transport of nanoparticles”

von C. Fillafer, D. Pixner, M. Wirth, F. Gabor

(siehe Anhang A) maßgeblich beigetragen werden.

Wie aus der Literatur bekannt, ist die Transportrate von Nanopartikeln durch Zelllayer stark von der Größe der Teilchen abhängig (Behrens et al., 2002), wobei sie mit zunehmender Teilchengröße abnimmt (Florence et al., 2001). Um sicherzustellen, dass die eingesetzten Polystyrolpartikel unter den Versuchsbedingungen nicht aggregieren und dadurch eine breite Größenverteilung resultiert, wurde die Stabilität der Nanopartikel vorab in unterschiedlichen Medien untersucht. Als mögliche Transportmedien wurden Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS) und RPMI-1640 Zellkulturmedium + 1 % Poloxamer 188 eingesetzt; destilliertes Wasser diente als Referenz. Suspensionen von Polystyrolnanopartikeln in diesen Medien wurden unter konstanter Bewegung 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Nach 0, 2, 4, 6, 9 und 24 Stunden wurden Proben entnommen und mit dynamischer Lichtstreuung hinsichtlich der mittleren Partikelgröße und des Polydispersitätsindex (Pdl) analysiert. Wie in Tabelle 1 (Anhang A) gezeigt, konnte in destilliertem Wasser keine Veränderung der Partikelgröße sowie des Pdl detektiert werden. Aufgrund des niedrigen Pdl von <0.050 kann also von einer Suspension mit monodisperser Größenverteilung bei einem mittleren Partikeldurchmesser von 204 nm ausgegangen werden. Darüber hinaus sind die eingesetzten Nanopartikel in RPMI-1640 Zellkulturmedium + 1 % Poloxamer 188 über 24 h bei 37°C stabil. Die Zunahme der Partikelgröße um etwa 85 nm im Vergleich

zu der in Wasser ist vermutlich nicht auf Aggregation zurückzuführen, wie der konstant niedrige Pdl von < 0.040 andeutet. Eher ist davon auszugehen, dass die erhöhte Viskosität der 1 %-igen Lösung von Poloxamer 188 in proteinhaltigem Zellkulturmedium die Partikelgrößenmessung mittels dynamischer Lichtstreuung beeinflusst. Diese Messmethode ist bekanntermaßen empfindlich auf Viskositätserhöhungen, welche sich direkt in einer Verschiebung der gemessenen Partikelgröße zu höheren Werten niederschlagen (Fillafer et al., 2007). Bei Suspensionen der Nanopartikel in HBSS konnte hingegen bereits nach 2 h sowohl optisch als auch über Partikelgrößenmessung Aggregation festgestellt werden, weshalb HBSS als Transportmedium nicht geeignet erschien. Für alle weiteren Experimente wurde daher RPMI-1640 + 1 % Poloxamer 188 eingesetzt.

Da die Bindung der Partikel an die apikale Zellmembran eine Grundvoraussetzung für den Transport über den Zelloberflächen hinweg darstellt, wurden mit 200 nm Fluoresbrite™ Polystyrolnanopartikeln Bindungsstudien an Caco-2 Monolayern in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Anzahl der zellgebundenen fluoreszenzmarkierten Partikel wurde nach 0,5, 2, 4, und 6 h indirekt über Fluorimetrie (Ex/Em: 440/480) ermittelt. Wie in Abbildung 3 (Anhang A) ersichtlich, wurde dabei eine über die Zeit deutlich zunehmende Partikelbindung mit einem Maximum von 3.0×10^5 Teilchen nach 6 h detektiert.

Um die grundsätzliche Eignung von Edelstahlgewebe als poröse Wachstumsfläche für Zelloberflächen zu untersuchen, wurde die Filtermembran von kommerziell erhältlichen Transporeinsätzen entfernt und durch das Metallgitter ersetzt. 120 µl einer Caco-2 Einzelzellsuspension (1.25×10^4 Zellen pro Einsatz) wurden in den Korbchen ausgesät und 14 Tage lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Struktur des ausgebildeten Zelloberflächen mikroskopisch analysiert. Dazu wurden die Zellkerne mit Propidiumjodid und das tight junction-assoziierte Protein ZO-1 mit einer Antikörperfärbung fluoreszenzmarkiert. Die mikroskopische Auswertung dieser

Präparate (Abbildung 2, Anhang A) deutet sowohl auf eine dichte Belegung des Gitters mit Zellen als auch auf die Ausbildung eines Netzwerks von Interzellulärverbindungen hin. Zusätzlich wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) der Caco-2 Zelllayer mit einem EVOMX Voltmeter bestimmt. Während Körbchen mit Gitter ohne Zellen einen TEER von $75 \Omega \text{ cm}^2$ aufwies, konnte für Einsätze mit Caco-2 Zelllayer ein Widerstand von $477 \Omega \text{ cm}^2$ detektiert werden. Diese Werte sind durchaus vergleichbar mit Messungen von Filtermembranen. Hierbei wurden Widerstände von $64 \Omega \text{ cm}^2$ für die Membran allein und $533 \Omega \text{ cm}^2$ für Membranen mit Zelllayer gemessen. Demnach kann sowohl auf Gittern als auch auf Filtermembranen ein konfluenter Zellrasen kultiviert werden, bei dem aufgrund des hohen TEERs der parazelluläre Transport von Partikeln auf ein Minimum reduziert sein sollte. Für die nachfolgenden Transportstudien mit den Nanopartikeln wurden Zelllayer eingesetzt, die zuvor auf unterschiedlichen Filtermembranen (0.4 μm transparent (TP), 0.4 μm translucent (TL), 1 μm TP, 3 μm TP und 3 μm TL) 21 Tage lang bzw. auf Metallgittern 14 Tage lang kultiviert worden waren. Am Beginn des Transportexperiments wurden 120 μl einer Nanopartikelsuspension mit 3.2×10^{11} Partikeln pro ml ins apikale Kompartiment überführt. Anschließend wurde die Transportrate der Partikel indirekt anhand des Anstiegs der Fluoreszenzintensität im basolateralen Medium nach 2, 4, 6, 9, 12 und 24 h bestimmt. Dazu wurden je 2 x 100 μl Aliquote pro well aus dem basolateralen Kompartiment entnommen, fluorimetrisch analysiert (Ex/Em: 440/480) und anschließend wieder in das entsprechende well rückgeführt. Im Verlauf der Transportstudien erfolgte eine leichte Abnahme des TEERs auf $438 \Omega \text{ cm}^2$ bei den Zellmonolayern auf Gittern und $462 \Omega \text{ cm}^2$ auf Filtermembranen. Jedoch kann auch bei diesen Widerstandswerten noch von einer intakten Zellschicht ausgegangen werden. Wie die berechneten Nanopartikelzahlen in Abbildung 4 und Abbildung 5 (Anhang A) veranschaulichen, wurde bei allen Filtern und dem Metallgitter ein Anstieg der Fluoreszenzintensität im basolateralen Kompartiment detektiert. Das deutet auf eine

Akkumulation von transzellulär transportierten Nanopartikeln mit fortschreitender Inkubationsdauer hin. Die Transportrate war abhängig vom Porendurchmesser und nahm in der Reihenfolge $0.4\ \mu\text{m} < 1\ \mu\text{m} < 3\ \mu\text{m}$ zu. Darüber hinaus konnte innerhalb einer Porengrößenklasse eine Abhängigkeit der Transportrate von der Porendichte festgestellt werden. Generell sind translucente (TL-) Filter durch eine größere freie Filterfläche und dadurch höhere Permeabilität gekennzeichnet. Verglichen mit den Filtermembranen konnte für Zelllayer auf Metallgittern eine deutlich erhöhte Partikeltransportrate berechnet werden (Abbildung 5). Während bei $3\ \mu\text{m}$ TL-Membranen nach 24 h ein Fluoreszenzäquivalent von 2.8×10^6 Teilchen im basolateralen Kompartiment detektiert wurde, belief sich der vergleichbare Wert bei Gittern auf 1.2×10^{10} Teilchen.

Um zu überprüfen, ob die basolateral detektierte Fluoreszenz tatsächlich auf transportierte Nanopartikel zurückzuführen ist, wurden Zentrifugationsexperimente durchgeführt. Dadurch sollte zwischen fluoreszenzmarkierten Teilchen und aus den Teilchen freigesetztem Fluoreszenzfarbstoff unterschieden werden können. Dazu wurde zunächst die relative Fluoreszenzintensität des Akzeptormediums nach Ende des 24-stündigen Transportversuchs bestimmt. Anschließend wurde das Medium in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und 15 min lang bei 60000 rpm zentrifugiert. Anhand der Differenz der relativen Fluoreszenzintensitäten des Akzeptormediums vor und nach Zentrifugieren kann der Anteil der partikulären Fluoreszenz ermittelt werden. Aus Abbildung 6 (Anhang A) ist ersichtlich, dass bei Filtermembranen mit $0.4\ \mu\text{m}$ bzw. $1\ \mu\text{m}$ Porendurchmesser vermutlich keine Nanopartikel transportiert wurden. Lediglich bei $3\ \mu\text{m}$ transparenten (TP-) Filtern und - in etwas höherem Ausmaß – bei $3\ \mu\text{m}$ TL-Membranen ließ sich aus der basolateralen Gesamtfluoreszenz auch ein partikulärer Anteil bestimmen. Im Vergleich dazu konnte für die Metallgitter eine deutliche Differenz zwischen der Fluoreszenz des Akzeptormediums vor und nach Zentrifugation detektiert werden. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die

Permeationsraten in Abbildung 5 (Anhang A) tatsächlich weitgehend auf transzellulär transportierte Nanopartikel zurückzuführen sind.

Ergänzend zu den eben besprochenen Transportversuchen mit 200 nm Fluoresbrite™ Nanopartikeln bei 37 °C wurden auch Studien bei 4°C durchgeführt (Anhang B, Abbildungen 9 und 10). Bei 4°C ist der Stoffwechsel der Zelle stark eingeschränkt, sodass aktive Transportphänomene fast vollständig ausgeschaltet werden können. In Abbildung 13 und 14 (Anhang B) sind die Ergebnisse der Zentrifugationsexperimente nach Ende der Transportuntersuchungen sowohl für die Filtermembranen als auch für die Metallgittereinsätze angeführt. Wie erwartet, war die Transportrate der Partikel bei 4 °C im Fall der Filtermembranen geringer. Bei den Metallgittern hingegen konnte bei 4°C ein im Vergleich zu 37 °C erhöhter Transport festgestellt werden. Die für 4°C ermittelten Werte sind allerdings kritisch zu hinterfragen, da der TEER der Monolayer bei den Gittern bereits nach 2 h stark erniedrigt war, sodass hier eigentlich nicht mehr von einem Transport über einen intakten Zellschicht ausgegangen werden kann.

Darüber hinaus wurden weitere Permeationsuntersuchungen mit 100nm Fluoresbrite™ Nanopartikeln bei 4°C und 37°C durchgeführt, deren Ergebnisse in Anhang B, Abbildungen 9, 11 und 12 angeführt sind.

DISKUSSION

Permeabilitätsstudien von Arzneistoffen, Prodrugs und auch Wirkstoffträgersystemen werden heute oft mit Hilfe von *in vitro* Transportsystemen durchgeführt, die auf artifiziellem Gewebe basieren. Um eine Kompartimentalisierung zu erzielen, werden diese Gewebe in Mikrotiterplatteneinsätzen auf Filtermembranen kultiviert. Solche Einsätze werden kommerziell unter den Bezeichnungen Transwell™ (Corning Costar, USA) und ThinCert™ (Greiner Bio-One, Österreich) vertrieben. Während die integrierten Filtermembranen in erster Linie als Wachstumsfläche für die Zellen dienen sollen, ist auch eine ausreichende Porosität von entscheidender Bedeutung, damit die Passage der transportierten Analyten ins basolaterale Kompartiment nicht beeinträchtigt wird. Üblicherweise beträgt die maximale freie Filtrationsfläche dieser Membranen jedoch nur 0.14 cm² pro 1 cm² Filterfläche (Tabelle 3, Anhang A). Im Allgemeinen kann daher davon ausgegangen werden, dass 85.9 – 99.7 % der Filterfläche keine Poren enthalten und folglich auch nicht für die Permeation von Arzneistoffen und auch Nanopartikeln zur Verfügung stehen. Ein weiterer Faktor, der die Permeation beeinflussen könnte, ist die Gesamtoberfläche der Filtermembran (Tabelle 3, Anhang A). Diese besteht aus der Ober- und Unterseite des Filters sowie der inneren Oberfläche der Poren und beläuft sich bei kommerziell erhältlichen Membranen meist auf 2.5 – 5.5 cm² pro 1 cm² Wachstumsfläche. Im Fall von 0.4 µm TL-Filtern, die am häufigsten für Arzneistoffpermeabilitätsstudien benutzt werden, ist die Membranoberfläche mit 14.75 cm² für das Transwell System und 29.75 cm² für das ThinCert™ System, bezogen auf jeweils 1 cm² Wachstumsfläche, jedoch stark erhöht. Je nach Affinität des Analyten für das Material, aus dem die Filter hergestellt werden, könnte es zu Adsorptionsphänomenen an diese Gesamtoberfläche kommen. Dadurch würde ein gewisser Anteil der durch den Zelllayer permeierten Substanz vom Filter sequestriert und somit nicht ins Akzeptormedium gelangen.

