



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Zielgerichtete Arzneiformen bei Entzündungen:
Entwicklung eines ex-vivo Modells und wirkstoffhaltiger
Mikropartikel

Verfasserin

Stephanie Deinhammer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

DANKSAGUNG

Als erstes gilt mein Dank Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth, der mein Interesse für die praktische Arbeit zur Diplomarbeit am Institut für pharmazeutische Technologie geweckt hat. Ich möchte mich bei ihm und Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Möglichkeit bedanken, Teil ihrer Arbeitsgruppe gewesen zu sein und für ihre wissenschaftliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Mag. Xueyan Wang, die mir während meiner ganzen Diplomarbeit mit Rat und Tat zu Seite gestanden ist.

Weiters möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe für die ausgesprochen herzliche, humorvolle und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, besonders aber bei meinen zwei Kommilitoninnen und Freundinnen Ingrid Kaniak und Eva-Maria Wirth, die mich die gesamte Zeit über begleitet haben.

Schlussendlich bin ich auch meiner Familie und meinen Freunden zu großem Dank verpflichtet, denn nur durch ihre Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit konnte ich diese mit Erfolg bestehen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
2	GRUNDLAGEN	9
2.1	Endothelzellen	9
2.2	Poly (D,L-laktid-co-glykolid)	10
2.3	Drug Targeting	12
2.3.1	E-Selectin Targeting	13
2.3.2	Die Carbodiimidmethode	14
3	MATERIALIEN UND METHODEN.....	16
3.1	Materialien.....	16
3.2	Methoden	18
3.2.1	Zellkultur.....	18
3.2.1.1	Allgemeine Methoden	18
3.2.1.2	Entzündung der Endothelzellen.....	20
3.2.1.3	Färbung der Endothelzellen.....	21
3.2.2	Biotinylierung von Sialy Lewis X	22
3.2.3	Flowcytometrie.....	24
3.2.4	PLGA-Mikropartikel	25
3.2.4.1	Herstellung von Mikropartikeln.....	25
3.2.4.2	Charakterisierung von Mikropartikeln.....	26
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	30
4.1	Endothelzellen	30
4.1.1.	Charakterisierung und Kultivierung.....	30
4.1.2	Entzündung von Endothelzellen.....	32
4.1.3	Bindung von biotinyliertem Sialy Lewis X an Endothelzellen.....	41
4.2	Herstellung von TAAc-hältigen PLGA-Mikropartikeln	50
4.2.1	Variation der Herstellungsparameter	50
4.2.2	Variation des PLGA/TAAc Verhältnisses.....	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	57
5.1	Deutsch	57
5.2	Englisch	59

6	ANHANG A.....	61
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	65
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	66
9	CURRICULUM VITAE	68

1 EINLEITUNG

Die Entwicklung zielgerichteter Arzneiformen speziell durch Verwendung von oberflächenmodifizierten Nano- oder Mikropartikel, die aus dem biokompatiblen und bioabbaubaren Copolymer PLGA hergestellt werden, gewinnt immer mehr an Bedeutung. Arzneistoffe, die in diese Partikel eingebaut werden, können gezielt zum Wirkort transportiert und dort angereichert werden und ihre Wirkung über einen längeren Zeitraum entfalten [1-3].

Ein Teil dieser Arbeit war es, ebensolche PLGA-Mikropartikel herzustellen und den Wirkstoff Triamcinolonacetonid (TAAc) einzubauen. TAAc ist ein entzündungshemmender, immunsuppressiver Wirkstoff und gehört zur Gruppe der Glukokortikoide. Er wird sowohl topisch als auch parenteral zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen, bei akuten Schüben von degenerativen Gelenkerkrankungen, allergischen Reaktionen, Autoimmunerkrankungen und anderen entzündlichen Erkrankungen verwendet [4,5]. Die Idee bestand darin, dass sich entsprechend oberflächenmodifizierte PLGA-TAAc Mikropartikel nach i.v. Applikation im entzündeten Gewebe selektiv anreichern können und der Wirkstoff dort gezielt freigesetzt werden kann. So könnten die Wirkung erhöht und Nebenwirkungen verringert werden. Eine entscheidende Rolle bei der Verwendung von Mikropartikeln im Blutsystem spielt dabei ihre Größe. Deshalb sollten Mikropartikel mit ungefähr 2 μm Durchmesser hergestellt werden, um sie für das Blutsystem praktikabel zu machen. Neben der Größe als Charakteristikum wurden auch die Oberfläche der Mikropartikel und die Einbaurrate des Arzneistoffes bestimmt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde Augenmerk auf humane Endothelzellkultur gelegt, in denen mit TNF- α eine Entzündung hervorgerufen wurde. Die Stärke dieser induzierten Entzündung konnte anhand der Bindung eines fluoreszenzmarkierten primären Antikörpers gegen E-Selectin, welcher bei Stimulierung durch Cytokine von Endothelzellen vermehrt gebildet wird, sowohl unter dem Mikroskop sichtbar gemacht als auch im Flowcytometer quantifiziert werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Eignung von Sialyl Lewis X als zielerkennende Struktur an der Partikeloberfläche untersucht, welches an das in entzündetem Gewebe vermehrt exprimierte E-Selectin binden soll. Anhand von biontyliertem Sialyl Lewis X

und entsprechendem Avidin-Detektionssystem wurde die Bindungskapazität der entzündeten Endothelzellen im Flowcytometer charakterisiert.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Endothelzellen

Endothelzellen kleiden Blut- und Lymphgefäße aus und erfüllen zahlreiche essentielle physiologische Aufgaben. Zum Einen sind die für die Steuerung des Stoffaustausches zwischen Blut und Gewebe, zum Anderen für die Regulation des Gefäßtonus und somit des Blutdrucks durch Synthese von Stickstoffmonoxid, Endothelin und Prostacyclin mitverantwortlich [6].

Als besonderes morphologisches Charakteristikum haben Endothelzellen glattwandige Transzytosevesikel an der Oberfläche. Außerdem befinden sich im Zytoplasma Weibel-Palade Körper, die von Willebrand-Faktor enthalten, der eine entscheidende Rolle bei der Thrombozytenaggregation und beim Wundverschluss spielt. Durch Hemmung und Aktivierung von Gerinnungsprozessen beeinflusst das Gefäßendothel die Fließeigenschaften des Blutes. Darüber hinaus spielen Endothelzellen bei der Angiogenese und bei Entzündungsprozessen eine wesentliche Rolle.

Zur in-vitro Kultivierung können sowohl primäre als auch immortalisierte Endothelzellen eingesetzt werden. Primäre Endothelzellen wie HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) werden postnatal innerhalb weniger Stunden aus der Hauptvene der Nabelschnur isoliert und können nur für eine begrenzte Zeit kultiviert werden [6]. Beispiele für immortalisierte Endothelzellen sind HUVECtert - HUVEC, die mittels humaner Telomerase Reverse Transkriptase immortalisiert wurden - oder HMEC (human dermal microvascular endothelial cells). Immortalisierte Zellen können über einen wesentlich längeren Zeitraum kultiviert werden als Primärzellen.

2.2 Poly (D,L-laktid-co-glykolid)

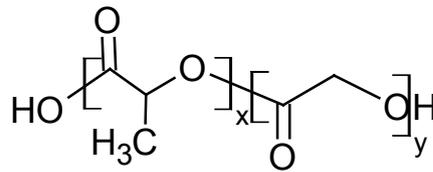


Abbildung 1: Struktur von PLGA

Poly (D,L-Milch-co-Glykolsäure) (PLGA) ist ein von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassenes, biokompatibles und bioabbaubares Copolymer, das aus Milchsäure- und Glykolsäureeinheiten besteht. Seine mechanische Festigkeit und auch die Freisetzungsrate aus der Polymermatrix werden von seinen physikochemischen Eigenschaften wie Molekulargewicht, der Größe und dem Verhältnis der Monomerenbausteine beeinflusst [7].

Die Kristallinität des PLGA-Polymers hat wiederum direkten Einfluss auf die mechanische Festigkeit, das Quellungsverhalten, die Hydrolyserate und damit auch auf die Bioabbaubarkeit. Bestimmt wird die Kristallinität durch das Molverhältnis der beiden Monomere Milchsäure und Glykolsäure in der Polymerkette. Bei äquimolaren Anteilen an Milch- und Glykolsäure wird das Polymer rascher hydrolysiert, als bei einem höheren oder niedrigeren Verhältnis von Milch- zu Glykolsäure [7, 8].

Beim biologischen Abbau zerfällt das Polymer in Milchsäure- und Glykolsäure. Dies erfolgt in drei Schritten: (1) Durch das Eindringen von Wasser quillt das Polymer und durch unspezifische Hydrolyse sinkt die mittlere Molmasse der Polymerketten. Dabei entstehen aber noch keine löslichen Abbauprodukte und die Masse der Formulierung bleibt konstant. (2) Mit fortschreitender Hydrolyse sinkt die Molmasse der Oligosaccharide, die ab einer Molmasse von 5600 Da wasserlöslich sind, sodass Massenverlust eintritt. (3) Nach vollständiger Hydrolyse liegt das Polymer gelöst in Form seiner Monomere Milchsäure und Glykolsäure vor, die endogene Stoffwechselprodukte im menschlichen Organismus darstellen [8].

PLGA ermöglicht neben dem Schutz von inkorporierten Wirkstoffen auch eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung aus Nano- oder Mikropartikeln, da die Polymerketten im Körper quellen und so zuerst die gelösten Wirkstoffmoleküle

freisetzen, die sich an und nahe der Partikeloberfläche befinden. Nach diesem sogenannten „first burst effect“ erfolgt der zweite Schritt, in dem durch unspezifische Hydrolyse wasserunlösliche Oligomere entstehen, die durch Diffusion eine weitere langsame Wirkstofffreisetzung ermöglichen. Erst in der dritten Phase erfolgt eine rasche und schließlich vollständige Freisetzung des Wirkstoffes durch Bildung wasserlöslicher Oligomere. Mikropartikel werden in Abhängigkeit von der Größe nach ca. zwei Wochen vollständig abgebaut. Dies erfolgt in vivo aber dreimal schneller als ex vivo, da Blutfette die Matrix weicher machen, wodurch Wasser schneller in die Partikel eindringen kann, aber auch durch radikalischen Abbau infolge von lokalen Entzündungen durch Fremdkörperreize oder durch Beteiligung von unspezifischen Hydrolasen. Weitere Vorteile von PLGA sind seine Sterilisierbarkeit, seine durch die mechanische Festigkeit bedingte Implantierbarkeit und seine Derivatisierbarkeit [9-12].

Beim Einsatz von PLGA-Mikropartikeln als Träger in zielgerichteten Arzneiformen ist die Wahl des Polymertyps von entscheidender Bedeutung: Bei „H-Typ“ Polymeren wird die Polymerisation von Lactid und Glykolid durch Milchsäure gestoppt und es resultiert ein Polymer mit freien Carboxylgruppen. Wird Milchsäureethylester als Kettenabbruchreagenz eingesetzt, entstehen sogenannte „end-capped“ oder „non-H-Typ“ Polymere, die Methylester darstellen. Daraus ergeben sich drei Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation: Bei H-Typ Polymeren die kovalente Bindung von biorekognitiven Einheiten an die freien Carboxylatgruppen, vorzugsweise über Carbodiimide oder die Bindung über ionische Interaktionen aufgrund der negativen Oberflächenladung der Partikel. Die dritte Variante der Oberflächenmodifikation beruht auf der inhärenten Hydrophobizität von H-Typ und non-H-Typ PLGA, die eine adsorptive Bindung von Liganden erlaubt. Dies birgt aber das Risiko einer raschen Desorption der Liganden in biologischen Flüssigkeiten, ausgelöst durch Austausch mit hydrophoben endogenen Komponenten, die durch Quellung der Partikel zusätzlich erleichtert wird [13].

2.3 Drug Targeting

Drug Targeting dient dazu, Arzneistoffe selektiv zum gewünschten Wirkort zu transportieren, wo sie sich gezielt anreichern und/oder freigesetzt werden sollen. So können sowohl die Wirkung erhöht als auch unerwünschte oder sogar toxische Nebenwirkungen gesenkt werden [1-3].

Es werden drei verschiedene Arten von Drug Targeting unterschieden, nämlich passives, aktives und physikalisches Targeting [1-3].

Passives Targeting nützt physiologische Besonderheiten des Organismus. Dabei kann in verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung und in entzündetem Gewebe der EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) ausgenutzt werden, da die Blutgefäße in pathologisch verändertem Gewebe durchlässiger sind. Somit können Wirkstoffe leichter permeieren und sich im Interstitium anreichern.

Beim aktiven Targeting wird der Arzneistoff oder Arzneistoffträger an einen Liganden gebunden, der spezifisch mit bestimmten Strukturen der Zelloberfläche interagiert, wie Rezeptoren oder Adhäsionsproteinen [1-3].

Zum physikalischen Targeting werden beispielsweise nicht geänderte pH-Werte oder erhöhte Temperaturen am gewünschten Zielort zur Wirkstofffreisetzung ausgenutzt [2, 3].

2.3.1 E-Selectin Targeting

E-Selektin gehört wie P-Selektin und L-Selektin zur Selektin Familie, sogenannten Ca-abhängigen zuckerbindenden Proteinen, die sich in ihrer Aminosäurestruktur nur in der komplementregulatorischen und zuckerbindenden Domäne unterscheiden, jedoch an unterschiedlichen Zellen vorkommen. E-Selektin ist im aktivierten Endothel erhöht, P-Selektin wird von Thrombozyten und Endothelzellen gebildet und L-Selektin wird von Leukozyten exprimiert. L- und P-Selektine sind für die Adhäsion von Leukozyten bzw. Thrombozyten am vaskulären Endothel bei Entzündung oder Gefäßschädigung verantwortlich [14].

E-Selectin, auch bekannt als CD62E, ELAM-1 oder LECAM-2 wird speziell von Endothelzellen sezerniert. Die wichtigsten Domänen der Primärstruktur von E-Selectin beinhalten eine lektinartige Domäne und eine epidermal growth factor-ähnliche Domäne. Diese beiden Domänen sind für die Aktivierung der Bindung an Leukozyten verantwortlich [14].

Endothelzellen exprimieren E-Selectin nicht konstitutiv, sondern erst nach Stimulierung durch inflammatorische Moleküle, wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Die maximale Expression wird 4 Stunden nach Zytokinstimulierung erreicht und sinkt dann beträchtlich. Dies erfolgt dadurch, dass das an der Zelloberfläche exprimierte E-Selektin durch Endozytose internalisiert und in den Lysosomen abgebaut wird. So kann nach 24 Stunden E-Selektin nicht mehr nachgewiesen werden [14].

2.3.2 Die Carbodiimidmethode

Carbodiimide werden zu den zero-length Quervernetzern gezählt. Diese Kopplungsagentien verbinden zwei Substanzen direkt miteinander, ohne zusätzliche Brückenglieder einzubringen. Carbodiimide können entweder die Bildung einer Amidbindung zwischen einer Carboxyl- und einer primären Aminogruppe oder einer Phosphoamidbindung zwischen einer organischen Phosphat- und einer primären Aminogruppe vermitteln. Deshalb sind Carbodiimide sehr effizient zur Bildung einer Bindung zwischen zwei Proteinen, zwischen einem Protein und einem Peptid, zwischen einem Oligonukleotid und einem Protein, aber auch zwischen einem Biomolekül und der Oberfläche eines Partikels [15].

In dieser Arbeit wird das wasserlösliche 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDAC) (Abbildung 2) eingesetzt, das nach dem Lösen rasch verwendet werden sollte, um einen größeren Verlust der Reaktivität zu vermeiden [15].

Carboxylgruppen reagieren mit N-substituierten Carbodiimiden und bilden ein hochaktives O-Acylisoharnstoff Zwischenprodukt, das mit einem Nukleophil, wie einer primären Aminogruppe, reagieren kann, um eine stabile Amidbindung zu bilden [15].