Bei Nanopartikeltransportstudien könnten, insbesondere bei Porendurchmessern $<1\ \mu\text{m}$, derartige Partikeladsorptionen außerdem zu einem Verschluss der Poren oder somit zu einer weiteren Verringerung der Permeabilität führen (Abbildung 8, Anhang A). Sowohl Adsorption an den Filter als auch verzögerte Permeation aufgrund von niedriger Filtrationsfläche könnten in beträchtlichen Unterschieden zwischen der gemessenen Permeationsrate und der tatsächlichen Permeationsrate durch den Zelllayer resultieren. Aufgrund dieser Überlegungen erscheint die Weiterentwicklung von Filtermaterialien und Austestung von alternativen porösen Wachstumsoberflächen sinnvoll. Das in der vorliegenden Diplomarbeit verwendete Metallgitter könnte sich als Wachstumsunterlage für Zellen in Permeationstudien in mehrerlei Hinsicht als vorteilhaft erweisen. Diese Gitter können reproduzierbar mit regelmäßiger Maschenverteilung hergestellt werden und sind zu geringen Kosten erhältlich. Außerdem steht der verhältnismäßig kleinen Gesamtoberfläche von $3.16\ \text{cm}^2$ pro $1\ \text{cm}^2$ Wachstumsoberfläche eine freie Filterfläche von 25 % gegenüber. Diese ist beinahe doppelt so hoch wie jene von $3\ \mu\text{m}$ TL-Membranen, die die porösesten kommerziell erhältlichen Wachstumsunterlagen darstellen (Tabelle 3, Anhang A). Obwohl die Maschenweite von $25\ \mu\text{m}$ den mittleren Durchmesser einer Caco-2 Einzelzelle von $18\ \mu\text{m}$ deutlich übertrifft, bildeten sich bei Kultivierung auf dem Gitter konfluente Zelllayer aus (Abbildung 2, Anhang A). Diese Zellschicht ist durch ein dichtes Netzwerk an Interzellulärverbindungen sowie einen TEER von $\sim 480\ \Omega\ \text{cm}^2$ charakterisiert und somit vergleichbar mit auf Filtermembranen kultivierten Caco-2 Zelllayern.

Um zu untersuchen, inwieweit die diskutierten Porositätsparameter den Transport von Nanopartikeln über artifizielles intestinales Epithel beeinflussen, wurden in weiterer Folge Permeationsstudien durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden Polystyrolnanopartikel mit einem Durchmesser von $\sim 200\ \text{nm}$ eingesetzt. Ergänzend dazu wurden auch mit $100\ \text{nm}$ Partikeln Transportuntersuchungen bei 4°C und 37°C durchgeführt (Anhang B: Abbildung 9 bis 12), die jedoch im Hauptversuch keine

weitere Berücksichtigung fanden und hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden sollen. Im Rahmen von Stabilitätsstudien (siehe Anhang B; Abbildung 1 bis 8) wurde festgestellt, dass diese Teilchen in einem Transportmedium bestehend aus RPMI-1640 Zellkulturmedium + 1 % Poloxamer 188 über einen Zeitraum von 24 h nicht aggregieren (Tabelle 1, Anhang A). Bei Inkubation der 200 nm Polystyrolartikel mit Caco-2 Monolayern wurde eine über die Zeit ansteigende Zellassoziation detektiert (Abbildung 3, Anhang A). Diese Adhäsion der Teilchen an die apikale Plasmamembran, die eine Grundvoraussetzung für eine etwaige nachfolgende Internalisation und Transcytose darstellt, konnte auch mittels Fluoreszenzmikroskopie belegt werden (Abbildung 7, Anhang A). Durch diese Untersuchungen wurden die Resultate der Arbeiten von Behrens et al. und Garinot et al. bestätigt, die die Bindung und Aufnahme von 200 nm Polystyrolpartikeln in Caco-2 Zellmonolayer und M Zellen bereits beschrieben haben. Außerdem ist nach diesen Ergebnissen davon auszugehen, dass die Teilchen während der Transportstudien sowohl monodispers verteilt vorliegen sollten als auch mit dem artifiziellen intestinalen Epithel interagieren können.

Nanopartikeltransportstudien wurden bisher mit Monolayern durchgeführt, die auf Filtermembranen mit 3 µm (des Rieux et al., 2007, Garinot et al., 2007 und Desai et al., 1997) bzw. 0.4 µm Porenweite (Russel-Jones et al., 1999, Carteria et al., 2009 und Behrens et al., 2002) angezüchtet wurden. Jedoch fehlt bisher eine systematische Untersuchung der Abhängigkeit der Transportrate von der Filterporosität. In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Permeation von 200 nm Polystyrolpartikeln über Caco-2 Zelllayer charakterisiert, die auf unterschiedlichsten Filtermembranen (0.4 µm TP, 0.4 µm TL, 1 µm TP, 3 µm TP, 3 µm TL) bzw. einem Metallgitter mit 25 µm Maschenweite kultiviert wurden. Da sich vesikuläre Transportprozesse durch Temperaturabhängigkeit auszeichnen, wurden die über einen Zeitraum von 24 h anberaumten Experimente bei 37°C durchgeführt (des Rieux et al., 2005, Florence et al., 2001). Zur Detektion der transportierten Partikel im basolateralen Kompartiment sind in

der Literatur zwei unterschiedliche Verfahren beschrieben. Einerseits können transcytierte Teilchen mittels Flowcytometrie erfasst werden (des Rieux et al., 2005 und 2007 und Garinot et al., 2007). Sowohl die Trenn- als auch die Detektionsleistung dieser Methode ist jedoch nicht geeignet, um Nanopartikel im Größenbereich von 200 nm zu erfassen. Andererseits kann beim Einsatz fluoreszenzmarkierter Teilchen eine fluorimetrische Analyse des Akzeptormediums zur indirekten Partikelquantifizierung angewandt werden (Desai et al., 1997, Russel-Jones et al., 1999, Behrens et al., 2002 und Gaumet et al., 2009). Letztere Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit für die Bestimmung der Partikelkonzentration im basolateralen Kompartiment gewählt. In den Permeabilitätsstudien wurden für alle Filtermembranen durchwegs niedrige Partikeltransportraten detektiert (Abbildung 4, Anhang A). Bei Verwendung des Metallgitters als Wachstumsunterlage waren hingegen sowohl der zeitliche Anstieg als auch die am Versuchsende gemessene Fluoreszenzintensität im basolateralen Kompartiment deutlich erhöht (Abbildung 5, Anhang A). Weiterführende Experimente zeigten jedoch, dass die Fluoreszenzintensität des Akzeptormediums nur bedingt als Maß für die Teilchenkonzentration geeignet ist. Bei einer fluorimetrischen Analyse des unprozessierten Akzeptormediums kann nämlich nicht zwischen partikulärer und freier Fluoreszenz unterschieden werden. Erst nach Ultrazentrifugation desselben kann der Beitrag der Partikel zur Gesamtfluoreszenz ermittelt werden (Abbildung 6, Anhang A). Offensichtlich wird im Verlauf des Experiments kontinuierlich Fluoreszenzfarbstoff aus den Nanopartikeln freigesetzt. Diese freien Fluorophore können nun ebenfalls durch die Zellen permeieren und entlang des Konzentrationsgradienten ins basolaterale Kompartiment diffundieren. Aus den Zentrifugationsergebnissen ließ sich ableiten, dass die detektierte Fluoreszenz bei 0.4 µm TP-, 0.4 µm TL- und 1 µm TP-Filtern zum größten Teil auf freigesetztem Fluorophor beruht (Abbildung 6, Anhang A). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der diffusive Transport von 200 nm Partikeln in vergleichsweise kleinen Poren überdurchschnittlich stark eingeschränkt ist, weshalb

keine Permeation detektierbar ist. Auch bei 3 μm TP- und 3 μm TL-Membranen ist der überwiegende Anteil der analysierten Fluoreszenzintensität auf nicht partikuläre Anteile zurückzuführen. Jedoch konnte bei 3 μm TL-Membranen nach 24 h zumindest ein Transport von 0.1 % der Partikel nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den marginalen Permeationsraten bei Filtermembranen wurde mit dem Metallgitter ein deutlich erhöhter Transport von Nanopartikeln detektiert (Abbildung 6, Anhang A). Diese erhöhten Werte beruhen vermutlich auf der doch deutlich größeren freien Filtrationsfläche des Metallgitters. Andererseits wäre aber auch denkbar, dass der Nanopartikeldiffusion durch die Gitterporengeometrie geringere sterische Barrieren als bei den Filtermembranen entgegengesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl der Porendurchmesser als auch die Porendichte der Filtermembran die experimentell ermittelten Permeabilitäten beeinflusst. Vor allem für Transportstudien mit Substanzen oder Partikeln, die nur eine sehr geringe Permeabilität aufweisen, sollten daher Alternativen zu den derzeit verfügbaren Membranen gesucht werden, um die ohnehin geringen Transportraten nicht durch den Filter noch zusätzlich zu beeinträchtigen. Die vorgestellten Metallgitter könnten für diesen Zweck richtungsweisend sein, insbesondere da gezeigt werden konnte, dass die Kultivierung eines konfluenten Zelllayers auch auf solchen, verhältnismäßig grobporigen, Materialien möglich ist. Mit derart verbesserten Transportsystemen könnten schließlich auch biopharmazeutische Kernprobleme, wie das Ausmaß der transepithelialen Permeation von Nanopartikeln, adressiert werden, die mit den zum jetzigen Zeitpunkt verfügbaren Systemen nicht eindeutig geklärt werden können.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] IJ Hidalgo, TJ Raub, RT Borchardt, Gastroenterology, **1989**, 96, 736-749
- [2] Christian Fillafer, Michael Wirth, Franz Gabor, Langmuir, **2007**, 23, 8699-8702
- [3] Alexander T. Florence, Nasir Hussain, Advanced Drug Delivery Reviews, **2001**, 50, S69-S89
- [4] Anne des Rieux, Eva G. E. Ragnarsson, Elisabet Gulberg, Véronique Prémat, Yves-Jaques Schneider, Per Artursson, Pharmaceutical Sciences, **2005**, 25, 455-465
- [5] Marie Gaumet, Robert Gurny, Florence Delie, Pharmaceutical Sciences, **2007**, 36, 465-473
- [6] Isabel Behrens, Ana Isabel Vila Pena, Maria José Alonso, Thomas Kissel, Pharmaceutical Research, **2002**, 19, 8
- [7] G.J. Russel-Jones, L. Arthur, H. Walker, International Journal of Pharmaceutics, **1999**, 247-255
- [8] Manisha P. Desai, Vinod Labhasetwar, Elke Walter, Robert J. Levy, Gordon L. Amidon, Pharmaceutical Research, **1997**, 14, 11
- [9] Robert M. Samstein, Karlo Perica, Fanor Baderrama, Michael Look, Tarek M. Fahmy, Biomaterials, **2008**, 29, 703-708
- [10] Anne des Rieux, Virginie Fievez, Ivan Théate, Jan Mast, Véronique Prémat, Yves-Jaques Schneider, Pharmaceutical Sciences, **2007**, 30, 280,291
- [11] Marie Garinot, Virginie Fiévez, Vincent Pourcelle, François Stoffelbach, Anne des Rieux, Laurence Plapied, Ivan Theate, Hélène Freichels, Chrinstine Jérôme, Jacqueline Marchand-Brynaert, Yves-Jaques Schneider, Véronique Prémat, Journal of Controlled Release, **2007**, 120, 195-204
- [12] Malgorzata S. Cartiera, Katherine M. Johnson, Vanathy Rajendran, Michael J. Caplan, W. Mark Saltzman, Biomaterials, **2009**, 30, 2790-2798

ANHANG A

Abstract

Transport studies across cell monolayers *in vitro* are biopharmaceutical standard techniques for determining the permeability of drugs and prodrugs. Moreover, transport systems can be used to investigate cytoadhesion, internalization and transcytosis of novel drug carriers such as nano- and microparticles. To elucidate to which extent the filter membrane used for cell cultivation affects the transport rates, permeability studies across Caco-2 monolayers cultivated on filter membranes with pore sizes of 0.4 μm , 1 μm and 3 μm were performed using 0.2 μm fluorescence labelled polystyrene nanoparticles. In addition, the cells were cultivated on stainless steel grids with a mesh width of 25 μm representing a potential alternative to conventional filter materials. The cell monolayers cultivated on these metal grids were confluent and characterized by a transepithelial electrical resistance of 477 $\Omega\text{ cm}^2$. Subsequent transport studies at 37°C illustrated that within 24 h no nanoparticles reached the basolateral compartment, if the cell layers had been cultivated on filter membranes with 0.4 and 1 μm pore size. In case of membranes with 3 μm pore diameter, particle transport depended on pore density and corresponded to 0.02 % and 0.04 % of the initially added particles in case of transparent and translucent membranes, respectively. In contrast, clearly higher particle concentrations of 1.2×10^{10} were determined in the basolateral compartment when highly porous metal grids had been used as growth support for the Caco-2 layer. Interestingly, indirect detection of nanoparticles by fluorimetry was found to be prone to considerable error. As indicated by ultracentrifugation experiments, false positive results were mainly due to fluorescence marker that had been released from the nanoparticles. The presented results indicate that in addition to the cell layer, permeability characteristics of the filter membrane affect analyte transport. Since they

allow to exclusively study transport across the cell layer, highly porous growth materials like the presented metal grid might prove clearly beneficial for biopharmaceutical transport studies.

Keywords

transport, nanoparticles, Caco-2 cells, metal grid, Transwells™

1. Introduction

In vitro transport studies across cell monolayers are standard techniques for determining the permeability of drugs and prodrugs in the framework of the biopharmaceutics classification system (BCS). Moreover, the same setups are used to investigate the cytoadhesion, internalization and transcytosis of novel drug carrier systems such as nano- and microparticles. Typically, *in vitro* transport models consist of an apical compartment which is separated from a basolateral compartment by a filter membrane. At this, the filter membrane serves as a growth support for the cells which, upon forming a confluent layer, simulate an epithelial, endothelial or other tissue of interest. Such compartmentalized devices can be accommodated in microplate wells and are commercially available (e.g., Transwell™, Costar; ThinCert™, Greiner Bio-One). This allows automatized and parallelized operation of experiments in a medium to high-throughput manner, which is not only beneficial for academic but also for industrial research.