Um die Stabilität des aktiven Zwischenprodukts (O-Acylisoharnstoff) zu erhöhen, das im wässrigen Milieu rasch hydrolysiert wird, wird N-Hydroxysuccinimid (NHS) oder N-Hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS) der Reaktionsmischung zugesetzt. Die Hydroxylgruppe von NHS oder sulfo-NHS reagiert mit dem instabilen aktiven Ester unter Bildung eines NHS-Esters als Zwischenprodukt, der eine verlängerte Halbwertszeit von mehreren Stunden aufweist.

Die Kopplungsreaktion selbst erfolgt in zwei Schritten: Zunächst werden durch die Zugabe von EDAC/NHS die Carboxylgruppen aktiviert, wobei ein pH-Wert zwischen 4,5 und 7,5 vorliegen sollte. Nach dem Entfernen der überschüssigen Kopplungsreagenzien durch Waschen, wird die Aminkomponente zugesetzt. Zum Erzielen optimaler Kopplungsraten mit dem aktiven Ester, sollte der pH-Wert im basischen Bereich liegen. Durch diesen Zweischrittmechanismus wird die Homopolymerbildung aus Proteinen weitgehend vermieden. Außerdem verbessert NHS auch die Effizienz der Reaktion [15]. (Abb. 3)

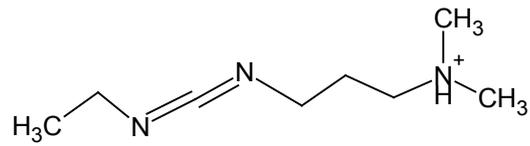


Abbildung 2: Struktur von EDAC

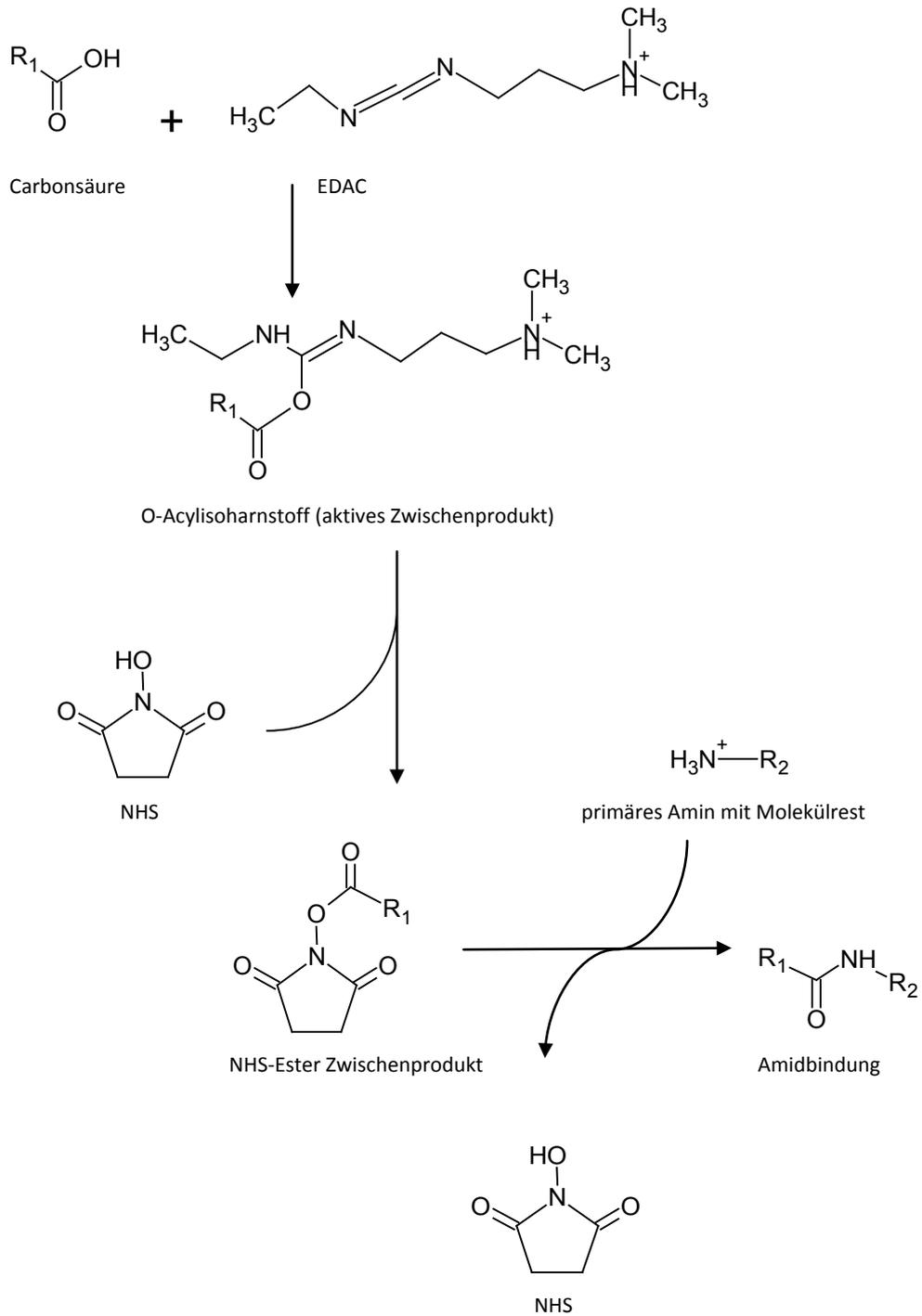


Abbildung 3: Reaktionsschema der Carbodiimidmethode unter Verwendung von EDAC und NHS [15].

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

Zellkultur:

-) HUVEC (primary human umbilical vein endothelial cells)
-) HUVEctert (mit humaner Telomerase Reverse Transkriptase [hTERT] immortalisierte HUVEC)
-) HMEC (human dermal microvascular endothelial cells, immortalisiert)
-) EGM-2 Kit (Lonza Inc., New Jersey, USA) bestehend aus 500ml EGM-2 Basismedium, 10 ml fetalem Rinderserum (FBS), 0,2 ml Hydrocortison, 2 ml humanem FGF-B, 0,5 ml VEGF, 0,5 ml R3-IGF-1, 0,5 ml Ascorbinsäure, 0,5 ml hEGF, 0,5 ml GA-1000 und 0,5 ml Heparin.

Alle Komponenten werden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut bzw. erwärmt und unter keimarmen Bedingungen dem EGM-2 Basismedium zugegeben und gut resuspendiert.

-) EndoPrime Kit (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) bestehend aus 500 ml EndoPrime Basismedium, 5 ml EndoPrime Supplement (x100), 1 ml EndoPrime EGF (2,5 µg/ml), 1 ml EndoPrime VEGF (250 ng/ml) und 25 ml EndoPrime FBS.

Alle Komponenten werden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut bzw. erwärmt und unter keimarmen Bedingungen dem EndoPrime Basismedium zugegeben und gut resuspendiert.

-) M199 (Bio Whittaker® Medium 199, Lonza Inc., New Jersey, USA) bestehend aus 500 ml M199 Basismedium, 100 ml FBS (hitzeinaktiviert), 5ml L-Glutamin-Lösung (146,1 mg in 5 ml Aqua bidest.), 5 ml Pen/Strep/Amphotericin B, 3 ml Heparin-Lösung (17 mg in 3 ml Aqua bidest.), 2ml ECGS (2 Fläschchen ECGS in jeweils 1 ml Aqua bidest. lösen).

Alle Bestandteile werden in einem Becherglas unter Rühren gemischt und das Medium im Laminar Air Flow sterilfiltriert.

-) Fibronectin: Das Fläschchen mit 5 mg Fibronectin 30 Minuten im Laminar Air Flow auftauen lassen, 5 ml filtriertes Zellkulturwasser zusetzen und eine Stunde im Laminar Air Flow stehen lassen. Erst nach dem Lösen gut resuspendieren und entweder Aliquote von jeweils 1 ml in Kryo-Röhrchen füllen und bei -20°C einfrieren (1 mg

Fibronektin/ml) oder 1 ml mit 9 ml PBS-Puffer ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ verdünnen (100 μg Fibronektin/ml).

-) Affixene[®] (1 mg/ml Stammlösung, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), verdünnt auf 0,5 mg/ml mit Aqua bidest.

-) Hoechst 33342 (Invitrogen Corp., California, USA)

-) Rekombinanter humaner TNF-alpha (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA)

-) Maus anti-human CD62E (E-selectin) FITC (Mouse IgG₁), (SouthernBiotech, Birmingham, USA)

-) VE-cadherin antibody (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C-19 sc-6458 goat polyclonal IgG), (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

-) Rhodamin rabbit-anti goat (RbpAP to goat IgG Rhodamine, 2 mg/ml), (ab6739, Abcam[®] pic., Cambridge, UK)

Mikropartikel:

-) Resomer[®] RG 503H (PLGA, Poly (D,L-laktid-co-glykolid); Laktid/Glykolid Verhältnis 50:50; Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland)

-) PVA 40-88 (Polyvinylalkohol 40-88; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

-) BODIPY (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene; Invitrogen Corp., California, USA)

-) TAAc (Triamcinolonacetonid; Fagron GmbH & Co KG, Barsbüttel, Deutschland)

Kopplung:

-) EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid HCl; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

-) NHS (N-Hydroxysuccinimid; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

-) (+)-Biotin-hydrazid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

-) Glycin (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

-) 3'-Sialyl-L-Lewis X (Carbosynth Limited, Compton, UK)

-) FITC-Avidin (from egg white) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Alle anderen eingesetzten Reagenzien sind von analytischer Reinheit.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Allgemeine Methoden

Subkultivierung von Endothelzellen: Wenn in einer Zellkulturflasche mehr als 80% der Bodenfläche von Zellen bedeckt ist, werden die Zellen „gespalten“ und weiterkultiviert. Da Endothelzellen eine modifizierte Wachstumsoberfläche benötigen, werden vor ihrer Kultivierung die Zellkulturflaschen vor Aussaat der Zellen mit 6 ml einer sterilen 1%igen Gelatinelösung in Aqua bidest. für 30 Minuten im Laminar Air Flow (LAF) beschichtet und danach abgesaugt.

Zuerst wird aus den Flaschen mit den adhären Zellen das Medium abgesaugt und dann wird zweimal mit jeweils 2 ml PBS-Puffer die Zelloberfläche gespült. Nach dem Absaugen von PBS-Puffer werden 2 ml Trypsin-EDTA (0,25%) vorsichtig in eine Ecke der Kulturflasche pipettiert, möglichst ohne den Zellrasen mit dieser Lösung in Berührung zu bringen. Die Kulturflasche wird verschraubt und unter dem entsprechend eingestellten Mikroskop die Trypsin-EDTA Lösung vorsichtig über den Zellrasen bewegt und die rasche Ablösung der Endothelzellen von der Oberfläche beobachtet. Sobald sich ungefähr 80-90% der länglichen Endothelzellen an der Oberfläche abgerundet, aber noch nicht abgelöst haben, erkennbar an sich nicht bewegenden, leuchtenden Punkten unter dem Mikroskop, sollte im LAF die Trypsin-EDTA Lösung abgesaugt werden. Dieser Vorgang sollte sehr schnell und kontrolliert ablaufen, da sich sonst alle Endothelzellen ablösen und abgesaugt werden. Die Zellkulturflasche mit den noch leicht anhaftenden Endothelzellen wird mit der Kante in die Hand geschlagen, um die restlichen Zellen zu lösen. Es werden 6 ml Medium zu gesetzt und die Flasche horizontal geschwenkt, sodass der Boden vollständig mit Medium benetzt ist. Erst jetzt wird die Ablösung gestoppt. Die Zellsuspension wird gut resuspendiert und auch die Wachstumsfläche ein paar Mal mit Medium gespült, um noch eventuell anhaftende Zellen zu lösen. Zur Weiterkultivierung der Zellen werden, je nachdem wie schnell die Zellen wachsen, 0,5-3 ml Zellsuspension in vorbereitete Zellkulturflaschen tropfenweise auf das Medium pipettiert, unter dem Mikroskop kontrolliert, in den Brutschrank gelegt und hochfrequent hin und her geschwenkt, um die Zellen in der Flasche gut zu

verteilen. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wird das Zellmedium erstmals gewechselt.

Beschichtung mit Fibronectin und Affixene®: Für die Kultivierung von Zellmonolayern im flexiPERM micro 12 System oder in PDMS-Kanälen ist eine Beschichtung mit Zelladhäsionsfaktoren an Stelle der Gelatinelösung wie bei den Routinemethoden notwendig.

Vorbehandlung des flexiPERM micro 12 Systems: Die benötigten flexiPERMs und Deckgläser werden ca. zwei Stunden in 70%igen Alkohol eingelegt, unter dem LAF in einer sterilen Petrischale trocknen gelassen und so zusammengebaut, dass eine Seite der flexiPERMs vollständig mit dem Deckglas bedeckt ist.

Vorbehandlung der PDMS-Kanäle: Die PDMS-Kanäle werden laut Vorlage auf einer genau zugeschnittenen Glasplatte mit noch flüssiger PDMS-Lösung angeklebt, auf der Heizplatte ausgehärtet und bei 1 bar 50 Minuten autoklaviert. Unter dem LAF werden 500 µl PBS in die PDMS-Kanäle pipettiert, um PDMS vorzuquellen und nach 30 Minuten wird die PBS Lösung wieder abgesaugt.

Beschichtung mit Fibronectin bzw. Affixene®: Es werden jeweils 50 µl Fibronectin-Lösung (100 µg/ml in PBS) bzw. Affixene®-Lösung (0,5 mg/ml in Aqua bidest.) pro Well im flexiPERM micro 12 System oder 400 µl der jeweiligen Beschichtungslösung pro PDMS-Kanal eingebracht und im Brutschrank bei 37°C eine Stunde bei Fibronectin-Beschichtung bzw. bei Raumtemperatur 20 Minuten bei Affixene®-Beschichtung im LAF inkubiert. Anschließend wird die Beschichtungslösung abgesaugt und 160 µl (flexiPERM) bzw. 500 µl (PDMS-Kanal) Zellsuspension mit definierter Zellzahl eingebracht. Die Zellen werden bei 37°C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen vermehrt haben. Falls der Zelllayer noch nicht konfluent ist, wird Medium gewechselt und weiter bei 37°C inkubiert.

3.2.1.2 Entzündung der Endothelzellen

In Zellen, die entweder in Suspension oder als Monolayer im flexiPERM micro 12 System vorliegen, wird eine Entzündung induziert. Dazu wird eine TNF- α Lösung mit einer Konzentration von 50 ng/ml in Medium als Stimulierungsfaktor eingesetzt.

Im flexiPERM System wird, nachdem sich ein konfluenten Zellmonolayer gebildet hat, das Medium abgesaugt und nach Zusatz von 50 μ l TNF- α Lösung pro well 2 bzw. 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die TNF- α Lösung abgesaugt, mit 100 μ l PBS-Puffer gewaschen und abgesaugt. Eine Immunfluoreszenzfärbung wird durchgeführt, um den Entzündungseffekt nachzuweisen.

Im Fall einer Einzelzellsuspension werden die Zellen nach dem Spalten in 1 ml Medium resuspendiert, gezählt und auf 5 Millionen Zellen pro ml verdünnt. 50 μ l Zellsuspension werden mit 50 μ l TNF- α Lösung gemischt oder als Negativkontrolle nur mit 50 μ l Medium ohne TNF- α . Bei 37°C werden die Zellen 2 Stunden oder 4 Stunden inkubiert, danach bei 1000 UpM 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das überstehende Medium vorsichtig abgesaugt. Dann werden pro Gefäß 100 μ l PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ und 5 μ l primärer E-Selectin-Antikörper zugesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wird zweimal mit 400 μ l PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen, bei 1000 UpM 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und 400 μ l Überstand abgesaugt. Der verbleibenden Zellsuspension (etwa 100 μ l) wird 1000 μ l PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ zugesetzt, gut resuspendiert und die Probe mittels Flowcytometrie ausgewertet.

3.2.1.3 Färbung der Endothelzellen

Die „entzündeten Zellmonolayer“ im flexiPERM micro 12 System werden mit einer Immunfluoreszenzfärbung ausgewertet. Mit -20°C kaltem Methanol werden die Zellen 10 Minuten bei -20°C fixiert, anschließend wird Methanol abgesaugt und der Zellrasen mit PBS-Puffer zweimal gewaschen. Danach wird mit 100 µl 1%iger BSA-Lösung in PBS-Puffer 20 Minuten bei Raumtemperatur dehydratisiert und anschließend der Überstand wieder abgesaugt. Pro Well werden 50 µl einer Mischung aus 5 µl primärem E-Selectin Antikörper und Hoechst 33342 (Endkonzentration 5 µg/ml) in 1%iger BSA-Lösung in PBS-Puffer zugegeben und bei 37°C eine Stunde bzw. 1,5 Stunden inkubiert. Danach werden die Monolayer mit 1%iger BSA-Lösung in PBS-Puffer gewaschen und unter dem Mikroskop (Zeiss Axio Observer Z1 microscopy system mit Colibri-Belichtungssystem; Zeiss, Göttingen, Deutschland) ausgewertet.

3.2.2 Biotinylierung von Sialy Lewis X

Probenvorbereitung:

Herstellen verschiedener Stammlösungen:

Sialy Lewis X - 2 mg/ml in destilliertem Wasser

EDAC - 2 mg/ml in HEPES-Puffer pH7

NHS - 2 mg/ml in HEPES-Puffer pH7

Biotin-hydrazid - 2 mg/ml in HEPES-Puffer pH8

Glycin - 2 mg/ml in HEPES-Puffer pH8

Herstellen dazugehöriger Verdünnungen:

Sialyl Lewis X-Lösung - Stammlösung wird mit HEPES-Puffer pH7 auf 820,74 µg/ml verdünnt.

EDAC/NHS-Lösung - Stammlösung wird mit HEPES-Puffer pH7 auf 1917 µg/ml (für EDAC) bzw. 79,8 µg/ml (für NHS) verdünnt.

Biotin-hydrazid-Lösung – Stammlösung wird mit HEPES-Puffer pH8 auf 258,34 µg/ml verdünnt.

Glycin-Lösung – Stammlösung wird mit HEPES-Puffer pH8 auf 375,4 µg/ml verdünnt.

Darstellung von biotinyliertem Sialyl Lewis X:

50 µl Sialy Lewis X-Lösung (1 µmol/ml) werden mit 50 µl EDAC/NHS-Lösung vereinigt und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einer Schüttelapparatur inkubiert, um die Carboxylgruppen von Sialyl Lewis X zu aktivieren. Danach wird durch Zusatz von 500 µl Biotin-hydrazid-Lösung Biotin an die voraktivierte Carboxylgruppe von Sialyl Lewis X bei Raumtemperatur über Nacht am end-over-end Mischer gekoppelt. Am Schluss werden durch Zugabe von 50 µl Glycin-Lösung und vierstündiger end-over-end Inkubation bei Raumtemperatur noch vorhandene Aktivester abgesättigt.

Bindung von biotinyliertem Sialyl Lewis X an entzündete Zellen:

50 µl der „entzündeten Zellsuspension“ und 650 µl biotinylierte Sialyl Lewis X-Lösung werden vereinigt und mit PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ auf ca. 1,5 ml aufgefüllt. Die Mischung wird eine Stunde bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und zwischendurch geschüttelt. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 1000 UpM bei 4°C wird der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Zellsuspension wird zweimal mit jeweils 1 ml PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und der Überstand abgesaugt. Nach dem letzten Waschvorgang werden die Zellen in 50 µl PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ resuspendiert, 50 µl FITC-Avidin (0,1 mg/ml in destilliertem Wasser) zugesetzt und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation werden 400 µl PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ zugegeben und bei 1000 UpM 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren werden vorsichtig 400 µl des Überstandes abgesaugt, einmal mit 400 µl PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, zentrifugiert und wieder die 400 µl Überstand abgesaugt. Der Waschvorgang wird zweimal durchgeführt und nach dem letzten Waschvorgang werden 400 µl Überstand abgesaugt. 70 µl gewaschene Zellsuspension werden mit 1 ml partikelfreiem PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ in einem FACS Röhrchen vereinigt, gut resuspendiert und im Flowcytometer analysiert.

3.2.3 Flowcytometrie

Die Durchflusscytometrie ist eine zuverlässige Methode, um Zellen oder Partikel zu charakterisieren. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Charakteristika jeder Zelle einzeln erfasst werden. Mit dem Beckman Coulter Gallios™ Flow Cytometer (6 Farben, 2 Laser) kann man durch die Streuung des eingestrahnten Laserlichts Aussagen über die Größe und Granularität der Zellen treffen. Die dazugehörigen Messgrößen sind das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FS) und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SS), wobei der FS mit der Partikelgröße linear zunimmt und der SS die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen widerspiegelt. Der SS ist umso kleiner, je glatter die Oberfläche ist und umso größer, je rauer die Oberfläche ist. Mittels Flowcytometrie wird die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle bestimmt, was die Effektivität der Bindung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers widerspiegelt. Die Einstellungen des Geräts erfolgen durch Eichung auf die viable Population der Zelllinie, mit der die Versuche durchgeführt werden sollen.

Messung: 70 µl Zellsuspension werden mit 1 ml partikelfreiem PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ in einem Röhrchen vereinigt, resuspendiert und vermessen. Dabei sollte die Konzentration der Zellsuspension so gewählt werden, dass bei der Messung ungefähr 100 Zellen pro Sekunde detektiert werden. Nach jeder Messung wird mit partikelfreiem PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gespült.

3.2.4 PLGA-Mikropartikel

3.2.4.1 Herstellung von Mikropartikeln

30 mg PLGA werden in 4 ml Ethylacetat, worin optional 20 mg TAAc gelöst sein können, bei 4°C 5 bis 10 Minuten unter Rühren in einem mit einem Uhrglas abgedeckten Becherglas gelöst. Danach werden 5 µl BODIPY-Lösung (1 mg/ml in Ethylacetat) zugesetzt.

11,85 ml einer wässrigen 0,05% PVA 40-88 Lösung werden seitlich in die PLGA-Lösung einlaufen gelassen. Diese Lösung wird mit dem Ultraturrax fünf Minuten bei Stufe 3 gerührt und dabei in einem 4°C kalten Wasserbad gekühlt. Die Öl-in-Wasser Emulsion wird rasch in einem Schuss und ohne Nachtropfen in eine Glasschale, die 148 ml einer wässrigen 0,25%igen PVA 40-88 Lösung enthält, gegossen und bei Raumtemperatur bei 600 UpM am Magnetrührer eine Stunde gerührt. Danach wird aus der in einem 500 ml Rundkolben befindlichen Dispersion am Rotavapor restliches Ethylacetat bei ca. 170 UpM eine Stunde bei Raumtemperatur im Vakuum entfernt.

Waschen der Mikropartikel: Die Mikropartikelsuspension wird auf vier Aliquote aufgeteilt und wenn nötig mit HEPES-Puffer pH7 auf jeweils 40 ml aufgefüllt. Die Mikropartikel werden bei 3200 UpM bei 4°C zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und erneut mit HEPES-Puffer pH7 auf ca. 35 ml aufgefüllt. Die Suspension wird zunächst am Vortexter und dann im Ultraschallbad 5-10 Minuten bei Raumtemperatur resuspendiert. Danach wird wieder wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Insgesamt wird dieser Waschvorgang dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang werden die Mikropartikel jeweils auf etwas weniger als 25 ml aufgefüllt und die Suspension unter dem Mikroskop auf Agglomerate kontrolliert. Die Röhrchen werden am Vortexter und dann im Ultraschallbad resuspendiert, alle vier Aliquote in einen 100 ml Messkolben transferiert und auf 100,0 ml mit HEPES-Puffer pH7 aufgefüllt. Die homogene Suspension wird auf vier gleiche Teile aufgeteilt und entweder sofort verwendet oder bei -80°C für spätere Versuche eingefroren.

3.2.4.2 Charakterisierung von Mikropartikeln

➤ Größenbestimmung

Laserdiffraktometrie:

Mit dem Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, England) wird die Größenverteilung der PLGA-TAAc Mikropartikelsuspension ermittelt.

Die Laserdiffraktometrie basiert auf dem Prinzip, dass Partikel, die mit einem Laserstrahl beleuchtet werden, das Licht in Abhängigkeit ihrer Größe beugen. Sowohl der Beugungswinkel als auch die Beugungsintensität sind dabei abhängig von der Partikelgröße. Große Partikel beugen Licht in kleinen Winkel mit hoher Intensität und kleine Partikel dagegen erzeugen größere Beugungswinkel mit geringerer Intensität [16]. (siehe Abb. 4)

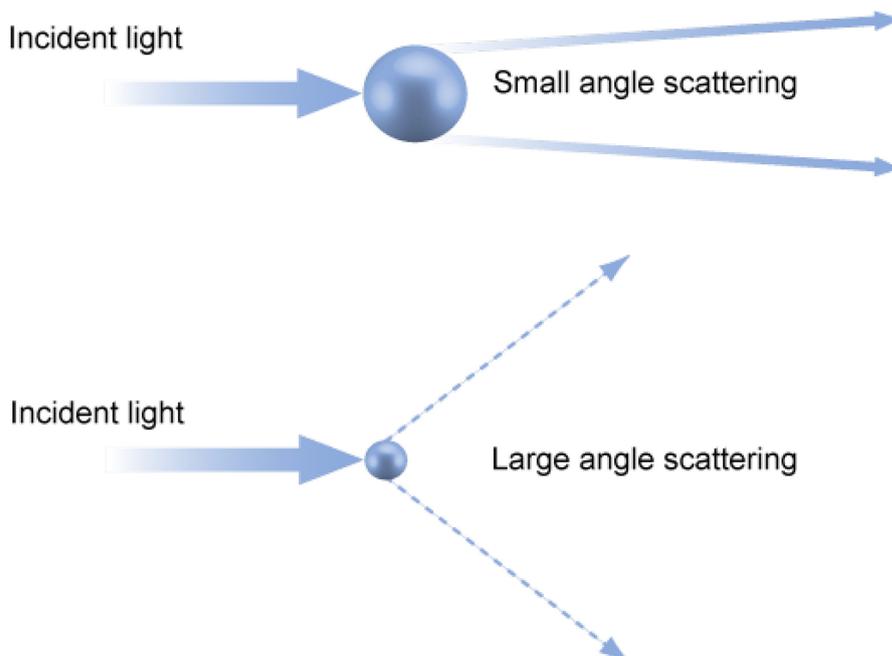


Abbildung 4: Lichtbeugung an großen und kleinen Partikeln mit den daraus resultierenden unterschiedlich großen Beugungswinkeln [16].

Um die Partikelgröße mittels Laserdiffraktometrie bestimmen zu können, besteht das System aus einer Lichtquelle (Laser), die kohärentes Licht einer bestimmten Wellenlänge aussendet, einem optischen System, einer Messzelle, in der die Partikel in homogenem Fluss durch den Laserstrahl befördert werden, einer nachgeschalteten Fourier-Linse und einer Reihe von Detektoren, die die verschiedenen Beugungsmuster

erfassen, die durch die unterschiedlichen Beugungswinkel entstehen. Anhand eines komplizierten Algorithmus, dessen Prinzip entweder der Mie-Theorie oder der Fraunhofer-Näherung folgt, kann die Partikelgröße aus den Beugungsmustern errechnet werden [16].

Die Messergebnisse werden als Verteilungskurve angegeben, die den Vorteil bietet, auch Aussagen über die kleinsten und größten Partikel treffen zu können. Darüber hinaus ist aus der Verteilungskurve ersichtlich, ob die Suspension eine oder mehrere Partikelpopulationen enthält.

Die Messergebnisse werden anhand mehrerer Parameter angegeben: $D(0,5)$ besagt, dass 50% der Partikel kleiner als der angegebene Wert sind. Dementsprechend stehen die Werte für $d(0,1)$ und $d(0,9)$ für die kleinsten bzw. größten Partikel. Je näher $d(0,1)$ und $d(0,9)$ zusammenliegen, desto enger ist die Größenverteilung der Partikel. Zusätzlich wird mit $D(4,3)$ jener Partikeldurchmesser angegeben werden, der sich auf das Volumen bezieht.

Rasterelektronenmikroskopie:

Die trockenen Partikel werden in einem Sputter Q150R ES (Queorum, UK) bei 0,1 mbar Vakuum, 60mA und 60 Sekunden Reaktionszeit mit Gold beschichtet. Danach werden die Proben in einem HITACHI Tabletop Microscope TM-1000 Rasterelektronenmikroskop im Hochvakuum fotografiert.

- Bestimmung des PLGA-Gehaltes und der Einbaurrate von TAAc

PLGA-Gehalt der Mikropartikel - Bestimmung mittels HPLC:

-) 200 μ l Acetonitril (ACN), 80 μ l 1N KOH und 720 μ l Probe werden in konische Glasgefäße, sogenannte Wheaton vials, mit 2,5 ml Fassungsvermögen und passenden, gleich großen Magnetrührern, eingebracht.

-) Die Proben werden 30 Minuten im Ultraschallbad bei 50% Intensität behandelt. Dabei ist zu beachten, dass die Temperatur nicht über 25°C steigt, um die Glasübergangstemperatur von PLGA nicht zu überschreiten. Währenddessen wird der Trockenschrank auf 100°C vorgeheizt.

-) Danach werden die Proben über Nacht bei 100°C unter Rühren im Trockenschrank bis zur vollständigen Hydrolyse von PLGA inkubiert.

-) Im Kühlschrank werden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt.
-) Die abgekühlten Proben werden unter Rühren mit jeweils 20 µl 1N HBr unter der Verwendung von 10 µl Bromthymolblau (2 mg/ml in Ethanol) als Indikator neutralisiert. Die Proben zeigen einen Farbumschlag von blau nach gelb.
-) Anschließend wird von den Einzelproben jeweils ein Aliquot von 200 µl gezogen und mit 800 µl ACN, 500 µl Triethylamin (TEA, 20 µmol/ml in ACN, Lichtschutz!) und 500 µl p-Bromphenacylbromid (pBPB, 20 µmol/ml in ACN) gemischt. Dabei werden die freien Säuren in ihre Bromphenacylderivate umgewandelt, die eine besonders hohe UV-Absorption aufweisen.
-) Die Derivatisierung der Proben erfolgt unter Rühren im Trockenschrank bei 80°C über 90 Minuten, danach werden die Proben im Kühlschrank auf Raumtemperatur abgekühlt.
-) Die Proben werden bei 14000 UpM 30 Minuten zentrifugiert und mittels HPLC analysiert.

Die Analyse erfolgt mit dem Agilent® Technologies HPLC System der Serie 1100 mit einer quaternären HPLC Pumpe, einem UV-Diodenarray Detektor und einem Autosampler. Die Proben mit einem Einspritzvolumen von 20 µl werden auf einer LiChrosphere® 100 RP-18e Säule bei 20°C via Gradientenelution aufgetrennt, die mit einer mobilen Phase von 30% H₂O und 70% ACN beginnt und in einer Konzentration von 10% H₂O und 90% ACN endet. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 1,5 ml/min. Nach jeder Probe wird mit 20 µl 100% ACN gespült. Die Darstellung des Chromatogramms beruht dabei auf der Detektion der Bromphenacylderivate bei 254 nm im Vergleich zur Referenzwellenlänge bei 360 nm. Die Auswertung erfolgt anhand eines externen Standards (Eichgerade von Glykolsäure in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 3,00 mg/ml, $R^2 = 0,9956$). Für die Berechnung des PLGA-Gehalts dient die Konzentration der Glykolsäure als Grundlage, die mit Hilfe einer Eichgerade ermittelt wird.

TAAc Gehalt in Mikropartikeln - Bestimmung mittels HPLC:

2 ml der Mikropartikelsuspension werden entweder unverdünnt oder 1:1 verdünnt mit HEPES-Puffer pH7 zehn Minuten bei 14000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig und vollständig abgesaugt und die Mikropartikel in 2 ml ACN gelöst. Die Lösung wird nochmals zehn Minuten bei 14000 UpM und 4°C zentrifugiert und jeweils 1 ml Lösung aus dem oberen Teil vorsichtig entnommen, in ein HPLC-Vial überführt und mittels HPLC analysiert. Die Proben werden doppelt bestimmt.