While the primary aim of a transport study is to determine permeation of an analyte through artificial tissue, the filter membrane itself might constitute a not to be underestimated additional barrier. To the best of our knowledge this issue has not been addressed so far. Usually, filters with pore diameters $\leq 3 \mu\text{m}$ are used for

biopharmaceutical transport studies. The filter membranes employed are mainly made from polycarbonate, polyester or poly(ethylene terephthalate) and are characterized by different pore sizes and pore densities. In particular, the latter parameters determine the permeability of the filter material for analytes of different size.

It is the aim of the present study to investigate if the differences between commercially available filter types will influence nanoparticle transport rates across epithelial cell layers. Since it is still a subject of active debate to which extent nanoparticles can cross an intact epithelial barrier, the impact of the filter material on nanoparticle transport is of exceptional interest. Moreover, a 25 μm mesh width metal grid will be investigated regarding its usability as a highly porous alternative growth support. Upon investigation of the growth characteristics of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 on the metal grid, nanoparticle transport studies will be conducted with cell layers cultivated on various filter membranes and the grid. Caco-2 monolayers have been used as an *in vitro* model to study drug absorption, binding characteristics and metabolism, since they have features similar to absorptive intestinal cells, such as microvilli and carrier mediated transport systems. Moreover, they allow for paracellular transport due to their tight junctional network. Despite their colonic origin the cells form monolayers that undergo complete and terminal differentiation forming a columnar absorptive epithelium similar to that of the human small intestine (Hidalgo et al., 1989). Caco-2 cells are a widely accepted model for the human small intestinal epithelium to characterize intestinal drug absorption (Miret et al., 2002). To elucidate the impact of the growth support on nanoparticle permeation 200 nm fluorescent polystyrene nanoparticles will be used as colloids, which are likely to cross epithelial barriers (des Rieux et al., 2005, Garinot et al., 2007 and Behrens et al., 2002) and which are well in the size range of potential drug carrier systems.

2. Materials and Methods

Materials: 24-well and 96-well polystyrene microplates were purchased from IWAKI (Science Products Dept., Asahi Glass Co., Japan), ThinCert™ 24-well tissue culture inserts for cultivation of cell monolayers were obtained from Greiner Bio-One (Kremsmünster, Austria). Fluoresbrite™ carboxylate YG nanospheres 0.2 µm (2.65 % Solids-Latex, Diameter = 0.212 µm) were from Polysciences, Inc. (Warrington, USA), stainless steel tissue grid with a mesh size of 25 µm was purchased from Bückmann® GmbH (Mönchengladbach, Germany), synthetic rubber adhesive (Microset 101FF) was obtained from Microset Products Ltd. (Nuneaton, U.K.) and poloxamer 188 was from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). All other chemicals used were of analytical purity.

Nanoparticle stability in transport media: To determine a suitable suspension medium for the transport studies, the stability of nanoparticles in different media was examined. While distilled water served as control, RPMI-1640 cell culture medium + 1 % poloxamer 188 and Hank's balanced salt solution (HBSS) were used as cell culture compatible dispersants. Nanoparticle suspensions in the respective media (2.8×10^{11} particles ml⁻¹) were incubated end-over-end for 24h. The mean particle size and polydispersity index (Pdl) of each sample were determined with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) at the starting point and after 2, 4, 6, 9, and 24 h of incubation at 37°C.

Cell culture: The Caco-2 cell line was obtained from the German collection of microorganisms and cell cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). Cells were cultivated in 75 cm² tissue culture flasks in RPMI 1640 cell-culture medium containing 10 % fetal bovine serum, 4 mM L-Glutamine and 150 µg mL⁻¹ gentamycine in a humidified 5 % CO₂/95 % air atmosphere at 37 °C and subcultured with Triple Select (Gibco, Lofer, Austria).

Cell cultivation on filter membranes and metal grids. Caco-2 monolayers were cultivated on ThinCert™ tissue culture inserts with pore diameters of 3 µm (transparent; pore density: 0.6×10^6 [cm⁻²]), 3 µm (translucent; pore density: 2×10^6), 1 µm (transparent; pore density: 2×10^6), 0.4 µm (transparent; pore density: 2×10^6), 0.4 µm (translucent; pore density: 1×10^6). The apical compartment was filled with 120 µL cell suspension containing 1.25×10^6 cells while 600 µL of medium were added to the basolateral compartment. The medium was exchanged every third day during a total cultivation period of 21 days.

For cultivation of Caco-2 cells on metal grids the filter membrane was removed from commercially available inserts. Metal grids were cut to a similar size and bonded to the bottom of the plastic cups with Microset adhesive. Upon sterilization with ethanol for 30 min, 120 µL of cell suspension containing 1.25×10^6 cells was added to the apical compartment. The basolateral compartment was left empty for the first 24 h of cultivation. As a consequence of surface tension the cell suspension did not penetrate into the basolateral compartment and thus the seeded cells were efficiently deposited at or near the wires.



Fig. 1. Insert with stainless steel tissue grid (left) and insert with pore filter (right)

Characterization of cell monolayers: The cell monolayers grown on the filter membranes and metal grids were characterized regarding their confluency and electrical resistance. For localization of cells and analysis of intercellular connections

the nuclei and tight junction associated protein ZO-1 were stained. At this, the monolayers were fixed with ice-cold methanol (-22 °C), washed with phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) and rehydrated in PBS + 1 % bovine serum albumin (BSA). Subsequently, a 1:100 dilution of mouse-anti-human ZO-1 antibody (BD Transduction Laboratories) was added followed by incubation for 1 h at 37°C. Upon washing with PBS + 1 % BSA, a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled goat-anti-mouse antibody (1:200) was added followed by incubation for 30 min at 37°C. Concurrent with the latter incubation step propidium iodide (2µg/mL) was added to stain the cell nuclei. After washing with PBS + 1 % BSA, the samples were analyzed on a Nikon® Eclipse 50i microscope.

The transepithelial electrical resistance (TEER) was determined using an EVOMX voltmeter (World Precision Instruments, Sarasota, USA).

Nanoparticle binding: The binding of polystyrene nanoparticles to Caco-2 cell monolayers was assessed via a microplate binding assay. Caco-2 cells were seeded in 96-well microplates at a density of 1.7×10^4 cells per 160 µL per well and were cultivated until a confluent monolayer had formed which typically was the case after 7 days. 120 µL of nanoparticle suspension (3.24×10^{11} nanoparticles mL⁻¹) in RPMI-1640 cell culture medium supplemented with 1 % (w/v) poloxamer 188 were added to each well. The quantity of cell-associated fluorescence upon incubation for 0.5, 2, 4 and 6 h, which corresponds to the number of cell-bound particles, was assessed by fluorimetry using a Tecan Infinite® 200 fluorescence reader (ex/em: 440/480) after washing thrice with isotonic HEPES/NaOH buffer pH 7.4 (isoHEPES). The binding assay was performed in quadruplicate and repeated once.

Particle transport studies: Nanoparticle transport experiments were performed in RPMI-1640 cell culture medium supplemented with 1 % (w/v) poloxamer 188. For each experiment 600 µL of transport medium were added to the basolateral chamber and 120 µL of particle suspension (3.24×10^{11} particles mL⁻¹) were added to the apical

compartment. The cell monolayers were incubated for 24 h at 37°C. Samples (100 µL) were drawn from the basolateral compartment after 2, 4, 6, 9, 12 and 24 h. The relative fluorescence intensity of the samples was monitored using a Tecan Infinite® 200 fluorescence reader (ex/em: 440/480). Subsequently the liquid was retransferred to the respective wells. After completion of the experiment the acceptor medium was filled into ultracentrifuge vials and the nanoparticles were spun down by centrifugation with a Sorvall Ultra Pro 80 type from Kendro Laboratory Products (Langenselbold, Germany) for 15 min at 60 000 rpm and 4 °C. The fluorescence intensity of the supernatant, which represents the contribution of released dye molecules to the overall fluorescence of the acceptor medium, was then determined via fluorimetry. All transport studies were performed in duplicate and repeated three times to assure statistical relevance.

Conversion of fluorescence intensity to number of particles: The nanoparticles used in the present study were labelled with a fluorophore. This facilitated their indirect detection via fluorimetry. From predetermined dilution series, the mass of particles corresponding to a specific signal can be obtained. Since the particle mass is known, the number of particles can be calculated according to Equation 1:

$$N = \frac{M}{m}$$

where M is the total mass of particles [kg] contained in 1 mL and m is the mass of a single particle [kg] which can be obtained from Equation 2:

$$m = V\rho$$

where V is the volume of a particle [m³] and ρ is its density [kg m⁻³; polystyrene: 1050 kg m⁻³]. In a simplified form this results in Equation 3:

$$N = \frac{3M}{4r^3\pi\rho}$$

where r is the radius of a particle [m].

Fluorescence microscopy. To investigate the localisation of nanoparticles associated with a Caco-2 monolayer (after incubation for 24 h at 37 °C), z-stacks of fluorescence microscopic images were acquired using a Cell[^]R imaging system (Olympus Austria, Vienna, Austria).

3. Results

Stability of nanoparticles in transport media: As illustrated in Table 1 the mean particle size in distilled water is about 207 nm. This is consistent with the specifications of the manufacturer. In course of incubation for 24 h at 37°C, the size of the particles remained unaltered and the Pdl was lower than 0.05 indicating a narrow particle size distribution. In RPMI 1640 + 1 % poloxamer 188 the mean particle size is increased by about 85 nm. This was already observed upon initial preparation of the particle suspension and did not change further in course of incubation for 24 h. When considering the rather spontaneous occurrence of the increase in particle size in conjunction with the consistently low Pdl's over 24 h, it seems likely that the monitored increase in particle size is not due to aggregation. Rather than that the shift in particle size probably can be attributed to the higher viscosity of the suspension medium that biases the result of nanoparticle sizing by dynamic light scattering (Fillafer et al., 2007). In contrast, clear aggregation of the particles was observed in HBSS. This was exemplified by an increase of the mean particle size and Pdl to 299 nm and 0.108 respectively immediately after preparation of the suspension. In course of further incubation flocculation occurred which was clearly visible and also confirmed by dynamic light scattering (Table 1).

Table 1: Mean particle size and polydispersity index (PDI) of polystyrene nanoparticles (200 nm) suspended in distilled water, RPMI-1640 cell culture medium + 1 % poloxamer 188 and Hank's balanced salt solution (HBSS)

	Mean particle size [nm] / PDI		
	distilled water	RPMI + 1 % pol.	HBSS
Incubation period			
0h	207.0 / 0.048	292.0 / 0.038	299.0 / 0.108
2h	205.0 / 0.015	288.0 / 0.002	876.0 / 0.166
4h	204.0 / 0.010	288.0 / 0.022	3479.0 / 0.453
6h	202.0 / 0.009	286.0 / 0.013	3726.0 / 0.555
9h	204.0 / 0.013	290.0 / 0.008	4471.0 / 0.357
24h	204.0 / 0.044	291.0 / 0.016	3713.0 / 0.372

Characterization of cell layers. Fig. 2 A and B illustrate a confluent Caco-2 cell layer grown on stainless steel tissue grid with a mesh size of 25 μm . Immunostaining of tight-junction associated protein ZO-1 resulted in visualization of a continuous network of intercellular connections indicating formation of a confluent and tight cell layer (Figure 2A). This was further underlined by the dense occupation of grid pores with cell nuclei as shown in Figure 2B.

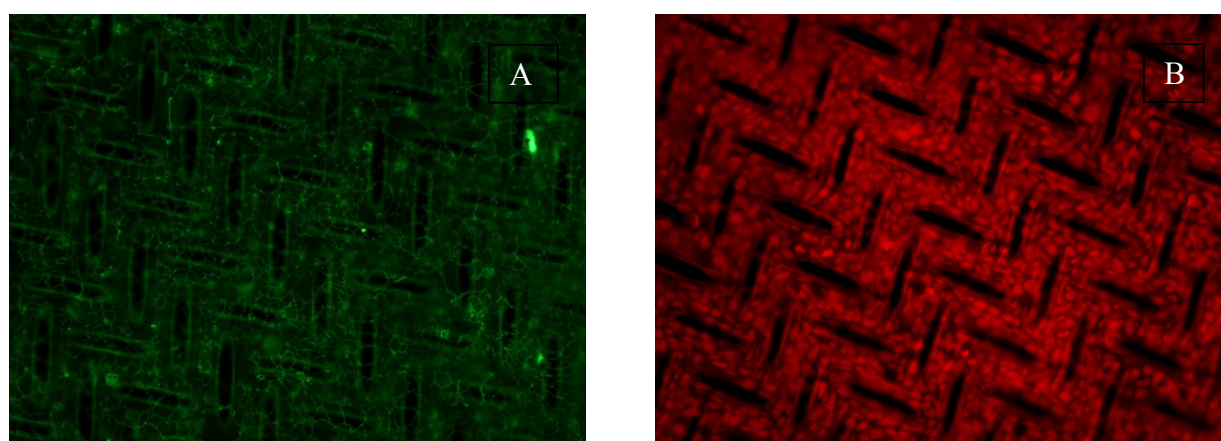


Figure 2. Caco-2 cell layer cultivated on a metal grid (dark structures) with 25 μm mesh width. Tight junction-associated protein ZO-1 is depicted in green (A,) and cell nuclei in red (B).