Die Analyse erfolgt mit dem Agilent® Technologies HPLC System der Serie 1100 mit einer quaternären HPLC Pumpe, einem UV-Diodenarray Detektor und einem Autosampler. Die Proben mit einem Einspritzvolumen von 20 µl werden auf einer Nucleosil® 100-5C 18 Säule bei 20°C mit 10% H₂O und 90% ACN als mobiler Phase aufgetrennt. Die Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 254 nm im Vergleich zur Referenzwellenlänge von 360 nm. Nach jeder Probe wird mit 20 µl 100% ACN gespült. Die Auswertung des Chromatogramms erfolgt mit Hilfe eines externen Standards (Eichgerade von TAAc, siehe Anhang A 4.3.2). Die Einbaurate von TAAc in PLGA-Mikropartikel wird als Prozentsatz bezogen auf die eingesetzte Menge an TAAc angegeben.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Endothelzellen

4.1.1. Charakterisierung und Kultivierung

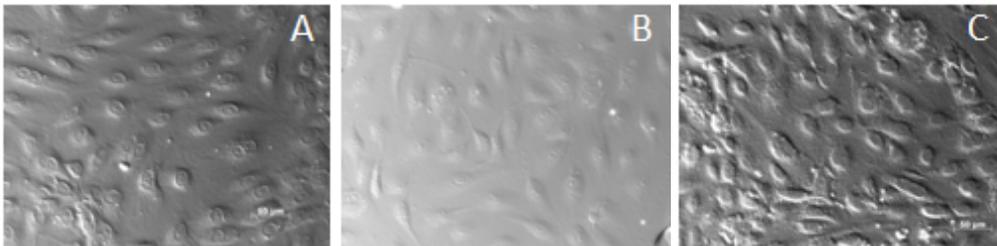


Abbildung 5: Mikroskopische Differentialinterferenzkontrastbilder von HUVEC (A), HUVECtert (B) und HMEC (C).

➤ HUVEC

Die Kultivierung von HUVEC war problemlos. Obwohl sie als primäre Zelllinie nur begrenzt über maximal 2-8 Subkultivierungsschritte passagiert werden können, wuchsen Zellen, die länger subkultiviert wurden, trotzdem rasch an und bildeten einen für Zellversuche geeigneten Monolayer aus. (Abb. 5A)

➤ HUVECtert

Die Kultivierung von HUVECtert, einer immortalisierten Zelllinie, war auch unproblematisch. Doch gab es Phasen, in denen sie sich besonders rasch reduplizierten und auch mit nur drei Tropfen Zellsuspension schon am nächsten Tag einen nahezu konfluenten Monolayer bildeten (Abb. 5B). Diese Phase normalisierte sich und es waren bald wieder 0,5 - 1,5 ml Zellsuspension zur Weiterkultivierung notwendig.

➤ HMEC

Bei der Kultivierung von HMEC, auch eine immortalisierte Zelllinie, gab es einige Unterschiede zu HUVECtert und HUVEC. Es war prinzipiell immer mehr Zellsuspension für die Subkultivierung notwendig und trotzdem wuchsen sie immer noch langsamer als die anderen Endothelzellen. Somit dauerte es länger bis sich brauchbar dichte Zelllayer ausgebildet hatten, die jedoch nie den Konfluenzgrad von HUVECtert und HUVEC erreichten (Abb. 5C).

Schwierigkeiten bereitete jedoch die Kultivierung dieser Zelllinien als Monolayer im flexiPERM micro 12 System oder in PDMS-Kanälen. Im Gegensatz zu kommerziell vorbehandelten Zellkulturflaschen aus Polystyrol verlangen Glasoberflächen eine andere Beschichtung. Mit Gelatinelösung beschichtete Glasoberflächen waren ineffektiv, da sich die Zellen zu sternförmigen Gebilden veränderten und auch stark verlängert erschienen. In mit Fibronectin beschichteten flexiPERM micro 12 Systemen und PDMS-Kanälen hingegen bildeten sich schöne Zellmonolayer aus und die Zellen veränderten auch ihre Form nicht. Eine andere Möglichkeit der Oberflächenbeschichtung besteht in Affixene[®], einem synthetischen Adhäsionsfaktor (PAA, Linz, Österreich). In mit Affixene[®] beschichteten flexiPERM micro 12 System und PDMS-Kanälen bildeten sich keine vollständigen Monolayer aus oder die Zellen vermehrten sich so schnell, dass sie sich am nächsten Tag schon wieder von der Oberfläche abgelöst hatten. Auch eine Variation der eingesetzten Zellzahl und der Wechsel von dem für das Zellwachstum bestgeeignetem Endoprime[®]-Medium zum schlechteren M199 Medium brachte keine Besserung. Nachdem Affixene[®] für die Oberflächenbeschichtung nicht ideal war, wurden alle weiteren Zellversuche in mit Fibronectin beschichteten flexiPERM micro 12 Systemen und PDMS-Kanälen durchgeführt. Aber auch hier wurde in den Zellversuchen M199 an Stelle von Endoprime[®]-Medium eingesetzt, da die Zellen trotz Anpassung der Zellzahl ebenso schnell wuchsen und sich sonst auch rascher von der Oberfläche gelöst hätten.

4.1.2 Entzündung von Endothelzellen

Mikroskopische Untersuchung

Die ersten Versuche zur Entzündung von Endothelzellen wurden an Zellmonolayern durchgeführt, die in flexiPERM micro 12 Systemen gezüchtet wurden. Es wurden drei unterschiedliche Konzentrationen von TNF- α (10, 20, 50 ng/ml) und zwei unterschiedliche Volumina von fluoreszenzmarkiertem primären E-Selectin Antikörper (2 und 5 μ l) getestet. Zusätzlich wurde die Inkubationszeit mit TNF- α (1,5, 2 und 4 Stunden) und die Inkubationsdauer mit Antikörper (1,5 und 2 Stunden) variiert.

Diese Vorversuche bestätigten, dass HUVEctert und HUVEC in entzündete Zellen übergeführt werden konnten und diese im Vergleich zu gesunden Zellen fluoreszierten. Bei HMEC konnte keine Entzündung induziert werden und es wurden alle weiteren Versuche mit HUVEctert und HUVEC durchgeführt.

Die Variation der TNF- α Konzentration und Inkubationsdauer ergab, dass TNF- α in einer Konzentration von 50 ng/ml und einer Inkubationsdauer von 4 Stunden eine stärkere E-Selectin-Antikörperbindung bewirkte als eine TNF- α Konzentration von 10 ng/ml oder 20 ng/ml und zwei oder dreistündige Inkubation. Sowohl die Erhöhung des Antikörpervolumens von 2 auf 5 μ l als auch eine Verlängerung der Inkubationsdauer von 1,5 auf 2 Stunden ergab keine wesentlich intensivere Fluoreszenz unter dem Mikroskop. Es wurden deshalb alle weiteren Versuche an Monolayern im flexiPERM micro 12 System primär mit 50 ng/ml TNF- α und vier Stunden Inkubation und sekundär mit 5 μ l primärem E-Selectin-Antikörper und 1,5 Stunden Inkubation durchgeführt und unter dem Mikroskop die Fluoreszenzintensität der entzündeten Zellen bewertet (Abb. 6).

Nach Inkubation von HUVEctert mit TNF- α (50 ng/ml, vier Stunden Inkubation) und Detektion des durch Entzündung exprimierten E-Selectin mit einem fluoresceinmarkierten E-Selectin-Antikörper (5 μ l, 1,5 Stunden Inkubation) wurde bei mikroskopischer Betrachtung ein deutlicher Unterschied zu nicht entzündeten Zellen sichtbar (Abb. 6 Aufnahme A und B). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt und leuchten unter dem Mikroskop blau. Die Entzündung der HUVEctert ist an der grünen Fluoreszenz um den Kern erkennbar, wobei es in jeder Zelle anscheinend einen Bereich gibt, der sich mondformig um den Kern zieht und stärker leuchtet als der Rest

der Zelle. Jedoch fluoreszierten nicht alle HUVECTert und waren demnach nicht entzündet. Zusätzlich war die Fluoreszenzintensität nicht allzu stark.

Im Vergleich zu HUVECTert konnten bei HUVEC bei fast alle Zellen eine Entzündung induziert werden, was an der wesentlich stärkeren grünen Fluoreszenz erkennbar ist (Abb. 6 Aufnahme C und D). Der mondformige Bereich um den Kern konnte auch hier beobachtet werden, war aber wesentlich stärker als bei HUVECTert.

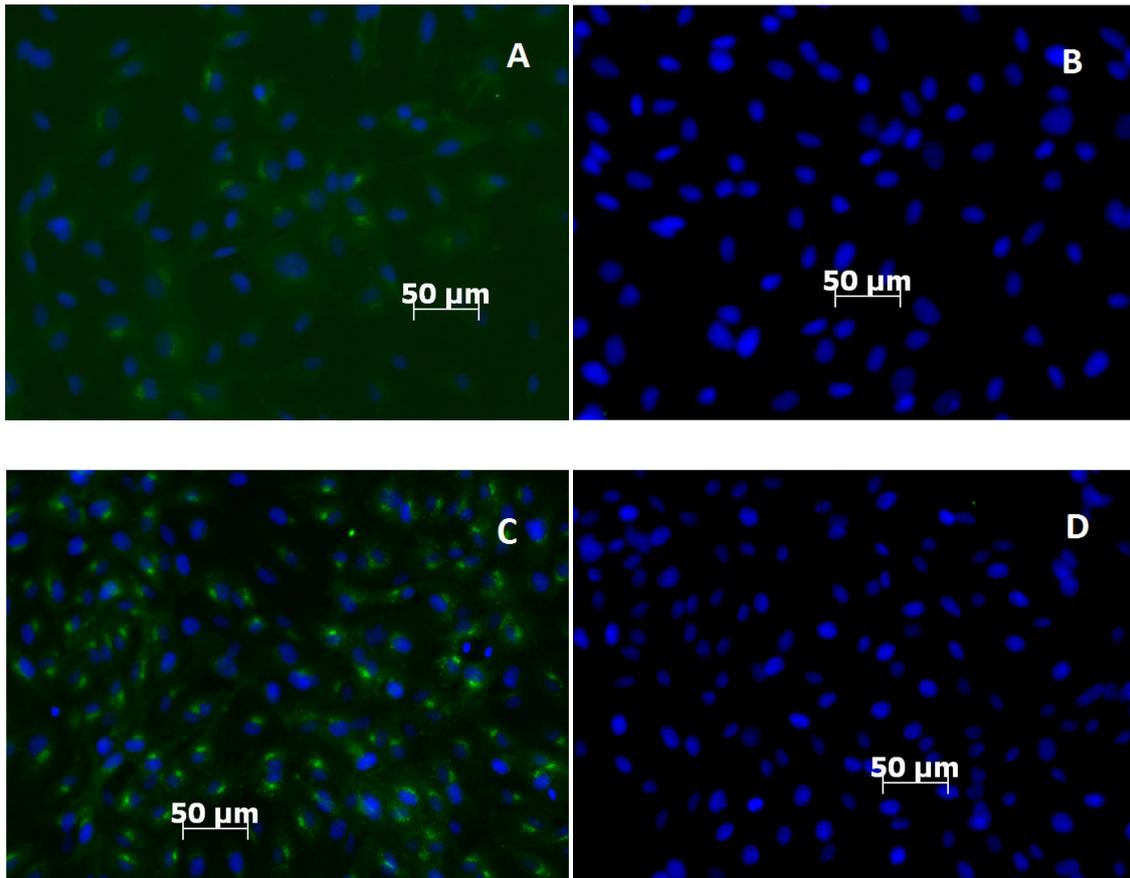


Abbildung 6: Mikroskopische Bilder der Immunfluoreszenzfärbung von gesunden (B) und entzündeten HUVECTert (A) bzw. gesunden (D) und entzündeten HUVEC (C) nach Behandlung mit TNF- α (50 ng/ml, vier Stunden Inkubation) und Färbung mit fluoresceinmarkiertem E-Selectin-Antikörper (5 μ l, 1,5 Stunden Inkubation).

Flowcytometrische Untersuchung

Die Versuche im flexiPERM micro 12 System haben bestätigt, dass die Entzündung an HUVEctert und HUVEC induziert werden kann, auch wenn sie bei letzteren um einiges stärker ausfällt. Dies war die Basis, weitere Untersuchungen durchzuführen und die Entzündung mittels Flowcytometrie zu quantifizieren.

In den folgenden Untersuchungen wurden HUVEctert mit unterschiedlichen Konzentrationen an TNF- α (5, 10, 25 ng/ml) 4 Stunden behandelt und die Entzündung mit dem fluoresceinmarkierten E-Selectin-Antikörper (5 μ l, 1,5 Stunden Inkubation) im Vergleich zu gesunden HUVEctert als Negativkontrolle. Zusätzlich wurden HUVEctert, die mit 50 ng/ml TNF- α entzündet, aber nicht mit E-Selectin-Antikörper inkubiert wurden, als zweite Negativkontrolle verwendet. Alle Versuche wurden in Suspension durchgeführt und anschließend mittels Flowcytometrie ausgewertet.

Die relevanten Daten, die gewonnen werden konnten, beinhalten die Zahl der lebenden Zellen in % bezogen auf die Gesamtheit der untersuchten Zellen (Zellen im Gate A), die Zahl der fluoreszierenden, lebenden Zellen in % bezogen auf die Gesamtheit der untersuchten Zellen (Zellen im Gate B, Ex/Em 485/525 nm) und deren mittlere relative zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein).

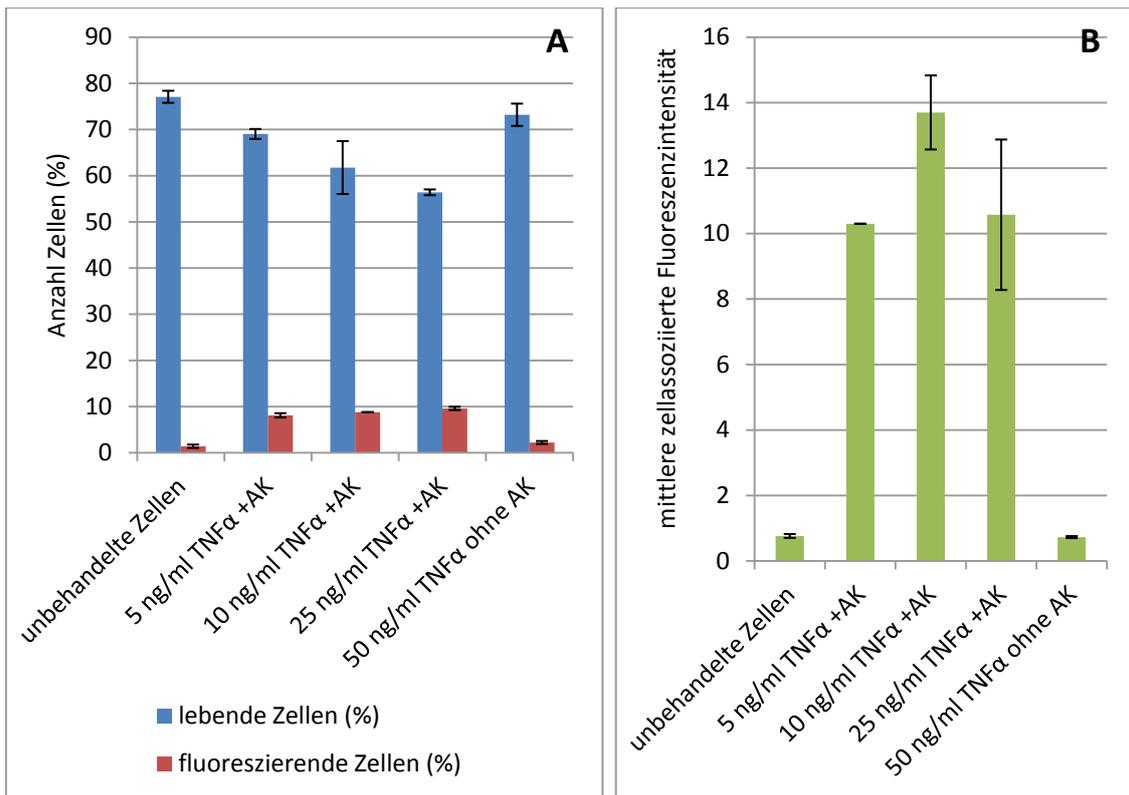


Abbildung 7: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVEctert (A) und mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVEctert (B) nach Entzündung mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen (Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoresceinmarkiertem E-Selectin-Antikörper (Inkubation 1,5 Stunden) im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen mit 50 ng/ml TNF- α ohne Antikörper-Zusatz.

Die Durchflusszytometrie (Abbildung 7B) ergab, dass HUVEctert nach Entzündung mit TNF- α , entsprechend einer mittleren zellassoziierten Fluoreszenzintensität von bis zu 13,7, E-Selectin exprimieren, während nicht entzündete Zellen mit einem Wert von 0,76 nur eine geringe Autofluoreszenz und keine E-Selektin bedingte Fluoreszenz zeigten und Zellen, die mit 50 ng/ml TNF- α und ohne E-Selektin-Antikörper inkubiert wurden, ebenfalls eine geringe mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität von nur 0,73 im Bereich der Autofluoreszenz der Zellen zeigten. Jedoch fluoreszierten nur bis zu 9,59% der HUVEctert nach Induktion der Entzündung (Abb. 7A), was auch durch die Mikroskopie (Abb. 6A) bestätigt wurde.

Unterschiedliche TNF- α Konzentrationen bewirkten kaum Unterschiede in der mittleren zellassoziierten Fluoreszenzintensität, da nach Zusatz von 5, 10 bzw. 25 ng/ml TNF- α der Prozentanteil lebender fluoreszierender HUVEctert von 8,09% auf 9,59% geringfügig zunahm. Gleichzeitig nahm aber mit steigender Konzentration von TNF- α die Anzahl an lebenden Zellen ab. Das könnte daran liegen, dass TNF- α als

Entzündungsfaktor die Viabilität der Zellen einschränkt und sie nicht nur entzündet und dadurch schädigt, sondern dass sie teilweise so stark geschädigt werden, dass sie absterben. Nur auf den ersten Blick im Widerspruch dazu steht die Beobachtung, dass nach Inkubation mit 50 ng/ml TNF- α Konzentration ohne E-Selectin-Antikörperbehandlung mehr als 70% viabile HUVECTert vorhanden waren. Diese Diskrepanz beruht wahrscheinlich darauf, dass die Zellen unmittelbar nach der TNF- α Inkubation im Flowcytometer untersucht wurden und nicht mit Medium anstatt E-Selectin-Antikörper 1,5 Stunden inkubiert wurden. Demnach spielt auch die Inkubationsdauer eine wesentliche Rolle bei der Überlebensfähigkeit der Zellen. Eine andere - aber eher unwahrscheinliche - Erklärung wäre, dass der E-Selectin-Antikörper auf die Zellen toxisch wirkt und damit bei dieser Inkubation nicht zum Tragen kommt.

Im nächsten Versuch wurde TNF- α in einer Konzentration von 50 ng/ml eingesetzt, da die Viabilität der Zellen wie aus Abbildung 7A ersichtlich jener von unbehandelten HUVEctert entsprach und auch die mikroskopischen Bilder eine deutliche E-Selectin-Expression zeigten. Da der oben beschriebene Versuch die Inkubationsdauer als möglichen kritischen Parameter offenlegte, wurde in diesem Versuch zwei bzw. vier Stunden mit 5 μ l E-Selectin-Antikörper inkubiert. Als Vergleich dienten wieder nicht behandelte Zellen und Zellen, die entweder nur mit E-Selektin-Antikörper oder nur mit TNF- α inkubiert wurden.

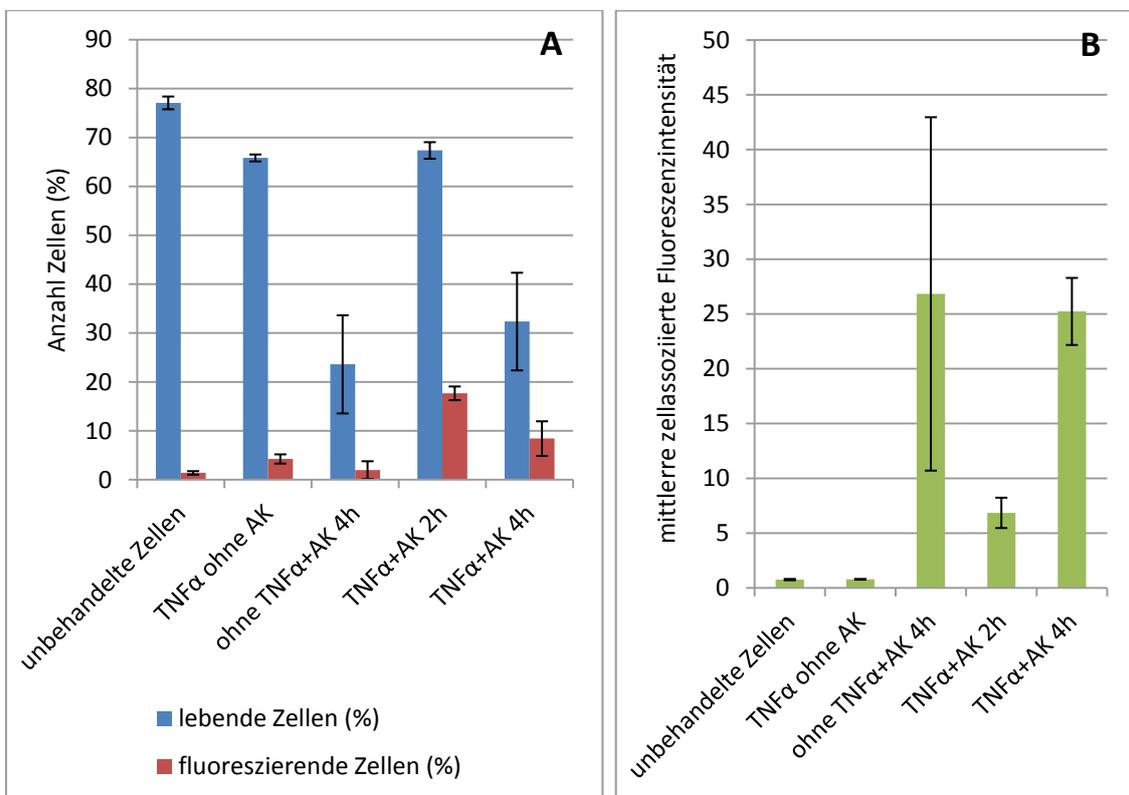


Abbildung 8: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVEctert (A) und mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVEctert (B) nach Entzündung mit TNF- α (50 ng/ml, Inkubation 4 h) und Detektion der Entzündung mit fluoresceinmarkiertem E-Selectin-Antikörper (5 μ l, Inkubation 2 oder 4 Stunden) im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen, die entweder nur mit TNF- α oder E-Selectin-Antikörper inkubiert wurden.

Wie erwartet zeigt Abbildung 8B, dass TNF- α eine Entzündung induzierte und auch die zwei Negativkontrollen von gesunden Zellen und entzündeten Zellen ohne Antikörper zeigten eine mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität von nur 0,76 und 0,79 bei der Detektion des Fluoresceinlabels des Antikörpers. Der Unterschied lag in der mittleren zellassoziierten Fluoreszenzintensität, die bei Inkubation mit E-Selectin-

Antikörper von vier Stunden mit 25,23 fast das 4-fache der zweistündigen Inkubation betrug. Jedoch war der Anteil an lebenden fluoreszierenden HUVEctert nach zweistündiger Inkubation mit 17,68% deutlich höher als nach vierstündiger Inkubation mit 8,42% (Abbildung 8A). Zusätzlich war der Anteil lebender Zellen bei Entzündung mit TNF- α ohne Antikörper-Inkubation oder mit nachfolgender zweistündiger Antikörper-Inkubation mit über 60% deutlich höher als bei vierstündiger Antikörper-Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Exposition mit 32,36% lebenden Zellen. Daher übt die Inkubationsdauer mit E-Selektin-Antikörper einen wesentlichen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen aus. Zusätzlich war die mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität von nicht entzündeten HUVEctert nach vierstündiger Inkubation mit E-Selectin-Antikörper mit über 26 sehr hoch (Abbildung 8B), die Anzahl der lebenden Zellen bzw. der lebenden fluoreszierenden Zellen betrug jedoch nur 23,6% bzw. knapp 2% (Abbildung 8A). Die hohe Fluoreszenzintensität nach Antikörper-Inkubation könnte einerseits auf der Bildung von Antikörperaggregaten beruhen, die aufgrund ihrer inhärenten Fluoreszenz den Messwert fälschlicherweise erhöhen. Andererseits könnte eine unspezifische Zellbindung des E-Selectin-Antikörpers oder auch eine durch die toxischen Effekte einer zu langen Inkubationsdauer hervorgerufene vermehrte Expression von E-Selektin - auch wenn diese Bildung nicht wie sonst durch TNF- α hervorgerufen wird - die hohe Fluoreszenzintensität erklären. Nachdem deutlich mehr entzündete HUVEctert nach zweistündiger Inkubation mit E-Selectin-Antikörper viabil waren als nach vierstündiger Inkubation und auch mehr Zellen, wenn auch schwächer, fluoreszierten, wurde in den folgenden Versuchen zwei Stunden mit dem Antikörper inkubiert. Die TNF- α Konzentration wurde mit 50 ng/ml und vier Stunden Inkubation gleich gehalten.

Da auch HUVEC unter Zellkulturbedingungen einen Monolayer ausbildeten, wurde versucht, diese primären Endothelzellen unter denselben Bedingungen wie für HUVECTert ein entzündetes Endothel zu generieren. Die Entzündung sollte durch TNF- α (50 ng/ml, 4 Stunden Inkubation) erfolgen und die E-Selectin-Expression wurde durch zwei- oder vierstündige Inkubation mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen E-Selectin (5 μ l) detektiert. Die Ergebnisse werden mit unbehandelten Zellen, nicht entzündeten Zellen nach vierstündiger E-Selectin-Antikörper Inkubation und entzündeten Zellen ohne E-Selectin-Antikörper Inkubation verglichen.

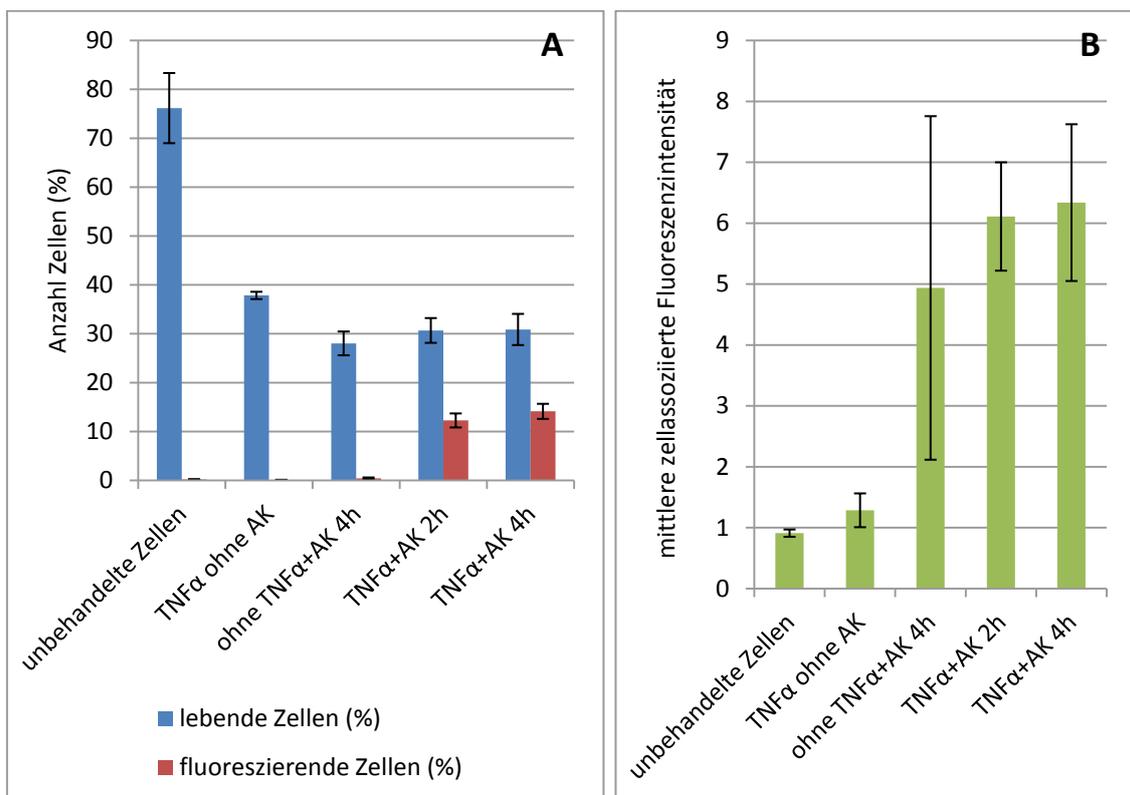


Abbildung 9: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVEC (A) und mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVEC (B) nach Entzündung mit TNF- α (50 ng/ml, Inkubation 4 h) und Detektion der Entzündung mit fluoresceinmarkiertem E-Selectin-Antikörper (5 μ l, Inkubation 2 oder 4 Stunden) im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen, die entweder nur mit TNF- α oder E-Selectin-Antikörper inkubiert wurden.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 9B zeigen, stieg durch die Behandlung von HUVEC mit TNF- α die mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität im Mittel von 0,94 auf 6,34 und damit die E-Selectin-Expression durch Induktion einer Entzündung an, wenn auch nicht signifikant. Das Ausmaß der E-Selectin-Expression war weitgehend unabhängig von der Inkubationsdauer mit TNF- α . Obwohl der Anteil an viablen Zellen etwa 30% betrug (Abb. 9A), fluoreszierte etwa ein Drittel davon. Diese Ergebnisse wurden auch

qualitativ durch die in Abb. 6C mikroskopischen Bilder bestätigt. Die Negativkontrollen der nicht behandelten Zellen und entzündeten Zellen ohne Antikörper-Inkubation zeigten keine Fluoreszenz. Bei den nicht entzündeten Zellen, die mit Medium an Stelle von TNF- α und anschließend vier Stunden mit E-Selectin-Antikörper inkubiert wurden, besaßen nur 0,42% der Zellen eine etwas höhere Fluoreszenz. Wie bereits oben erwähnt, könnte dies auf der Bildung von Antikörperaggregaten oder unspezifischer Bindung des Antikörpers beruhen. Im Gegensatz zu HUVECTert verringerte sich bei HUVEC der Anteil lebender Zellen, die längere Zeit inkubiert wurden, auf etwa 30%. Nur nicht entzündete Zellen zeigten eine Viabilität von ca. 75%. Die im Vergleich zu HUVECTert geringere Viabilität von HUVEC könnte an der allgemein erhöhten Empfindlichkeit primärer Zellen gegenüber immortalisierten Zellen, wie HUVECTert, liegen. Jedoch konnte an den primären Endothelzellen, wahrscheinlich bedingt durch ihre erhöhte Empfindlichkeit, eine ausgeprägtere und konstantere Entzündung hervorgerufen werden als bei HUVECTert. Diese Schlussfolgerung wird vor allem auch durch die mikroskopischen Aufnahmen unterstrichen.

Nachdem eine von zwei auf vier Stunden verlängerte E-Selectin-Antikörper-Inkubation keine wesentliche Zunahme der mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensität bewirkte, wurden die Versuchsbedingungen wie bei HUVECTert beibehalten, um einen eventuell größeren Zellverlust bei längerer Inkubation vorzubeugen.