The formation of a tight cell layer is associated with an increase in the transepithelial electrical resistance. In order to estimate the contribution of the growth support to the experimentally observed TEER values, the filter membranes' and metal grid's resistances in transport medium were determined. Expectedly, the resistances were rather similar amounting to $75 \Omega \text{ cm}^2$ for the metal grid and $64 \Omega \text{ cm}^2$ for the ThinCert™ filter membranes. When subtracting these values from the experimentally determined resistances of the cell layers, mean TEERs of $477 \Omega \text{ cm}^2$ for the metal grid and $533 \Omega \text{ cm}^2$ for pore filters were observed prior to particle transport experiments. After incubation with nanoparticles for 24 h, the TEERs were slightly decreased and amounted to $438 \Omega \text{ cm}^2$ on average (maximum: $490 \Omega \text{ cm}^2$, minimum: $371 \Omega \text{ cm}^2$) and $462 \Omega \text{ cm}^2$ on average (maximum: $537 \Omega \text{ cm}^2$, minimum: $374 \Omega \text{ cm}^2$) respectively.

Nanoparticle binding assay. The time dependency of nanoparticle binding to Caco-2 monolayers is outlined in Fig. 3. Upon incubation for 6 h at 37°C , a maximum quantity of 3.0×10^9 cell-associated particles was monitored.

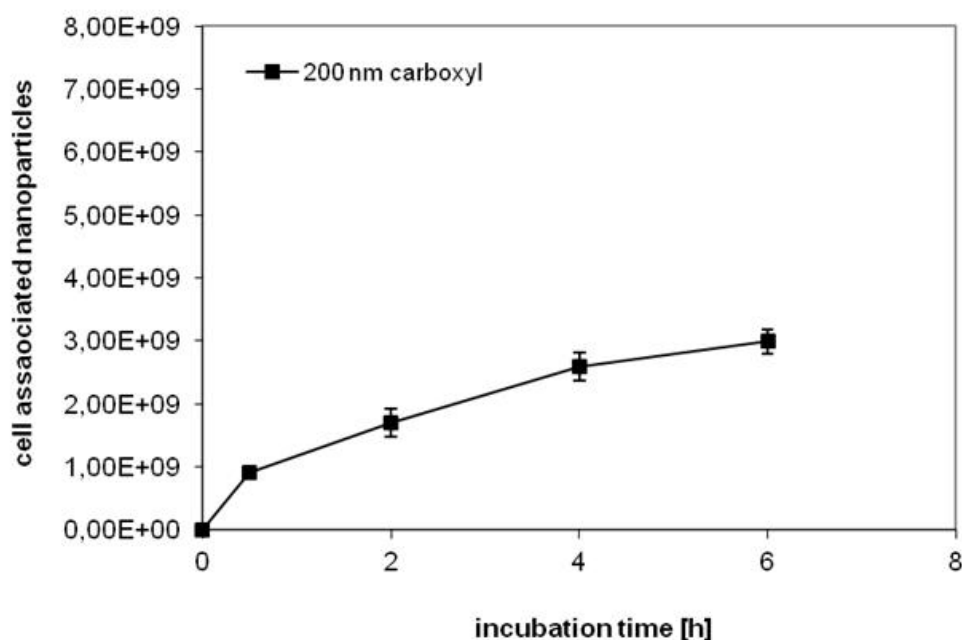


Fig. 3: Number of nanoparticles bound to Caco-2 monolayer in course of incubation for 6 h at 37°C .

Particle transport studies: Nanoparticle transport studies were performed with Caco-2 layers cultivated on a metal grid and on filter membranes with different pore sizes and densities. As indicated in Figure 4, transport of particles through cell monolayers cultivated on commercially available filter membranes was already observed after 4 h of incubation. The fluorescence intensity determined in the basolateral compartment corresponded to 2.0×10^7 particles for 3 μm translucent filters (TL), 1.6×10^7 for 3 μm transparent filters (TP), 4.3×10^6 for 1 μm TP, 4.6×10^6 for 0.4 μm TL and 1.2×10^6 for 0.4 μm TP. Similarly, but to a higher extent, particle transport was observed through Caco-2 layers cultivated on metal grids (Figure 5). After 4 h a fluorescence intensity corresponding to 4.4×10^8 particles was observed in the acceptor medium. In course of incubation for 24 h at 37°C, the fluorescence intensity in the basolateral compartment increased gradually. At the end of the experiment the number of particles transported to the basolateral compartment ranged between 3.4×10^7 and 2.1×10^8 depending on the pore diameter and pore density of the filter membrane used as growth support. As illustrated by the results in Table 2 and Figure 4, particle transport increased with an increase in pore diameter as well as pore density. “Transparent” filter membranes are generally characterized by lower pore densities and consequently lower transport rates than their “translucent” counterparts. The particle transport studies performed with Caco-2 layers on metal grids with high porosity and pore size confirmed this tendency. As compared to filter membranes, clearly higher fluorescence intensities were observed in the basolateral compartment (Figure 5). This finally amounts to an about 100-fold higher permeation of nanoparticles through cells cultivated on metal grids (Table 2).

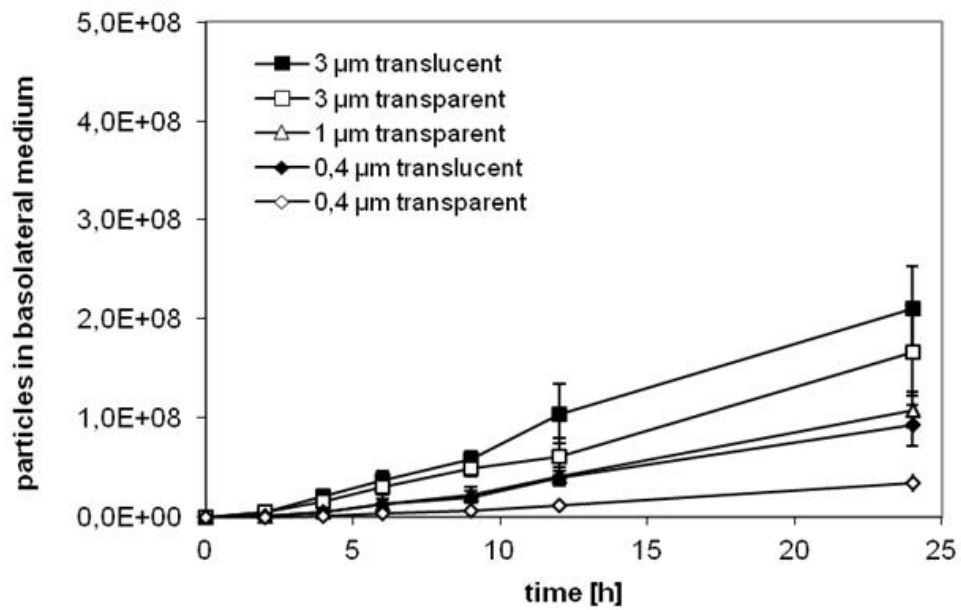


Figure 4. Number of nanoparticles detected in the basolateral compartment in course of transport studies across Caco-2 monolayers cultivated on different ThinCert™ filter membranes.

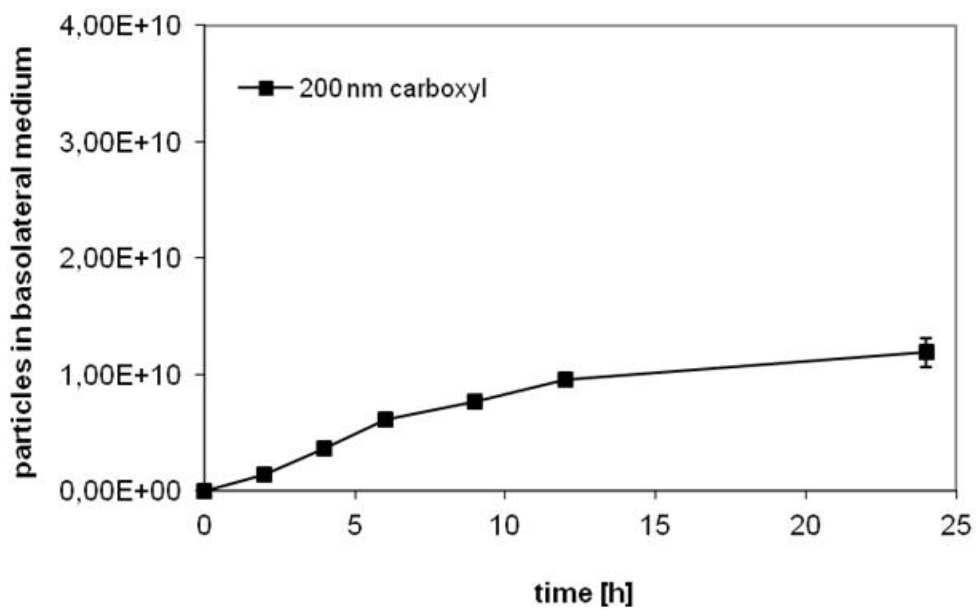


Figure 5. Number of nanoparticles detected in the basolateral compartment in course of transport studies across Caco-2 layers cultivated on metal grids

Table 2. Maximal and experimentally observed number of particles in the basolateral compartment upon transport for 24 h.

pore size	particle number (exp. observed)	particle number (max. reachable)
0.4 μm tp	3,40E+07	1.90E+11
0.4 μm tl	9,30E+07	
1.0 μm tp	1,10E+08	
3.0 μm tp	1,70E+08	
3.0 μm tl	2,10E+08	
25 μm	1,20E+10	

In order to determine whether the fluorescence detected in the basolateral compartment originates from particles or from free fluorophore, the acceptor medium was subjected to ultracentrifugation after the end of the experiment. At this, the difference in fluorescence between the basolateral medium prior to centrifugation and the supernatant after centrifugation constitutes the contribution of the particulate fraction to the total fluorescence. For transport studies on filter membranes, mean fluorescence intensities (MFI) of 47 ± 14 for 0.4 μm TP, 90 ± 33 for 0.4 μm TL, 122 ± 25 for 1 μm TP, 215 ± 27 for 3 μm TP, and 265 ± 16 for 3 μm TL were determined in the basolateral compartment prior to centrifugation (Figure 6).

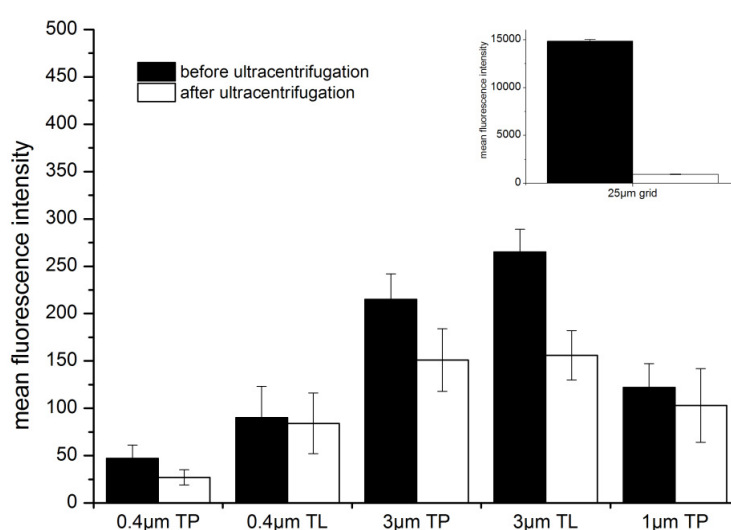


Fig. 6. Effect of ultracentrifugation on the detected fluorescence intensity after the end of the transport experiment

Upon ultracentrifugation the MFI of the supernatants was lower, but only in case of Caco-2 layers cultivated on filter membranes with 3 μm pore size a clear difference could be determined. This indicates that the fluorescence detected in the basolateral compartment is widely not due to transported nanoparticles, which relativizes the results in Figure 4 and Table 2. In case of transport studies with the stainless steel metal grid as growth support, a clearly higher MFI of 14869 ± 936 was detected in the basolateral compartment after 24 h of incubation (Figure 6, insert). Upon centrifugation a distinct drop in fluorescence to 161 ± 31 was observed. Obviously, a considerable amount of nanoparticles in the acceptor medium was spun down resulting in a decrease of the MFI.

Fluorescence microscopy. A z-stack of fluorescence microscopic images across a Caco-2 monolayer and incubated with polystyrene nanoparticles is shown in Fig. 7. As illustrated, the region above the cell nuclei, which coincides with the apical plasma membrane, is densely occupied by fluorescent particles (green dots). This indicates binding of the particles to the cell membrane, which is a prerequisite for internalisation and transcytosis through the cell layer.

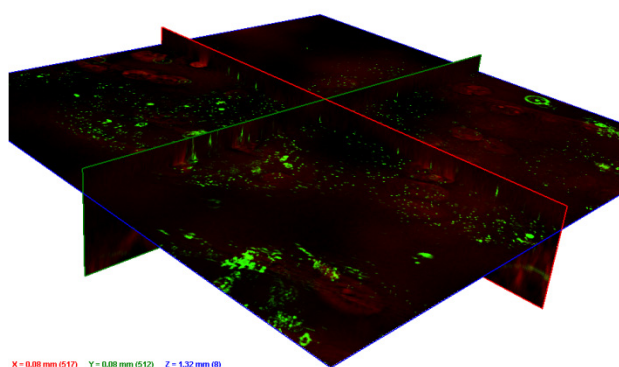


Fig. 7: Caco-2 monolayer cultivated on a filter membrane and incubated with polystyrene nanoparticles (0.2 μm ; green) for 24 h at 37°C. Cell nuclei were stained with propidium iodide (red).