4.1.3 Bindung von biotinyliertem Sialyl Lewis X an Endothelzellen

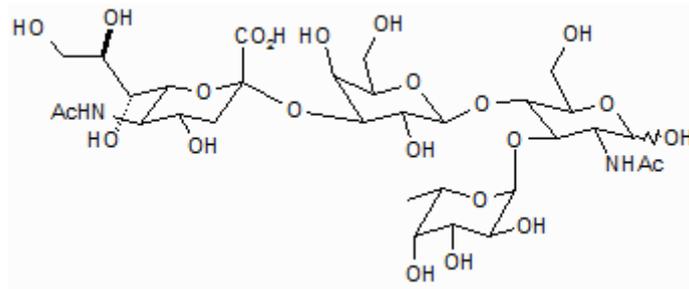


Abbildung 7: Struktur von 3'-Sialyl-L-Lewis X [17]

Nach Aktivierung mit TNF- α produzieren Endothelzellen als Folge einer Entzündung E - Selectin, ein Adhäsionsmolekül, das als Target für neue zielgerichtete Arzneiformen dienen soll. Das Oligosaccharid Sialyl Lewis X ist ein natürlicher Ligand für E-Selectin und bindet an dieses [18]. Um eine erfolgreiche Bindung von Sialyl Lewis X an E-Selectin nachweisen zu können, wird nach Aktivierung der Carboxylgruppe von Sialyl Lewis X durch EDAC/NHS nach der Carbodiimidmethode diese an Biotin-hydrazid gekoppelt. Mit hoher biologischer Bindungsspezifität und Affinität kann FITC-Avidin mit dem Biotinteil interagieren. Durch den Fluorescein-Label von Avidin wird eine Komplexbildung aus E-Selectin, Biotinyl-Sialyl Lewis X und FITC-Avidin eine Fluoreszenz an der Zelloberfläche hervorrufen, die mittels Flowcytometrie gemessen und ausgewertet werden kann.

Die Versuche mit HUVEC wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde das Versuchsprotokoll in der Weise geändert, dass für die HUVEC-Monolayer die TNF- α Inkubation von vier auf zwei Stunden, die Aktivierung der Carboxylgruppen von Sialyl Lewis X mit EDAC/NHS auf 30 Minuten, die Kopplung von Biotin auf zwei Stunden und die Absättigung mit Glycin auf 15 Minuten verkürzt wurde. Dadurch sollte das Risiko vermindert werden, dass mehr Zellen absterben und dass der Versuch planbarer wird und nicht zu lange dauert. Darüber hinaus wurde auch die Zahl der Zellen und die Menge oder Konzentration der Reagenzien in diesen Ansätzen verdoppelt.

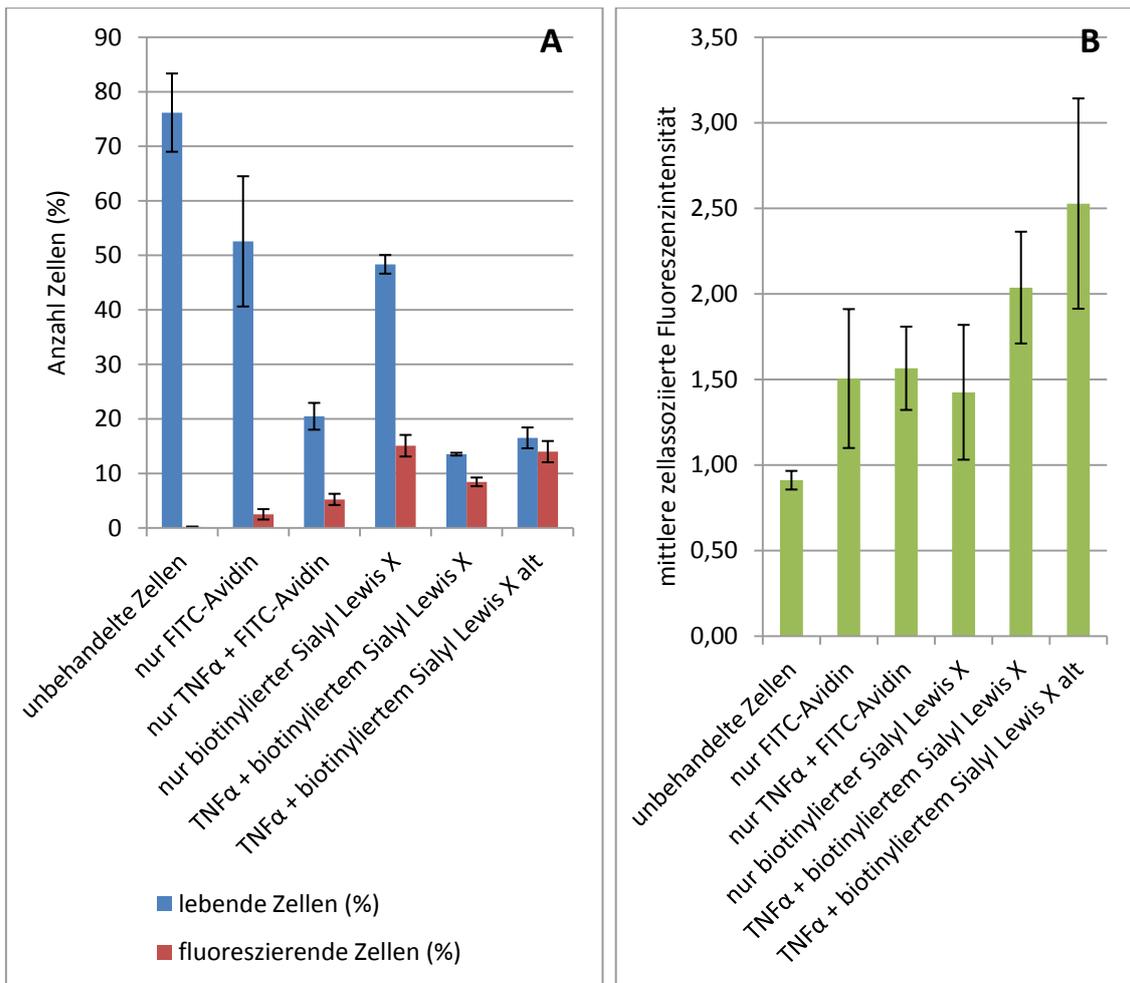


Abbildung 10: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVEC (A) und mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVEC (B) nach Entzündung mit TNF- α und Detektion der Entzündung mit biotinyliertem Sialyl Lewis X/fluoresceinmarkiertem Avidin. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen, nicht entzündete Zellen, die entweder nur mit FITC-Avidin oder biotinyliertem Sialyl-Lewis X inkubiert wurden und entzündete Zellen, die nur mit FITC-Avidin behandelt wurden. Der Index „alt“ weist auf das alternative Versuchsprotokoll, wie oben im Text beschrieben, hin.

Insgesamt zeigten die in Abbildung 10 dargestellten Ergebnisse, dass in-vitro bei entzündetem Endothel die Bindung des zielgerichteten Liganden Sialyl Lewis X deutlich höher war als in nicht entzündetem Gewebe. Während nur 0,19% nicht entzündete Zellen eine vernachlässigbare Bindung des Oligosaccharids entsprechend einer mittleren relativen zellgebundenen Fluoreszenzintensität kleiner 1 zeigten, bewies die mittlere zellassoziierten Fluoreszenzintensität von 2,04 bei 8,44 % aller Zellen bzw. die mittlere zellassoziierten Fluoreszenzintensität von 2,53 bei 13,99% aller Zellen im alternativen Versuchsprotokoll die deutlich erhöhte Zellbindung des E-Selectin-spezifischen Targeters. Dieses Ergebnis wurde durch Kontrollversuche untermauert: Bei nicht entzündeten HUVEC, die nur mit Medium und FITC-Avidin inkubiert wurden,

fluoreszierten nur 2,5% aller Zellen mit einer Intensität von nur 1,51. Nach Induktion einer Entzündung mit TNF- α und folgender Inkubation mit FITC-Avidin, fluoreszierten zwar doppelt so viele Zellen, aber die mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität blieb mit 1,57 fast gleich. Aufgrund der Daten dieser beiden Negativkontrollen war die Interaktion von entzündeten und nicht entzündeten Zellen sehr gering. Folglich beruhte die gemessene mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität der Zellen nach Inkubation mit Sialyl Lewis X darauf, dass FITC-Avidin an den biotinylierten Oligosaccharid-Targeter bindet. Zusätzlich ergaben die Versuche, dass nach Bindung von biotinyliertem Sialyl Lewis X an die Zelloberfläche die Zahl viabler HUVEC sehr stark abnahm. Bei den unbehandelten Zellen waren 75% der Zellen viabil und bei Zellen, die nur mit FITC-Avidin oder nur mit biotinyliertem Sialyl Lewis X behandelt wurden, sank die Viabilität auf knapp 50% und weiter auf knapp 20%, wenn die HUVECs entzündet und danach mit FITC-Avidin inkubiert wurden. Auch bei entzündeten Zellen, die mit biotinyliertem Sialyl Lewis X und FITC-Avidin behandelt wurden, waren nur noch 13,53% aller Zellen viabil. Da in diesem Versuch die Anzahl an viabilen Zellen gegen Ende der Messung stark abnahm und die Gesamtzahl an Zellen so gering war, dass die flowcytometrische Erfassung von 100 Zellen pro Minute nicht mehr möglich war, wurde das Versuchsprotokoll variiert. Es wurde die doppelte Menge an Zellen als auch doppelte Menge an Reagenzien bzw. doppelt so konzentrierte Reagenzien entsprechend dem „alternativen“ Versuchsprotokoll eingesetzt. Es waren zwar mit 16,51% noch immer zu wenig Zellen viabil, aber doch um knappe 3% mehr als vorher. Diese geringfügig erhöhte Viabilität könnte aber auch durch die Reduktion der Inkubationsdauer mit TNF- α auf zwei Stunden und damit einer geringeren Schädigung der Zellen durch TNF- α bedingt sein oder die insgesamt verkürzte Inkubationszeit selbst übte einen positiven Effekt auf die Überlebensrate der Zellen aus. Dass die verkürzte Induktion der Entzündung keinen negativen Einfluss auf die Bindung des Targeters hatte, zeigt Abbildung 10B dadurch, dass bei Anwendung des verkürzten Versuchsprotokolls fast doppelt so viele Zellen fluoreszieren als beim herkömmlichen Protokoll und auch die mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität von 2,04 auf 2,53 gestiegen ist. Zusätzlich wäre auch ein toxischer Effekt der Reagenzien EDAC und NHS denkbar, die während der Kopplung durch Waschen nicht abgetrennt werden konnten und im Reaktionsmedium verblieben. Daher wäre in

weiteren Versuchen, die das Ausmaß der vorliegenden Arbeit übersteigen, eine chromatographische Reinigung vom biotinyliertem Sialyl Lewis X sinnvoll und erst diesen aufgereinigten Liganden mit den Zellen in Kontakt zu bringen.

Für die Versuche mit HUVEctert wurden die verkürzten Aktivierungs- und Kopplungszeiten zur Biotinylierung von Sialyl Lewis X wie bei HUVEC beibehalten, die Zellzahl und Reagenzienmenge wurde aber wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben gewählt und nicht verdoppelt. Die Inkubationszeit mit TNF- α wurde trotzdem von 4 h auf 2 h verkürzt, um eine mögliche Schädigung der Zellen durch TNF- α so gering wie möglich zu halten.

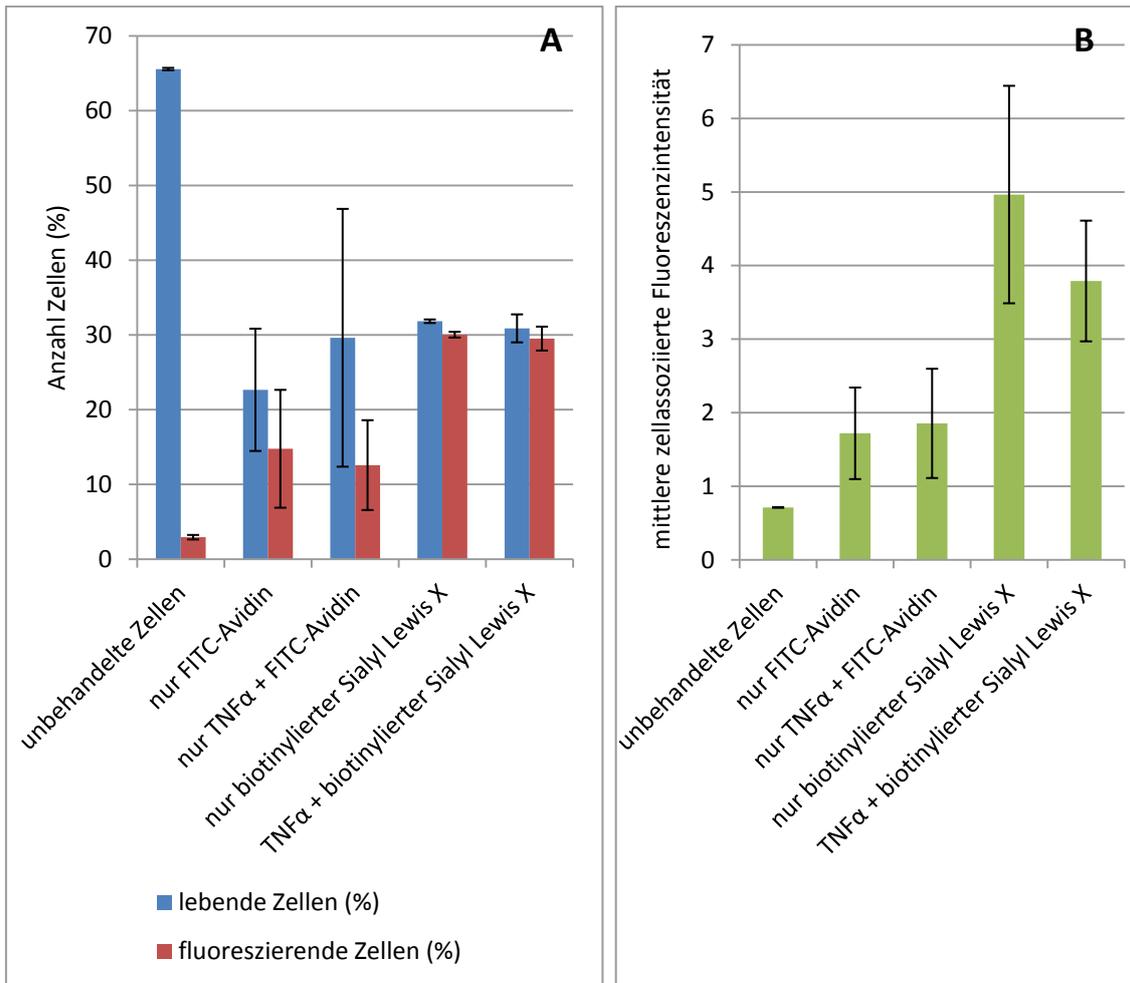


Abbildung 11: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVEctert (A) und mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVEctert (B) nach Entzündung mit TNF- α und Detektion der Entzündung mit biotinyliertem Sialyl Lewis-X/fluoresceinmarkiertem Avidin. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen, nicht entzündete Zellen, die entweder nur mit FITC-Avidin oder biotinyliertem Sialyl-Lewis X inkubiert wurden und entzündete Zellen, die nur mit FITC-Avidin behandelt wurden.

Die Charakterisierung von entzündeten HUVEctert nach Bindung von biotinyliertem Sialyl Lewis X und Detektion mit FITC-Avidin fluoreszieren fast alle lebenden Zellen mit einer mittleren zellassoziierten Fluoreszenzintensität von 3,79 (Abb. 11B). Jedoch auch nicht entzündete HUVEctert, die nur mit biotinyliertem Sialyl Lewis X inkubiert wurden, besaßen diese hohe Viabilität mit einer noch höheren mittleren

zellassozierten Fluoreszenzintensität von fast 5. Unbehandelte Zellen zeigten wie erwartet die höchste Viabilität und eine vernachlässigbare Eigenfluoreszenz. Von Zellen, die nicht mit TNF- α inkubiert wurden, sondern nur mit FITC-Avidin, zeigten 14,77% eine nur geringe mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität von 1,72. Auch von entzündeten, mit FITC-Avidin inkubierten HUVECTert besaßen 12,58% der Zellen eine ähnlich geringe Fluoreszenzintensität von 1,86.