4. Discussion

The aim of the present study was to investigate the effect of different growth supports on the rate of nanoparticle transport through Caco-2 cell layers. Usually, transport studies are performed with cell monolayers cultivated on filter membranes made from polymers. For this purpose, several filter materials with a wide range of pore sizes and pore densities are available (Table 3). If microscopic inspection of the cell growth is an issue, transparent filters (TP) are preferable. In contrast, translucent filters (TL) are characterized by higher pore densities and thus higher permeability which is desirable for most experiments. Filter membranes with pore diameters of 0.4 μm are generally used for transport studies with low molecular weight drugs. If nanoparticle transport is to be investigated, larger pore sizes up to 3 μm are necessary in order to allow for passage of transcytosed colloids into the acceptor compartment.

Table 3: Selection of commercially available cell growth supports for transport studies compared with metal grid.

Pore size	free filtration area* [cm^2]	Material	Surface area* [cm^2]	Membrane thickness [μm]
ThinCert™ System				
3 μm TL	0.1414	PET	5.48 cm^2	22.6
3 μm TP	0.0424	PET	3.05 cm^2	22.6
1 μm TP	0.0157	PET	3.35 cm^2	22.0
0.4 μm TL	0.1260	PET	29.75 cm^2	20.0
0.4 μm TP	0.0025	PET	2.56 cm^2	20.0
Transwell System				
3 μm TL	0.1414	Polycarbonate	3.60 cm^2	10.0
3 μm TP	0.1414	PET	3.60 cm^2	10.0
0.4 μm TL	0.1260	Polycarbonate	14.75 cm^2	10.0
0.4 μm TP	0.0500	PET	2.51 cm^2	10.0
Metal Grid				
25 μm	0.25	stainless steel	3.16 cm^2	25.0

* [cm^2 per cm^2]

However, while providing the necessary growth support for the cells, the filter membrane itself might also represent a barrier for analyte diffusion into the basolateral medium. The rather low free filtration areas that range between 0.3 % and 14.1 % exemplify this. In consequence 85.9 - 99.7 % of the filter's surface area are not available for substance transport. Moreover, the considerable surface area of the upper and bottom face of the filter and in particular its pores might represent a substrate for adsorption of low molecular weight drugs as well as nanoparticles. Adsorption to the filter could lead to substance loss in course of the experiment and thereby might qualitatively and quantitatively bias the results of permeability studies (Figure 8). In particular in the case of TL 0.4 μm filter membranes, which are most frequently used for permeability studies, the high surface area of the filter has to be noted. While the surface area of commercially available filters generally ranges between 2.5 and 5.5 cm^2 per 1 cm^2 of membrane, the surface areas of TL 0.4 μm membranes are 14.75 cm^2 and 29.75 cm^2 for the Transwell and the ThinCert system respectively (Table 3). Considering this issue a reduction of the filter quotient (δ) is entailed, which represents the ratio between free filtration area and surface area. If analyte adsorption occurs, it will most pronouncedly affect permeation studies on filters with a low filter quotient. In addition, in case of particle transport studies adsorption of colloids to the pore walls might lead to narrowing of the canals, which could at least partially block the diffusive pathway through the filter.

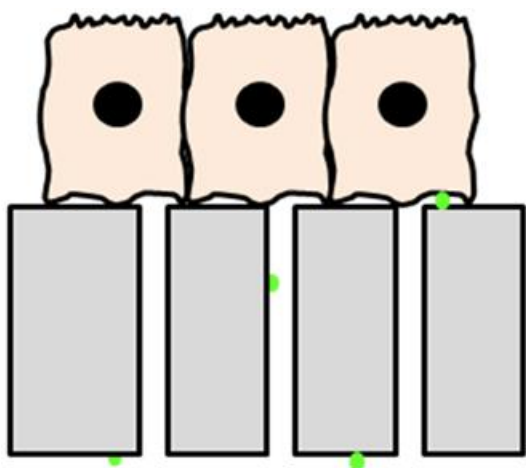


Figure 8: Transported nanoparticles might adhere to the surface of the filter membrane and the inner pore surface.

Moreover, it can be assumed that a gradient of transported analyte will build up inside the filter pores due to a decelerated diffusive transport within the filter.

In view of these potential drawbacks of currently available systems, an investigation of alternative filter materials as growth supports for permeation studies seems expedient. Metal grids could prove valuable for this purpose, since their mesh structure is highly regular and they are available in large quantities at a reasonable cost. In this study, a metal grid made from stainless steel with a mesh width of 25 μm was investigated regarding its suitability as a growth support for epithelial cell layers. The grid is characterized by a free filtration area of 25 % being almost twice that of 3 μm TL filters which are the commercially available membranes with the highest porosity. Concurrently, the grid's inner surface area is rather low resulting in a comparably high filter quotient of 0.08 which might prove beneficial for permeation studies with small molecules and nanoparticles. As indicated in Figure 2, Caco-2 cells can be cultivated on these metal grids. This is remarkable, since single cells with a mean diameter of about 18 μm would be expected to pass through the pores. However, by not adding cell culture medium to the basolateral compartment for the first hours of cultivation, the cells could be deposited at or near the wires. Upon adhesion Caco-2 cells proliferated to form a confluent layer with intercellular connections as indicated by staining of the tight-junction associated protein ZO-1 (Figure 2, A). Furthermore, the cell layers on the grids were characterized by transepithelial electrical resistances ($\sim 480 \Omega \text{ cm}^2$) similar to cell layers cultivated on filter membranes. Collectively, these results underline that the cell layers on metal grids achieve a level of tightness which is comparable to that of cell layers grown on filter membranes.

In order to compare the effect of the growth support on nanoparticle permeation across a Caco-2 layer, transport studies with 200 nm fluorescent polystyrene nanoparticles were performed. As indicated by stability studies, the nanoparticles were stable for at least 24 h in RPMI cell culture medium supplemented with

1 % poloxamer 188 which was utilized as transport medium (Table 1). When these particles were incubated with Caco-2 monolayers grown in microplates, a time dependent increase of the cell-associated fluorescence was observed indicating particle binding (Figure 3). These results were corroborated by fluorescence microscopic images of a Caco-2 monolayer cultivated on a filter membrane and incubated with nanoparticle suspension at the apical side. As illustrated in Figure 7, the apical face of the cell layer is covered with green dots representing cell-associated nanoparticles. Accordingly, nanoparticle binding and potentially internalization occur which are the main prerequisites for transcytosis. This confirms the work by Behrens et al. who have reported about binding and uptake of 200 nm fluorescent polystyrene nanoparticles into Caco-2 monolayers (Behrens et al., 2002). Uptake of 200 nm polystyrene nanoparticles into Caco-2 cells has also been described by Garinot et al. (Garinot et al., 2007).

To date, nanoparticle transport studies were performed with Caco-2 cells cultivated on filters with 3 μm (des Rieux et al., 2007, Garinot et al., 2007 and Desai et al., 1997) and 0.4 μm pore size (Russel-Jones et al., 1999, Cartiera et al., 2009, and Behrens et al., 2002). However, no systematic study of the dependence of the growth support's porosity and pore size on the nanoparticle transport rate has been conducted. In the present work nanoparticle permeation rates through Caco-2 layers cultivated on a metal grid and on filter membranes with different pore sizes (0.4 μm , 1 μm and 3 μm) and pore densities were determined over a period of 24 h. Since uptake of particulate material into cells has been found to be temperature dependent (des Rieux et al., 2005, Florence et al., 2001), all experiments were performed at 37°C. The nanoparticles used in this study were labelled with a fluorescent dye. Thus, their concentration in the basolateral compartment could be determined indirectly via fluorimetry. Aside from flow cytometry (des Rieux et al., 2005 and 2007 and Garinot et al., 2007) whose usability for the detection of nanoparticles is limited, fluorimetry has been the standard method

for the detection of transported particles (Desai et al., 1997, Russel-Jones et al., 1999, Behrens et al., 2002 and Gaumet et al., 2009).

Generally, the transport rates observed with cell layers cultivated on filter membranes were low. Importantly, it was found that the determined fluorescence intensity of the acceptor medium is not a reliable measure for the nanoparticle transport. According to the results presented, a direct conversion of basolateral fluorescence intensity to nanoparticle number is not possible. Obviously fluorescent marker molecules are released from the nanoparticles in course of the experiment, permeate through the cells and diffuse to the basolateral compartment. This was proven by centrifugation experiments which can be used to discriminate between released fluorophore and fluorescent nanoparticles (Figure 6). According to these experiments, over 24 h no nanoparticle transport was observed for filter membranes with pore size $<3\ \mu\text{m}$. Probably, diffusion of a transcytosed 200 nm particle through a 400 nm or 1000 nm pore is hindered considerably by steric constraints. In addition to the pore size the pore per cell ratio will influence nanoparticle transport. Statistically, every cell will have access to 78 pores ($0.4\ \mu\text{m}$ TL), 1.6 pores ($0.4\ \mu\text{m}$ TP; $1\ \mu\text{m}$ TP; $3\ \mu\text{m}$ TL) and 0.5 pores ($3\ \mu\text{m}$ TP), respectively. Consequently, if a transcytosed nanoparticle has a low probability of being exocytosed in proximity to a pore that is sufficiently large for diffusion, it will unlikely reach the basolateral compartment.

For filter membranes with $3\ \mu\text{m}$ pore diameter a discrepancy between the basolateral medium's fluorescence prior to and after centrifugation was observed (Figure 6). This indicates transport of nanoparticles. At this pore size, the particle transport was dependent on the free filtration area available which correlates with the pore per cell ratio. $3\ \mu\text{m}$ TL membranes are characterized by a 3.3-fold higher free filtration area than $3\ \mu\text{m}$ TP membranes which resulted in an increased particle transport rate (Figure 6). However, even for $3\ \mu\text{m}$ TL filter membranes only about 0.1 % of the particles added to the apical compartment were detected in the basolateral medium after 24 h.

In contrast, clearly higher nanoparticle transport rates were observed for Caco-2 layers cultivated on metal grids (Figure 5). According to Table 2, 1.20×10^{10} nanoparticles had been transported to the basolateral compartment within 24 h. In contrast to the fluorescence intensities obtained for Caco-2 layers cultivated on filter membranes, the estimated nanoparticle concentrations in Figure 5 and Table 2 seem to be rather accurate. As illustrated by the results from the centrifugation experiments (Figure 6), the fluorescence intensity detected in the acceptor medium is indeed largely due to nanoparticles. Probably, the higher transport rates are a result of the larger free filtration area as compared to filter membranes. Moreover, due to the large pores of the grid, transcytosed nanoparticles will not be sterically constrained in course of diffusion to the basolateral compartment.

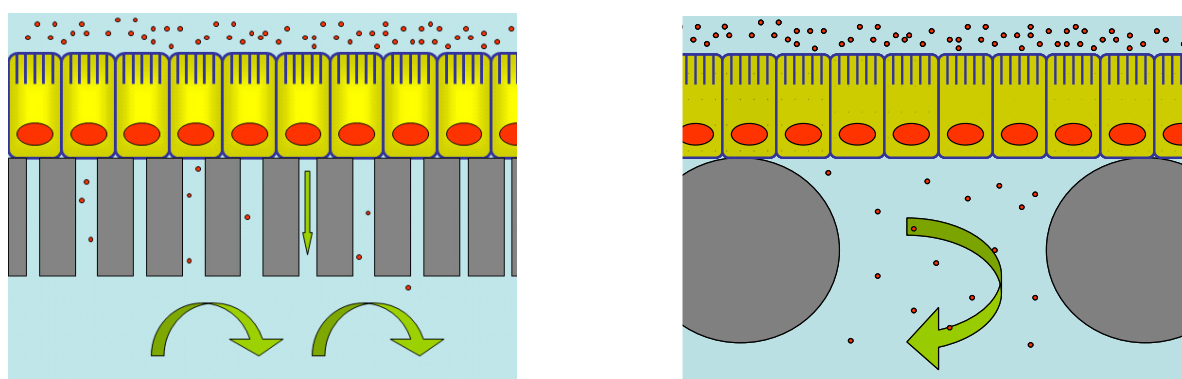


Fig. 9: Schematic illustration of transport process of analyte through cell monolayer cultivated on metal grid (right) and filter membrane (left).

4. Conclusion

The results discussed above underline that the characteristics of the filter membrane used as growth support influence the outcome of transport studies. At this, the pore diameter, the free filtration area and potentially also the surface area of the filter membrane affect analyte permeation. While no transport of 200 nm polystyrene particles across Caco-2 cell layers was observed in case of filter membranes with pore

diameters $<3\ \mu\text{m}$, small amounts of colloids were detected in the basolateral compartment when the pore diameter was $3\ \mu\text{m}$. In contrast, clearly higher nanoparticle transport rates were observed when metal grids with $25\ \mu\text{m}$ mesh width were used for cultivation of cells. These results indicate that the filter membrane indeed represents an additional barrier to analyte transport which ultimately biases the experimentally observed permeation rates. Possibly, the metal grids introduced herein or similar materials could serve as alternative growth supports which circumvent the drawbacks of currently used filter membranes.

Steric constraints due to narrow pores will affect differently sized analytes to a different extent. However, the free filtration area and surface area of the filter membrane are expected to also affect permeation of small molecules. Future studies will have to address to which extent this is the case. Finally, it has to be highlighted that indirect detection of nanoparticles via determination of the relative fluorescence intensity of the acceptor medium is not a reliable means for particle quantification. As illustrated by centrifugation experiments in the present work, fluorophore released from the nanoparticles can lead to false positive results. Generally, a standardization of the filter materials, experimental procedures as well as analytical techniques used for nanoparticle transport studies would be advantageous to improve the comparability of results between laboratories and to ultimately achieve a profound understanding of nanoparticle transcytosis.

Acknowledgements

The authors thank Mag. pharm. Dr. Liselotte Krenn from the Department of Pharmacognosy, University of Vienna for providing the ultracentrifuge.

5. References

- [1] G.J. Russel-Jones, L. Arthur, H. Walker, International Journal of Pharmaceutics, **1999**, 247-255
- [2] Robert M. Samstein, Karlo Perica, Fanor Baderrama, Michael Look, Tarek M. Fahmy, Biomaterials, **2008**, 29, 703-708
- [3] Anne des Rieux, Eva G. E. Ragnarsson, Elisabet Gulberg, Véronique Prémat, Yves-Jaques Schneider, Per Artursson, Pharmaceutical Sciences, **2005**, 25, 455-465
- [4] Marie Garinot, Virginie Fiévez, Vincent Pourcelle, François Stoffelbach, Anne des Rieux, Laurence Plapied, Ivan Theate, Hélène Freichels, Chrinstine Jérôme, Jacqueline Marchand-Brynaert, Yves-Jaques Schneider, Véronique Prémat, Journal of Controlled Release, **2007**, 120, 195-204
- [5] Malgorzata S. Cartiera, Katherine M. Johnson, Vanathy Rajendran, Michael J. Caplan, W. Mark Saltzman, Biomaterials, **2009**, 30, 2790-2798
- [6] Anne des Rieux, Viginie Fievez, Ivan Théate, Jan Mast, Véronique Prémat, Yves-Jaques Schneider, Pharmaceutical Sciences, **2007**, 30, 280,291
- [7] Marie Gaumet, Robert Gurny, Florence Delie, Pharmaceutical Sciences, **2007**, 36, 465-473
- [8] Manisha P. Desai, Vinod Labhasetwar, Elke Walter, Robert J. Levy, Gordon L. Amidon, Pharmaceutical Research, **1997**, 14, 11
- [9] Isabel Behrens, Ana Isabel Vila Pena, Maria José Alonso, Thomas Kissel, Pharmaceutical Research, **2002**, 19, 8
- [10] Alexander T. Florence, Nasir Hussain, Advanced Drug Delivery Reviews, **2001**, 50, S69-S89
- [11] Anne des Rieux, Virginie Fievez, Marie Garinot, Yves-Jaques Schneider, Véronique Prémat, Journal of Controlled Release, **2006**, 116, 1-27

- [12] Brice Moulari, David Pertuit, Yann Pellequer, Alf Lamprecht, Biomaterials, **2008**, 29, 4554-4560
- [13] Alexander T. Florence, Drug Discovery Today, **2005**, 2, 75-81
- [14] IJ Hidalgo, TJ Raub, RT Borchardt, Gastroenterology, **1989**, 96, 736-749
- [15] S Miret, L Abrahamse, EM de Groene, Journal of Biomol Screen, **2004**, 9, 598-606

ANHANG B

Untersuchung der Stabilität von Nanopartikeln in unterschiedlichen Dispersionsmedien: Fluoresbrite™ Carboxylate YG Nanopartikel mit Durchmessern von 0,2 µm bzw. 0,1 µm wurden in verschiedenen Medien (RPMI-1640, RPMI-1640 + 0,1 % Poloxamer 188 und RPMI-1640 + 1 % Poloxamer 188) 24 h lang unter Bewegung inkubiert. Nach 2, 4, 6, 9 und 24 h wurden die mittlere Partikelgröße mittels dynamischer Lichtstreuung (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) sowie die relative Fluoreszenzintensität der Partikelsuspension bestimmt (Tecan Infinite M200 i, Tecan, Österreich).

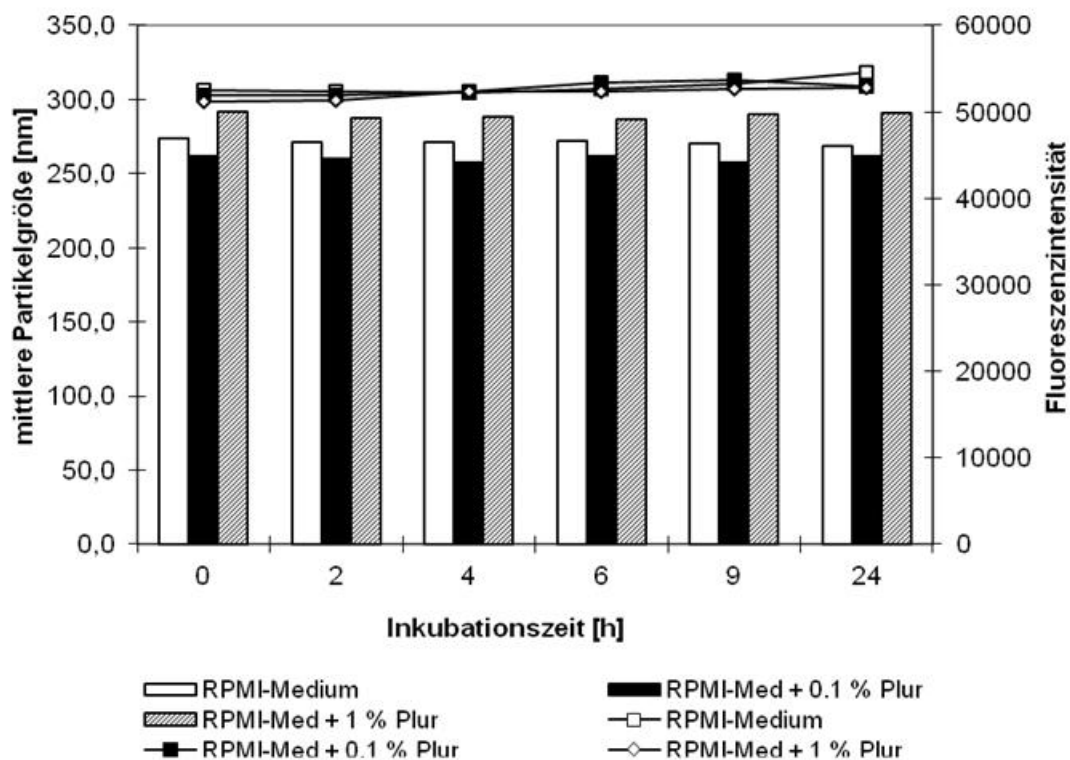


Abbildung 1: Mittlere Partikelgröße und relative Fluoreszenzintensität einer Suspension von Polystyrolnanopartikeln (0,2 µm, carboxyliert) in RPMI-1640 Zellkulturmedium, das unterschiedliche Mengen an Poloxamer 188 enthält, während Inkubation über 24 h bei 37°C.

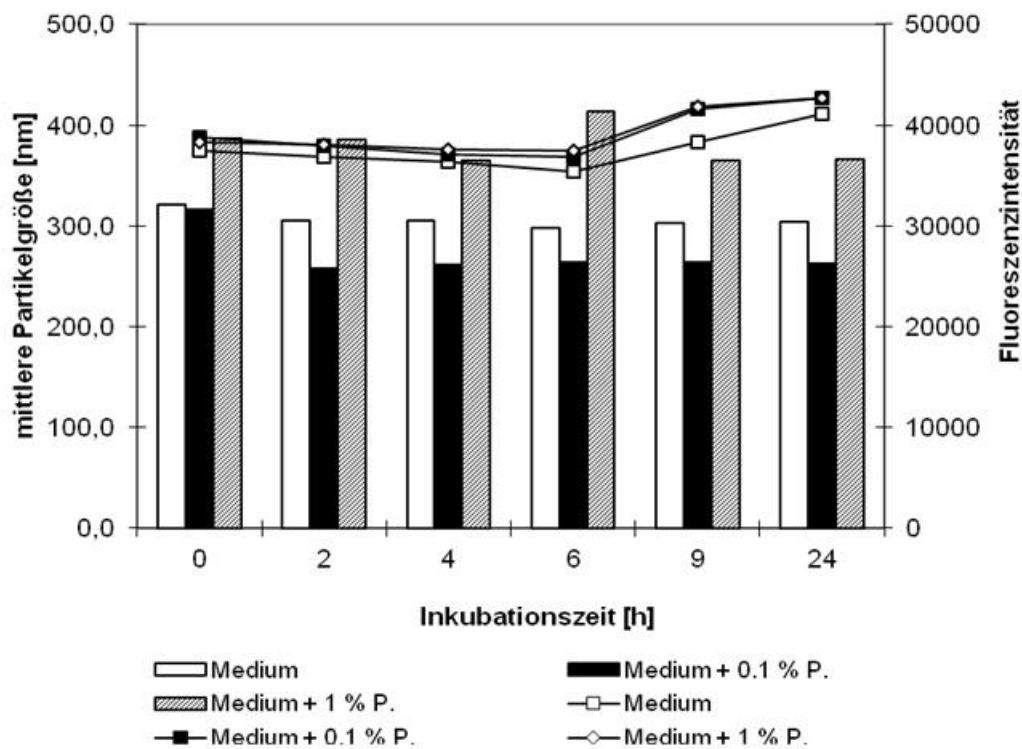


Abbildung 2: Mittlere Partikelgröße und relative Fluoreszenzintensität einer Suspension von Polystyrolnanopartikeln (0,2 μm , unmodifiziert) in RPMI-1640 Zellkulturmedium, das unterschiedliche Mengen an Poloxamer 188 enthält, während Inkubation über 24 h bei 37°C.

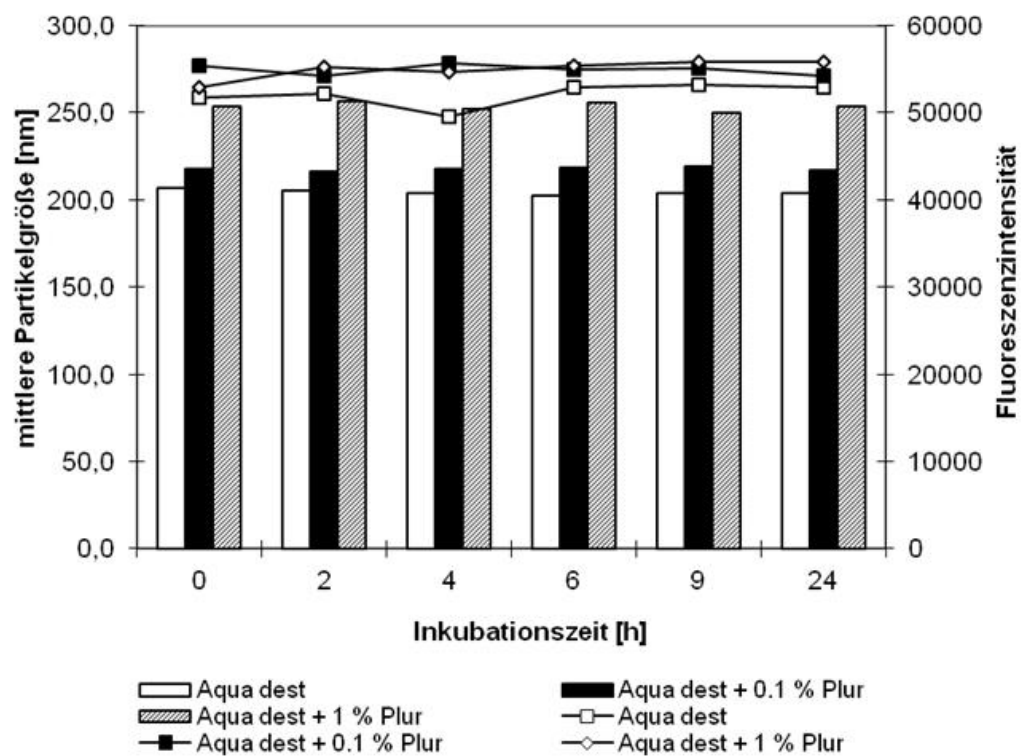


Abbildung 3: Mittlere Partikelgröße und relative Fluoreszenzintensität einer Suspension von Polystyrolnanopartikeln (0,2 μm , carboxyliert) in destilliertem Wasser, das unterschiedliche Mengen an Poloxamer 188 enthält, während Inkubation über 24 h bei 37°C.

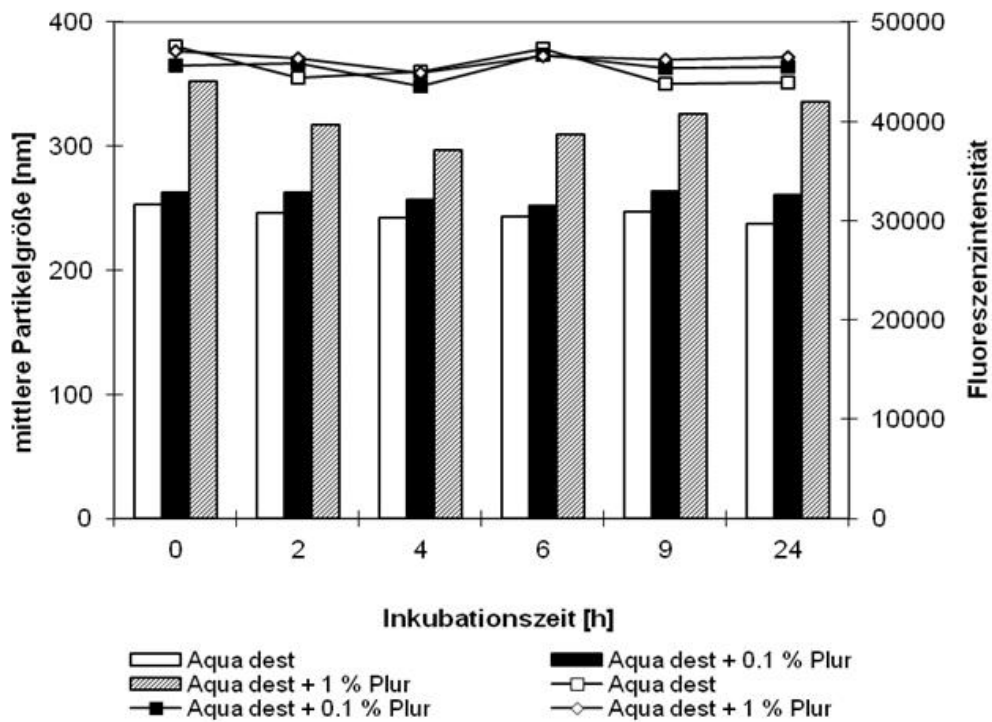


Abbildung 4: Mittlere Partikelgröße und relative Fluoreszenzintensität einer Suspension von Polystyrolnanopartikeln (0,2 µm, unmodifiziert) in destilliertem Wasser, das unterschiedliche Mengen an Poloxamer 188 enthält, während Inkubation über 24 h bei 37°C.