Wie bei den an HUVEC durchgeführten Versuchen, überlebten in allen Ansätzen nur etwa 30% der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit mehr als doppelt so vielen viabilen Zellen. Bei den HUVECTert waren die Unterschiede in der Überlebensrate zwischen entzündeten und nicht entzündeten Zellen sehr gering. Offensichtlich bewirkte die Entzündungsinduktion mit TNF- α eine höhere Überlebensrate als bei HUVEC, jedoch war auch hier der Anteil viabler Zellen geringer als 30%.

Nachdem sich die Bindungsraten von Sialyl Lewis X bei entzündeten und nicht entzündeten HUVECTert sehr ähnlich waren, wurde dieser Versuch mit unbehandelten Zellen als Negativkontrolle wiederholt.

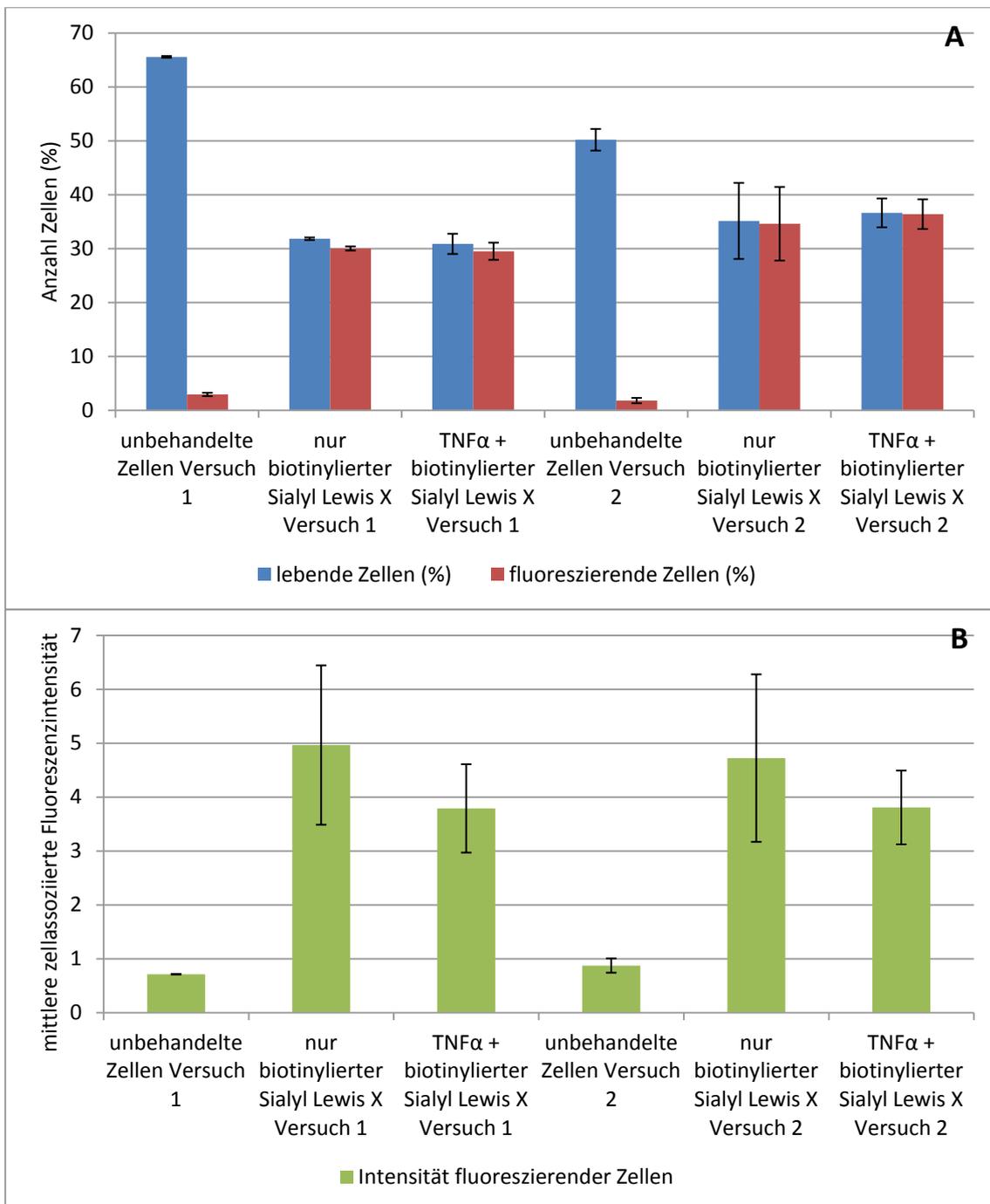


Abbildung 12: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVECTert (A) und durchschnittliche zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVECTert (B) nach Entzündung mit TNF- α und Detektion der Entzündung mit biotinyliertem Sialyl Lewis-X/fluoresceinmarkiertem Avidin. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen und nicht entzündete Zellen, die nur mit biotinyliertem Sialyl Lewis X inkubiert wurden.

Wie auch die vorangegangenen Versuche zeigten, fluoreszierten nahezu alle lebenden HUVECTert nach Inkubation mit biotinyliertem Sialyl Lewis X, jedoch ohne FITC-Avidin-Zusatz unabhängig davon, ob sie entzündet oder nicht entzündet waren. Auch die

durchschnittliche zellassozierte Fluoreszenzintensität war bei nicht entzündeten HUVECTert mit 4,96 im ersten Versuch und mit 4,72 im zweiten Versuch höher als bei entzündeten Zellen mit einer mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensität von 3,79 bzw. 3,81. Zusätzlich wurden im zweiten Versuch die unbehandelten Zellen gleich behandelt und mit Medium bei unterschiedlichen Temperaturen mitinkubiert. Wie erwartet fluoreszierten die unbehandelten Zellen kaum, jedoch bewirkte die lange Inkubationsdauer bei unterschiedlichen Temperaturen eine um 15% geringere Viabilität im Vergleich zum ersten Versuch, wo die Zellen unmittelbar nach der Subkultivierung flowcytometrisch analysiert wurden. Dies bestätigte wieder, dass die lange Zeit der Inkubation allein die Zahl der viablen Zellen um die Hälfte reduzieren konnte.

Zusammenfassend ergab sich aus den Versuchen, dass biotinylierter Sialyl Lewis X mit entzündeten HUVECTert und auch HUVEC interagiert. In diesen flowcytometrischen Versuchen zeigten HUVECTert eine intensivere Bindung und möglicherweise höhere E-Selektin-Expression als HUVEC im Vergleich zur Mikroskopie, wo mit E-Selektin-Antikörper detektiert wurde und HUVEC eine höhere E-Selektin-Expression aufwies als HUVECTert. Bei der flowcytometrischen Analyse zeigten auch nicht entzündete Zellen scheinbar E-Selektin-Expression, die entsprechend den mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensitäten bei entzündeten und nicht entzündeten HUVECTert gleich ist, sowohl in Hinblick auf die Zellzahl als auch die mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität. Bei den nicht entzündeten HUVEC war jedoch die mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität und auch die Zellzahl geringer als bei den Entzündeten.

Ein weiteres Problem lag in der starken Reduktion der Viabilität der Zellen. Dabei ist noch zu klären, ob die mangelnde Viabilität durch die TNF- α Inkubation oder durch nicht vollständig abgetrennte Reagenzien wie EDAC und NHS zustande kam.

Die Versuchsergebnisse ließen erkennen, dass die Zahl der lebenden Zellen durch die Inkubation mit TNF- α sinkt und der Faktor für die Zellen toxisch sein könnte, was jedoch nur für HUVEC zutrifft, da hier die nicht entzündeten Zellen eine viel höhere Überlebensrate zeigten als die Entzündeten. Für HUVECTert trifft diese Schlussfolgerung aber nicht zu, da die Zahl viabler entzündeter HUVECTert höher war

als jene der nicht entzündeten. Insgesamt reagierten primäre Endothelzellen deutlich empfindlicher auf äußere Einflüsse als immortalisierte Endothelzellen, sodass auch der Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die Zahl viabler Zellen wesentlich stärker erkennbar war. Zusätzlich sollte berücksichtigt werden, dass HUVEctert und HUVEC als Endothelzellen für Wachstum und Viabilität eine Oberfläche zum Anheften benötigen. Da Flowcytometrie nur in Suspension durchgeführt werden kann und den Endothelzellen dadurch eine Adhäsion - ein morphologisch und möglicherweise auch funktionell entscheidender Parameter - nicht mehr möglich war, könnte durch das Fehlen der Adhäsionsoberfläche die Lebenszeit der Zellen stark eingeschränkt worden sein. Ein Hinweis auf eine durch die Suspensionskultur bedingte Änderung der Funktionalität könnte die unerwartet hohe Bindungsrate von biotinyliertem Sialyl Lewis X an nicht entzündete HUVEctert sein, die mit jener von Entzündeten vergleichbar war. Möglicherweise führte die Änderung der Kulturbedingungen zu ähnlichen Effekten wie die Induktion einer Entzündung durch TNF- α .

Daher sollten weiterführenden Untersuchungen nicht in Suspension sondern beispielsweise in 96well-Platten mit Oberflächenbeschichtung durchgeführt werden, um den Endothelzellen die Möglichkeit zu geben, sich an einer Oberfläche anzuheften. Damit die potentielle Cytotoxizität der Kopplungsreagenzien reduziert wird, sollte biotinylierter Sialyl Lewis X vor Kontakt mit den Zellen chromatographisch gereinigt werden.

4.2 Herstellung von TAAc-hältigen PLGA-Mikropartikeln

4.2.1 Variation der Herstellungsparameter

Ein entscheidendes Kriterium bei der Herstellung von Mikropartikeln in dieser Arbeit ist ihre Größe. Die später geplante Anwendung in der Blutbahn erlaubt eine mittlere Größe von maximal 3 μm , da Blutgefäße einen durchschnittlichen Durchmesser von 5-6 μm aufweisen und eine i.v. Applikation von größeren Mikropartikeln zu Beeinträchtigungen im Blutfluss bis zum Verstopfen von Blutgefäßen mit entsprechend schwerwiegenden Folgen führen könnte. Die Größe von Mikropartikeln ist von verschiedenen Parametern wie PLGA-Konzentration, TAAc-Konzentration, Art und Konzentration des Tensids und Intensität des Emulgierens abhängig, die bei der Herstellung variiert werden können. Alle Mikropartikel wurden mit BODIPY als Fluoreszenzmarker zur Sichtbarmachung markiert und nach der Herstellung durch Waschen gereinigt.

Tabelle 1: Mittlerer Volumendurchmesser von PLGA-Mikropartikeln, die mit unterschiedlichen PEMA Konzentrationen hergestellt wurden.

Tensid	Konzentration (%)	Gerät	Intensität	Zeit (Minuten)	PLGA (mg)	Volume Weighted Mean (μm)
PEMA	4	Ultraschallstab	80%	10	100	8,299
PEMA	5	Ultraschallstab	80%	10	100	7,582

Zunächst wurde für die Herstellung von PLGA-Partikeln das Tensid Poly(ethylen-alt-maleic) acid (PEMA) verwendet, da es im Vergleich zu PVA einen entscheidenden Vorteil bietet: Bei Einsatz von PVA als Stabilisator bleiben, trotz sorgfältigen Waschens, Tensidrückstände an der Oberfläche der Partikel zurück, die die Kopplungseffizienz abschwächen [7]. PEMA hingegen besitzt frei zugängliche Carboxylgruppen, die als zusätzliche Ankerpunkte bei Kopplungen fungieren können [19].

Ausgehend von Erfahrungswerten wurde in Vorversuchen PEMA in Konzentrationen von 1% bis 5% eingesetzt. Wie die Mikroskopie der Partikel ergab, entstanden bei niedrigen PEMA-Konzentrationen im Bereich von 1% - 3% jedoch relativ große Partikel mit einer breiten, inhomogenen Größenverteilung. Bei Zusatz von 4% bzw. 5% Tensid

resultierten zwar Mikropartikel mit homogenerer Korngrößenverteilung, jedoch waren sie mit 8,299 μm und 7,582 μm für unsere Zwecke trotzdem noch zu groß (Tab. 1). Es wurde hier auch offensichtlich, dass die Menge des Tensids entscheidend für die Größe der Partikel ist und dass die Partikelgröße mit steigender Tensidmenge sinkt. Da die Mikropartikel bei Erhöhung der PEMA-Konzentration von 4% auf 5% nur um etwa 1 μm kleiner wurden und mit 80% Intensität die maximale Intensität des Ultraschallstabes nahezu erreicht war, wurde das Tensid PEMA gegen PVA 40-88 getauscht. Die Bearbeitung der Emulsion mit dem Ultraschallstab wurde gleich beibehalten. Nachdem laut Erfahrung die Tensidwirkung von PVA 40-88 stärker ist, wurde die Intensität des Beschallens auf 50% verringert.

Tabelle 2: Mittlerer Volumendurchmesser von PLGA-Mikropartikeln, die mit unterschiedlichen PVA 40-88 Konzentrationen hergestellt wurden.

Tensid	Konzentration (%)	Gerät	Intensität	Zeit (Minuten)	PLGA (mg)	Volume Weighted Mean (μm)
PVA 40-88	1	Ultraschallstab	50%	10	100	0,28
PVA 40-88	0,5	Ultraschallstab	50%	10	100	0,32

Aus den Daten in Tabelle 2 wird evident dass bei Verwendung von PVA 40-88 im Vergleich zu PEMA die Größe der Partikel enorm auf ungefähr 0,3 μm sank, obwohl hier die Konzentration von PVA nur ein Fünftel bzw. ein Zehntel war und auch die Intensität des Ultraschallstabes um 30% reduziert wurde. Die Größe dieser „Nanopartikel“ wurde im Zetasizer Nano ZS von Malvern (Worcestershire, England) ermittelt, da erfahrungsgemäß eine Größe von weniger als 1 μm zu erwarten war. Zusätzlich bestand auch ein vernachlässigbarer Größenunterschied bei 50% Intensität des Ultraschallstabes, wenn zusätzlich die Konzentration des Tensids PVA 40-88 variiert wurde. Um Mikropartikel von 1-2 μm Durchmesser herzustellen, könnte die Konzentration von PVA 40-88, die Intensität oder Zeit des Emulgierens verringert oder auch vom Ultraschallstab zum Ultraturrax wegen seines geringeren Durchmischungseffektes, gewechselt werden.

Tabelle 3: Mittlerer Volumendurchmesser von PLGA-Mikropartikeln, die mit unterschiedlicher Dispergierintensität, Tensid- und Polymerkonzentration hergestellt wurden.

Tensid	Konzentration (%)	Gerät	Stufe	Zeit (Minuten)	PLGA (mg)	Volume Weighted Mean (μm)
PVA 40-88	0,5	Ultraturrax	5	10	100	0,5
PVA 40-88	0,1	Ultraturrax	3	10	100	1,342
PVA 40-88	0,05	Ultraturrax	3	5	100	1,943
PVA 40-88	0,01	Ultraturrax	1	5	30	4,049

Um die gewünschte Partikelgröße zu erhalten, wurde statt des Ultraschallstabes ein Ultraturrax verwendet und sowohl die Intensität als auch die Dispergierdauer variiert. Zusätzlich wurde PVA in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt.