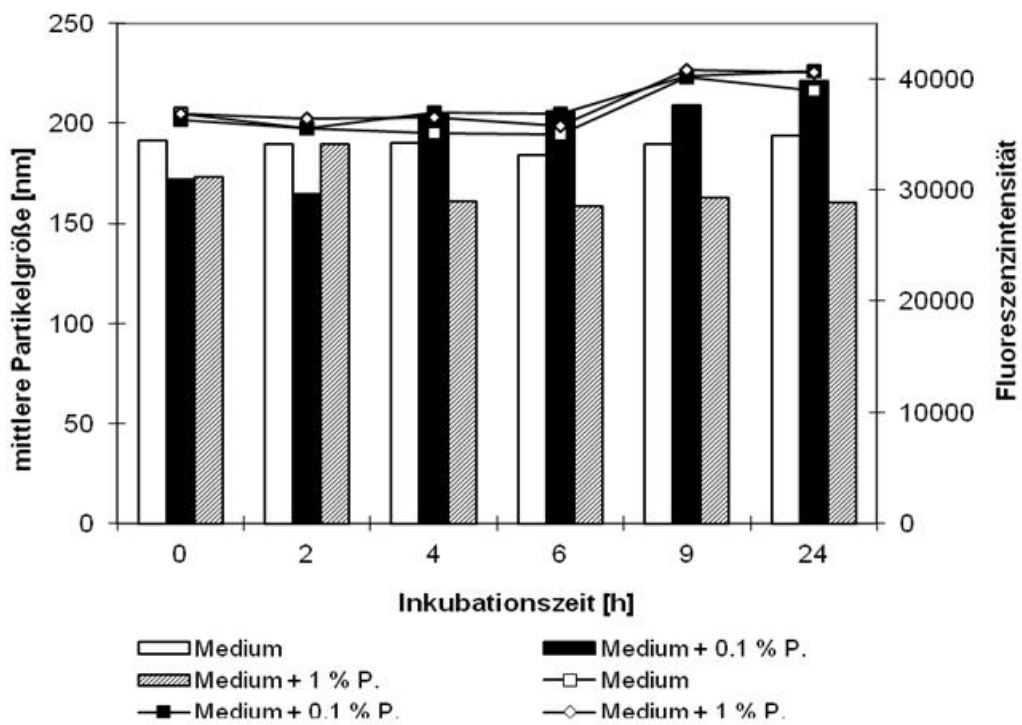


Abbildung 5: Mittlere Partikelgröße und relative Fluoreszenzintensität einer Suspension von Polystyrolnanopartikeln (0,1 µm, carboxyliert) in RPMI-1640 Zellkulturmedium, das unterschiedliche Mengen an Poloxamer 188 enthält, während Inkubation über 24 h bei 37°C.

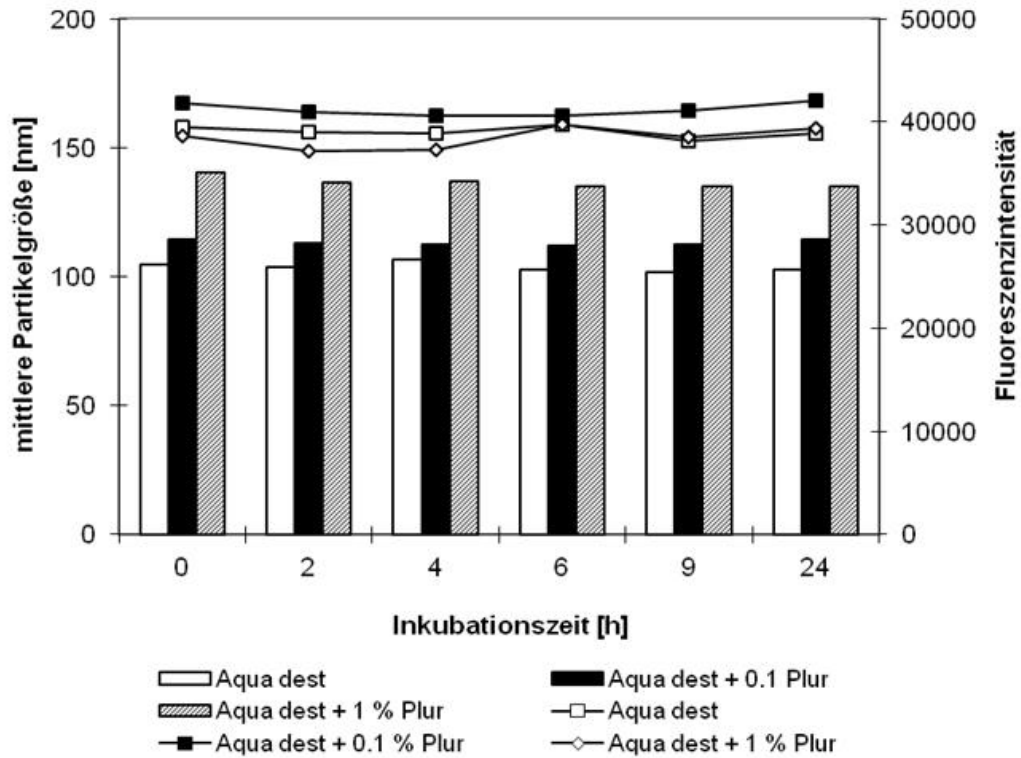


Abbildung 6: Mittlere Partikelgröße und relative Fluoreszenzintensität einer Suspension von Polystyrolnanopartikeln (0.1 μm , carboxyliert) in destilliertem Wasser, das unterschiedliche Mengen an Poloxamer 188 enthält, während Inkubation über 24 h bei 37°C.

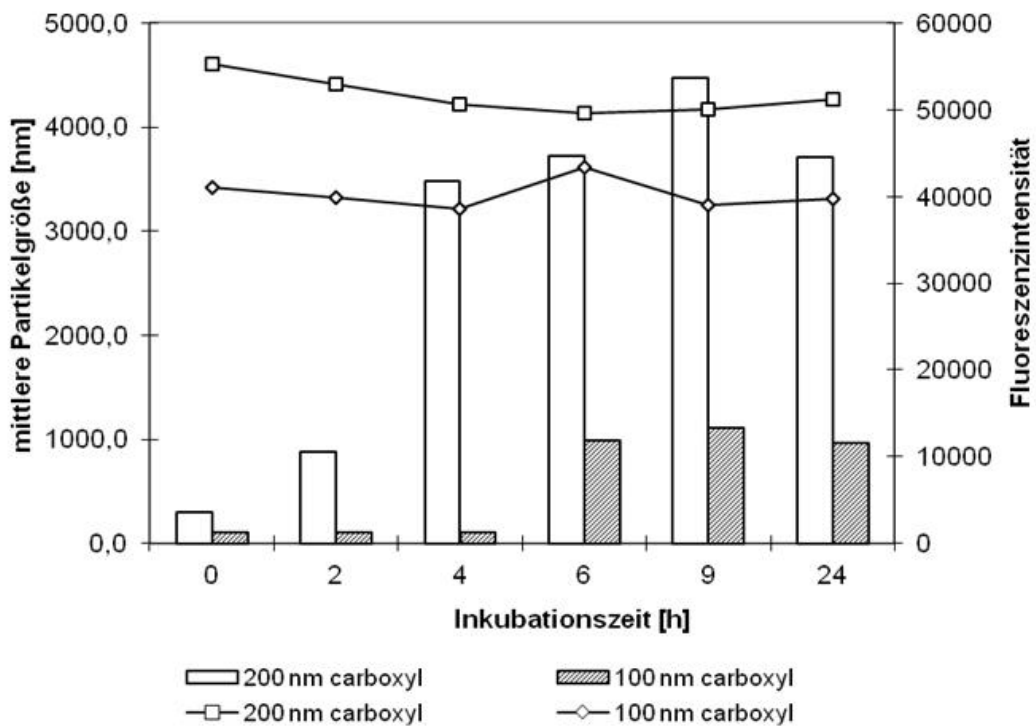


Abbildung 7: Mittlere Partikelgröße und relative Fluoreszenzintensität einer Suspension von Polystyrolnanopartikeln (0.2 μm beziehungsweise 0.1 μm , carboxyliert) in Hank's gepufferter Salzlösung (HBSS) während Inkubation über 24 h bei 37°C.

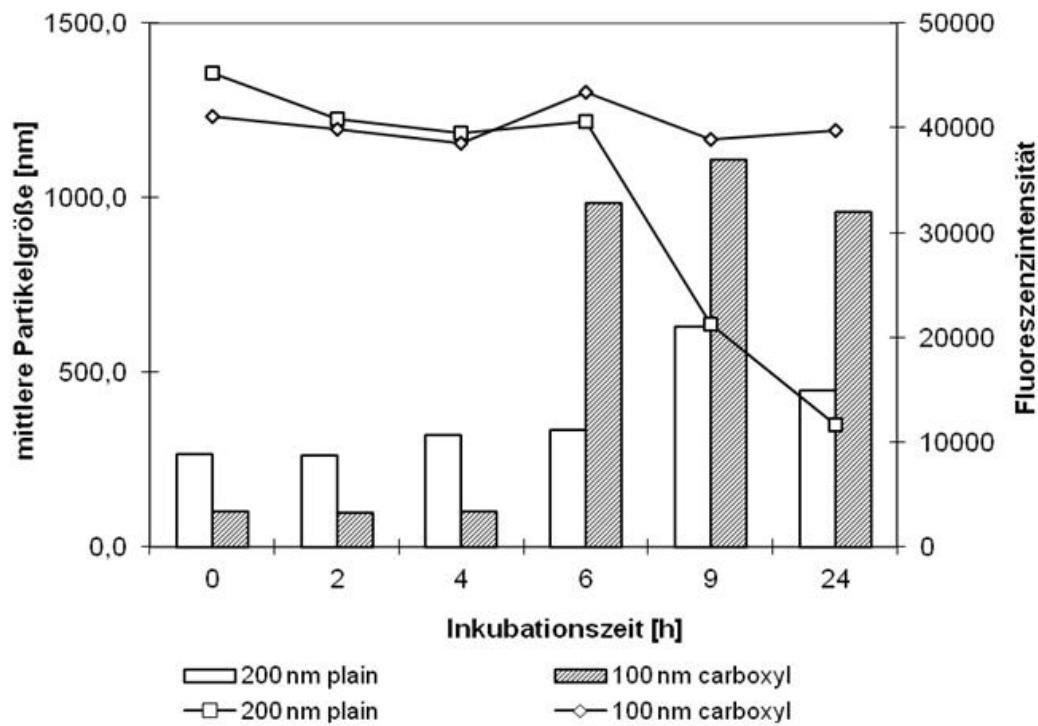


Abbildung 8: Mittlere Partikelgröße und relative Fluoreszenzintensität einer Suspension von Polystyrolnanopartikeln (0.2 μm unmodifiziert; 0.1 μm carboxyliert) in Hank's gepufferter Salzlösung (HBSS) während Inkubation über 24 h bei 37°C.

Partikeltransport. Ergänzend zu den im Hauptteil der Diplomarbeit diskutierten Permeationsstudien mit 0.2 μm Partikeln wurde auch der Transport von 0.1 μm Nanopartikeln sowohl bei 4°C als auch bei 37°C untersucht.

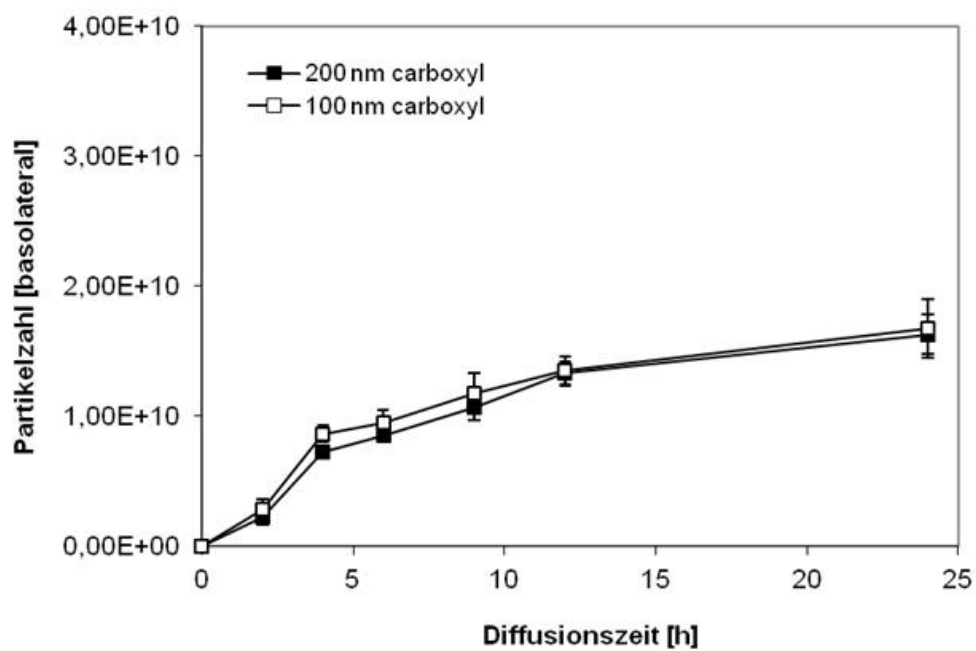


Abbildung 9: Basolaterale Konzentration von carboxylierten Polystyrolnanopartikeln während eines Transportversuch über 24 h bei 4 °C; Caco-2 Zelllayer angezüchtet auf Metallgittern (25 µm Maschenweite) .

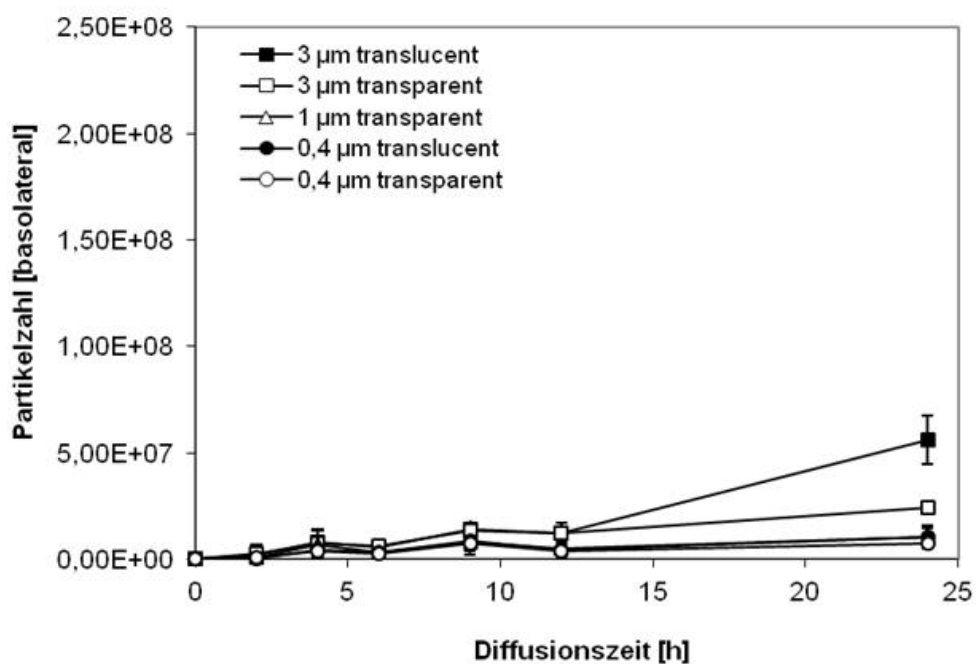


Abbildung 10: Basolaterale Konzentration von carboxylierten Polystyrolnanopartikeln (0.2 µm) während eines Transportversuch über 24 h bei 4 °C; Caco-2 Zelllayer angezüchtet auf Filtermembranen

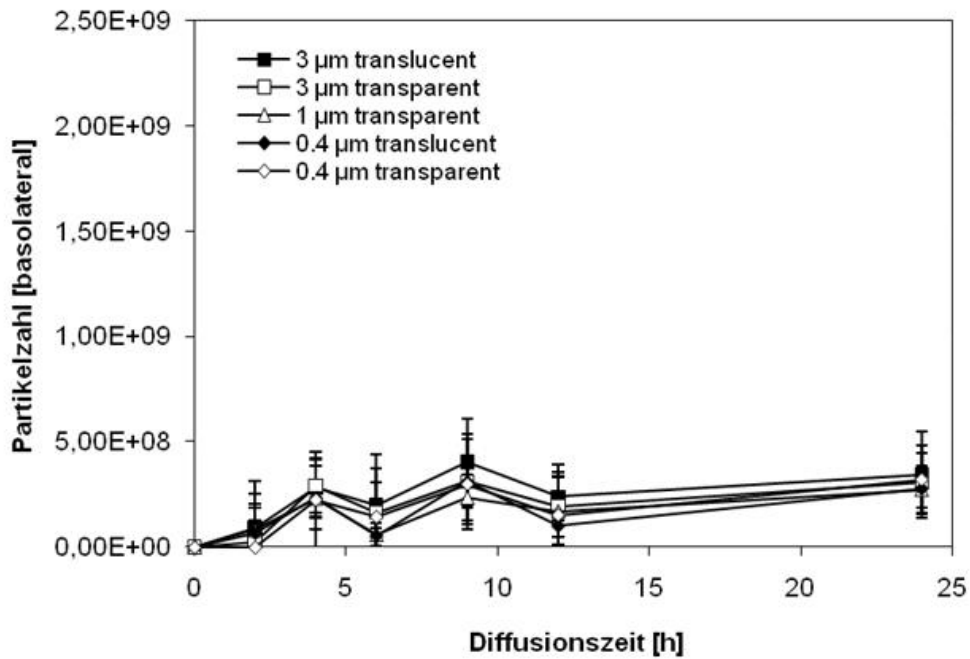


Abbildung 11: Basolaterale Konzentration von carboxylierten Polystyrolnanopartikeln (0.1 µm) während eines Transportversuch über 24 h bei 4 °C; Caco-2 Zelllayer angezüchtet auf Filtermembranen

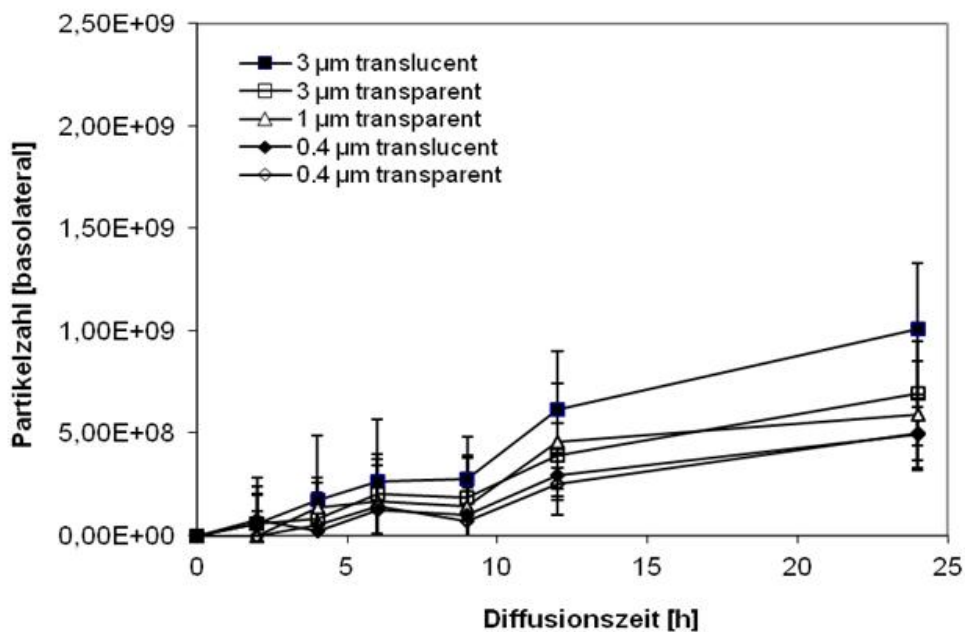


Abbildung 12: Basolaterale Konzentration von carboxylierten Polystyrolnanopartikeln (0.1 µm) während eines Transportversuch über 24 h bei 37 °C; Caco-2 Zelllayer angezüchtet auf Filtermembranen

Diskriminierung zwischen partikulärer und freier Fluoreszenz. Um zu überprüfen, ob die im basolateralen Kompartiment detektierte mittlere Fluoreszenzintensität tatsächlich auf partikulärer Fluoreszenz basiert, wurden Zentrifugationsversuche durchgeführt. Nach Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität des Akzeptormediums wurde selbiges in Ultrazentrifugationsgefäße überführt und bei 60000 U/min 15 min lang zentrifugiert. Anschließend wurde die mittlere Fluoreszenzintensität des Überstands analysiert (Tecan Infinite M200 i, Tecan, Österreich). Anhand der Abnahme der gemessenen Fluoreszenzwerte nach Zentrifugation kann der partikuläre Fluoreszenzanteil abgeschätzt werden.

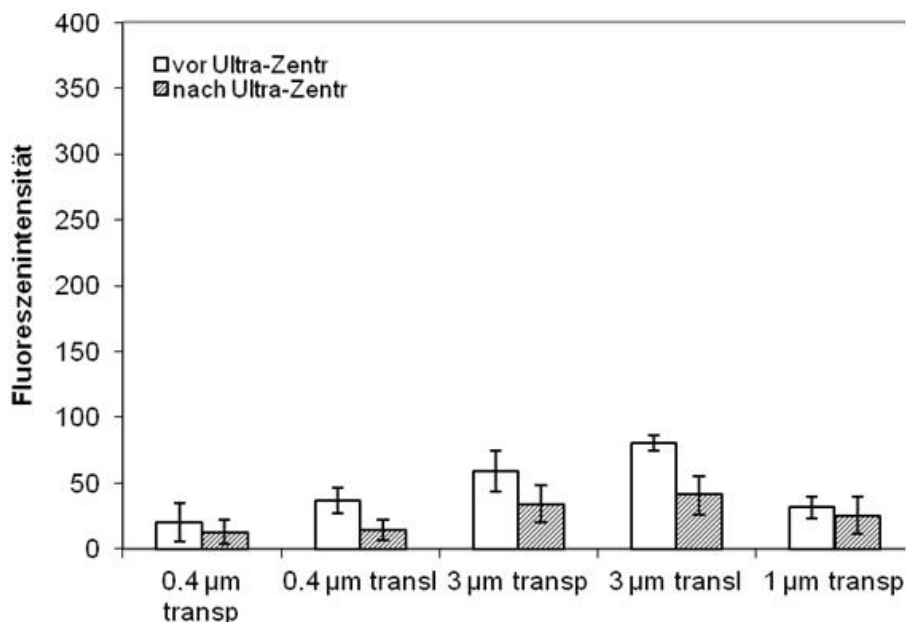


Abbildung 13: Fluoreszenzintensitäten des Akzeptormediums von Partikeltransportversuchen (4°C, 0.2 µm carboxyliert) über Caco-2 Zelllayer angezüchtet auf Filtermembranen vor und nach Ultrazentrifugation.

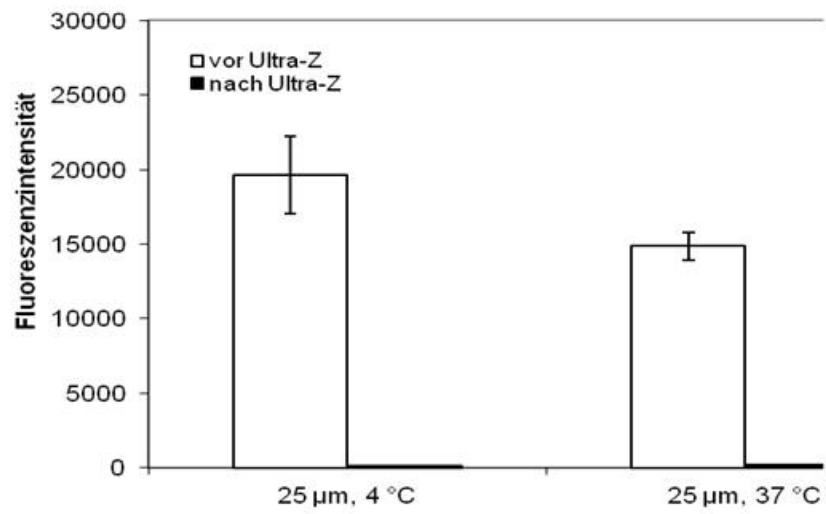


Abbildung 14: Fluoreszenzintensitäten des Akzeptormediums von Partikeltransportversuchen (4°C bzw. 37°C; 0.2 µm Carboxyliert) über Caco-2 Zelloberflächen angezüchtet auf Metallgittern (25 µm Maschenweite) vor und nach Ultrazentrifugation

Curriculum Vitae



Persönliche Daten

Name:	Dietmar Emanuel Pixner
Geburtsdatum:	03.07.1979
Geburtsort:	Ried im Innkreis
Eltern:	Dietmar Pixner, Orthopädietechnik-Meister und Bandagist Brigitte Pixner, kaufmännische Angestellte
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Ausbildung

09/1985 – 06/1989	Volksschule Ohlsdorf
09/1989 – 06/1993	Hauptschule Ohlsdorf
09/1993 – 06/1996	Bundeshandelsschule Gmunden
03/2000 – 06/2002	Berufsreifeprüfung des Berufsförderungsinstitut OÖ
10/2002 – 06/2010	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
03/1998 – 10/1998	Präsenzdienst in der Trollmannkaserne Steyr

Berufliche Tätigkeit

09/1996 – 06/1997	Synchro-Med Ges.m.b.H., Linz
11/1997 – 02/1998	Pixner & Co. Ges.m.b.H., Ohlsdorf
11/1998 – 02/1999	Pixner & Co. Ges.m.b.H., Ohlsdorf
04/1999 – 08/2002	Rottner Tresor Ges.m.b.H., St. Georgen im Attergau

Universitäre Tätigkeit

WS 08 / SS 09	Tutorium der Lehrveranstaltung: Grundpraktikum aus Pharmazeutischer Technologie
---------------	--