Wie die Ergebnisse in Tabelle 3 bestätigen, war der Dispergierereffekt vom Ultraturrax geringer als jener des Ultraschallstabes. Die erreichten Partikelgrößen bewiesen deutlich erkennbar die breite Anwendbarkeit des Ultraturrax, die den Mikro- und Nanopartikelbereich umfasst und wo mit zunehmender Intensität auch die Partikelgröße abnahm. Beispielsweise entstanden bei Stufe 5 und 10 Minuten Emulgierzeit Partikel mit einem Durchmesser von 0,5 μm . Bei Anwendung von Stufe 3, auch zehn Minuten durchmischt, stieg der Partikeldurchmesser auf 1,342 μm . Bei konstanter Dispergierintensität auf Stufe 3 und Verlängerung der Dispergierdauer von fünf auf zehn Minuten nahm der Partikeldurchmesser von 1,943 μm auf 1,342 μm ab. Doch bei letzterer Partikelcharge wurde auch gleichzeitig die Konzentration des Tensids gesenkt, da der Partikeldurchmesser mit steigender Tensidkonzentration abnimmt. Die starke Auswirkung der Dispergierintensität des Ultraturrax auf die Partikelgröße wurde auch an jener Partikelcharge erkennbar, bei deren Herstellung zwar die Tensidkonzentration auf 0,01% gesenkt wurde und daher kleinere Partikel ergeben sollte, wo aber eben auch die Intensität auf Stufe 1 herabgesetzt wurde, sodass die Partikel mit 4,049 μm fast doppelt so groß waren als jene Partikel, die mit 0,05% PVA, bei Stufe 3 und 5 Minuten Dispergierdauer hergestellt wurden. Gleichzeitig wurde bei diesen Partikeln auch die PLGA-Konzentration von 100 mg auf 30 mg reduziert, wobei ein Effekt auf die Größe erst in späteren Versuchen sichtbar wird. Nachdem die Partikel mit einer Größe von 1,943 μm schon im gewünschten Bereich lagen und die Dispergierdauer keine so große Rolle spielt, wurde bei der weiteren

Herstellung von Mikropartikeln der Ultraturraax bei Stufe 3 für eine Dauer von fünf Minuten zur Dispergierung eingesetzt.

Zusätzlich wurde der Effekt der beiden Tenside PVA 4-88 und PVA 40-88 verglichen, um einen möglichen Einfluss auf die Größe der Partikel zu erkennen. Die beiden Tenside unterscheiden sich in ihrer Viskosität, welche in der Typenbezeichnung angegeben wird: die an erster Stelle genannte Zahl steht für die Viskosität einer 4%igen wässrigen Lösung bei 20°C und beträgt für PVA 4-88 etwa 4 mPa·s und für PVA 40-88 etwa 40 mPa·s.

Tabelle 4: Mittlerer Volumendurchmesser von PLGA-Mikropartikeln, die mit unterschiedlichen Tensiden (PVA 4-88 und PVA 40-88) hergestellt wurden.

Tensid	Konzentration (%)	Gerät	Stufe	Zeit (Minuten)	PLGA (mg)	Volume Weighted Mean (µm)
PVA 4-88	0,05	Ultraturrax	3	5	100	1,852
PVA 40-88	0,05	Ultraturrax	3	5	100	1,943

Da sich die mittlere Größe der Partikel bei gleicher Konzentration, gleicher Intensität des Ultraturrax und gleicher Dispergierdauer nur geringfügig veränderte, wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, wurde die Verwendung von PVA 40-88 beibehalten.

4.2.2 Variation des PLGA/TAAc Verhältnisses

Aufgrund der vorangegangenen Versuche konnten die Herstellungsparameter derart abgeändert werden, dass die mittlere Partikelgröße im gewünschten Bereich liegt. Um aber abschätzen zu können, inwiefern der Einbau von TAAc und die damit verbundene Verringerung der PLGA-Konzentration, die wiederum für die Einbaurrate von TAAc verantwortlich ist, die Partikelgröße verändert, wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

Tabelle 5: Mittlerer Volumendurchmesser von PLGA-Mikropartikeln mit und ohne TAAc-Zusatz bei unterschiedlichen PVA 40-88 Konzentrationen.

Tensid	Konzentration (%)	Gerät	Stufe	Zeit (Minuten)	PLGA (mg)	TAAc (mg)	Volume Weighted Mean (μm)
PVA 40-88	0,05	Ultraturrax	3	5	100		1,943
PVA 40-88	0,05	Ultraturrax	3	5	100	20	1,863
PVA 40-88	0,1	Ultraturrax	3	5	100	20	1,829
PVA 40-88	0,05	Ultraturrax	3	5	30		1,404
PVA 40-88	0,05	Ultraturrax	3	5	30	20	1,546

Wurden alle Parameter bei der Partikelherstellung gleich gehalten und nur zusätzlich 20 mg TAAc zugegeben, nahm die Partikelgröße geringfügig von 1,943 μm auf 1,863 μm ab (Tabelle 5), was bei einer Größe von 1,943 μm bei TAAc-freien Mikropartikeln sogar von Vorteil war.

Eine Verdoppelung der Tensidkonzentration im Ansatz von TAAc-hältigen PLGA-Mikropartikeln bewirkte eine weitere, aber nahezu vernachlässigbare Abnahme des Partikeldurchmessers auf 1,829 μm . Da PVA 40-88 in Wasser relativ schwer löslich ist und bei niedrigeren Konzentrationen möglicherweise auch weniger Tensid auf der Oberfläche der Partikel zurückbleibt, was für eine weitere Derivatisierung der Partikeloberfläche vorteilhaft wäre [7], wurde aufgrund der geringen Unterschiede in der Größe eine Konzentration von 0,05% PVA 40-88 beibehalten.

Nach diesem geeigneten Protokoll wurden in der folgenden Versuchsreihe Mikropartikel hergestellt, wo im gleichen Volumen an Stelle von 100 mg PLGA nur 30 mg PLGA eingesetzt wurden. Dadurch war etwa nur ein Drittel der PLGA-Menge in den

„Mikrotröpfchen“ enthalten und der Partikeldurchmesser sank beträchtlich von 1,943 μm auf 1,404 μm (Tabelle 5). Wurden nun in der organischen Phase zusätzlich 20 mg TAAc gelöst, nahm die Partikelgröße im Vergleich zu den TAAc-freien Mikropartikeln von 1,404 μm auf 1,546 μm zu. Der Vergleich von zwei Partikelchargen, die aus jeweils 20 mg TAAc und einmal 100 mg und einmal 30 mg PLGA hergestellt wurden, nahm - bedingt durch die geringere Polymermenge - auch die Größe von 1,863 μm auf 1,546 μm ab. Zusätzlich dürfte aufgrund von Erfahrungswerten eine Reduktion der PLGA Konzentration von 100 mg auf 30 mg auch die Einbaurate von TAAc in die Mikropartikeln erhöhen. Da so der mittlere Partikeldurchmesser nur geringfügig ansteigt, gleichzeitig aber die Einbaurate des Wirkstoffes erhöht wird, wurden TAAc-PLGA Mikropartikel nach diesem Protokoll hergestellt und näher charakterisiert. Bisher wurde die Partikelgröße mittels Laserdiffraktometrie bestimmt. Aber um diese Ergebnisse zu bestätigen und Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit der Mikropartikel zu sammeln, wurden diese im Elektronenmikroskop analysiert.

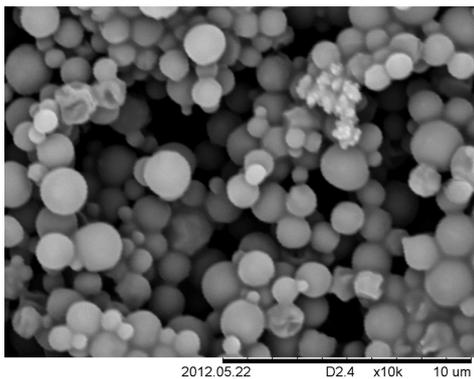


Abb. 13: elektronenmikroskopische Aufnahmen von TAAc-PLGA Mikropartikeln

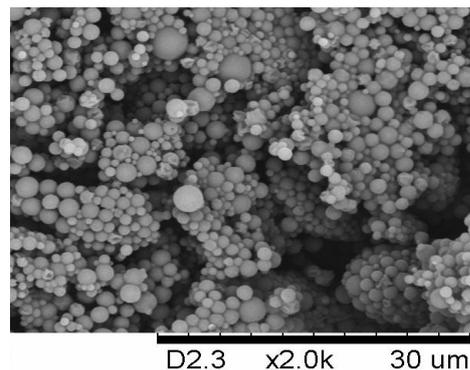


Abb. 14: elektronenmikroskopische Aufnahmen von TAAc-PLGA Mikropartikeln

Abbildung 13 und 14 zeigen die elektronenmikroskopischen Bilder von TAAc-PLGA Mikropartikeln (20 mg TAAc, 30 mg PLGA, 0,05% PVA 40-88, Ultraturax Stufe 3, fünf Minuten, BODIPY) bei unterschiedlicher Vergrößerung. Diese Aufnahmen bestätigten die Ergebnisse der Größenbestimmung mittels Laserdiffraktometrie und die Partikel zeigten eine glatte Oberfläche.

➤ TAAc-Gehalt in Mikropartikel:

Der Wirkstoffgehalt dieser TAAc-PLGA Mikropartikel (20 mg TAAc, 30 mg PLGA, 0,05% PVA 40-88, Ultraturrax Stufe 3, fünf Minuten, BODIPY) wurde mittels HPLC-Analyse anhand einer TAAc-Eichgeraden bestimmt (siehe Kapitel 3.2.4.2) und betrug für die unverdünnte Probe 57,68 µg TAAc pro ml PLGA-Mikropartikelsuspension.

➤ PLGA-Gehalt in Mikropartikel:

Der Gehalt an PLGA in TAAc-PLGA Mikropartikeln (20 mg TAAc, 30 mg PLGA, 0,05% PVA 40-88, Ultraturrax Stufe 3, fünf Minuten, BODIPY) wurde ebenfalls mittels HPLC Analyse über den Glykolsäuregehalt der hydrolysierten Mikropartikel anhand einer Eichgeraden ermittelt (siehe Kapitel 3.2.4.2) und betrug 170 µg/ml für die Partikelsuspension.

➤ Einbaurrate von TAAc in PLGA-Mikropartikel:

Die Einbaurrate von TAAc in PLGA-Mikropartikel stellt deshalb ein wichtiges Charakteristikum dar, weil die Wirksamkeit von TAAc-PLGA Mikropartikeln proportional zur Einbaurrate ist und sowohl für die spätere Anwendbarkeit als auch für Herstellung aus ökonomischer Sicht wichtig ist. Die Einbaurrate von eingesetztem TAAc in PLGA-Mikropartikel betrug 33,93%, sodass die Mikropartikel zu 25% aus TAAc und 75% aus PLGA bestanden. Diese Mikropartikelcharge ist damit eine gute Ausgangsbasis für die weitere Entwicklung dieses Konzeptes.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Deutsch

Zur Therapie von Entzündungen des Endothels stellt das Glukokortikoid Triamcinolonacetonid einen geeigneten Wirkstoff dar. Um nun diesen Wirkstoff zielgerichtet an den Wirkort zu transportieren und dadurch die Wirkung zu erhöhen oder zu verlängern und gleichzeitig die Nebenwirkungen gering zu halten, wird TAAc in Mikropartikel eingebaut.

Durch vielfältige Variation der Herstellungsparameter ist es schließlich gelungen, biodegradierbare PLGA-Mikropartikel mit einem Durchmesser von 1,5 μm herzustellen, die zu 25% aus Wirkstoff und zu 75% aus Polymer bestehen bei einer Einbaurate von ca. 34%. Sowohl die Größe als auch die Oberflächenbeschaffenheit der Mikropartikel konnte zusätzlich durch Elektronenmikroskopie bestätigt werden.

Um die Interaktion von kortikoidbeladenen Mikropartikeln mit entzündetem Gewebe ex-vivo charakterisieren zu können, sollte ein Endothelzell-Modell entwickelt werden. Die Kultivierung von Zellmonolayern der immortalisierten Endothelzelllinien HUVEctert und HMEC, sowie von primären Endothelzellen (HUVEC) gelang nach Fibronectinbeschichtung sowohl im flexiPERM micro 12 System als auch in PDMS-Kanälen. Durch Behandlung mit TNF- α konnte bei HUVEctert und HUVEC eine Entzündung induziert werden, die sowohl qualitativ mikroskopisch nach Immunfluoreszenzfärbung von exprimiertem E-Selectin als auch quantitativ in Suspensionskulturen flowcytometrisch nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu konnte bei HMEC keine Entzündung induziert werden. Insgesamt konnten bei primären Endothelzellen mehr Zellen bei höherer Viabilität entzündet werden als bei HUVEctert.

Diese positiven Nachweise der Entzündung dienten als Basis für die Weiterentwicklung des Konzeptes des E-Selektin-Targetings. Dieses Protein wird bei Entzündung von Endothelzellen exprimiert bzw. auch sezerniert und besitzt als spezifischen Liganden das Oligosaccharid Sialyl Lewis X. Zum Nachweis der Target-Liganden-Interaktion wurde biotinylierter Sialyl Lewis X mit entzündeten HUVEctert und HUVEC inkubiert und mit fluoreszenzmarkiertem Avidin detektiert. Die mittels Flowcytometer

quantifizierte höhere mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität bestätigt, dass die Bindung von Sialyl Lewis X an E-Selectin von entzündeten Endothelzellen und deren Detektion über eine Biotin-Avidin Bindung prinzipiell erfolgreich war und der „proof-of-concept“ gelungen ist.

Ein weiterführenden Arbeiten vorbehaltenes Thema stellt die stark reduzierte Zahl an viabilen Zellen nach Induktion der Entzündung dar. Entgegen den physiologischen Gegebenheiten wurden die Endothelzellen aufgrund der vorhandenen apparativen Möglichkeiten in Suspension untersucht, was per se zu einer Einschränkung der Viabilität führen könnte. Zusätzlich wurde ungereinigtes Biotinyl-Sialyl Lewis X eingesetzt, das noch Reste der möglicherweise toxischen Kopplungsreagentien enthielt. Daher sollten weiterführende Untersuchungen an Zellmonolayern, beispielsweise in 96well-Platten mit Oberflächenbeschichtung durchgeführt werden und chromatographisch gereinigter Ligand eingesetzt werden.

5.2 Englisch

Triamcinolone acetonide (TAAc), a glucocorticoid, represents a well established and safe active pharmaceutical ingredient for treatment of inflamed endothelia. In order to deliver this drug to its intended site of action and concurrently reduce dosage and side effects, TAAc loaded microparticles were prepared as a first step in the concept of targeted drug delivery.

By varying and fine tuning the preparation parameters of the solvent evaporation technique finally TAAc-loaded biodegradable PLGA microparticles with a mean volume diameter of 1.5 μ m were obtained that consisted of 25% TAAc and 75% PLGA. The encapsulation efficiency was 34%. Scanning electron images of these microparticles confirmed the size determinations done by laser diffractometry and revealed a smooth surface of the microparticles.

In order to be able to characterize the interaction of the microparticles with inflamed tissue, an ex-vivo model for inflamed endothelium was established. Using primary human endothelial cells (HUVEC) as well as immortalized cells (the cell lines HUVECtert and HMEC) adherent monolayers were cultivated in the flexiPERM micro 12 system as well as in PDMS-channels after coating with fibronectin. Treating the cells with TNF- α provoked inflammation of HUVEC and HUVECtert as confirmed by microscopy after immunofluorescent staining of the expressed cell adhesion molecule E-selectin with fluorescent labeled antibody as well as flow cytometric analysis. These assays also revealed that primary cells were more likely to be inflamed at a higher ratio of viable cells than immortalized HUVECtert. In case of HMEC this kind of treatment did not provoke inflamed cells.

As a next step towards targeted delivery, the interaction between the target molecule E-selectin, which is expressed and/or secreted by endothelial cells after inflammation, and its oligosaccharide-type ligand Sialyl Lewis X was investigated. For detection of cell binding biotinylated Sialyl Lewis X was prepared. Flow cytometry of inflamed HUVEC and HUVECtert incubated with the biotinylated targeter and FITC-Avidin revealed that the mean cell-associated fluorescence intensity of inflamed cells was higher than that of healthy cells indicating proof-of-concept.

Nevertheless there remain challenges for future work. A key issue will be to increase the number of viable inflamed cells. In contrast to physiology, suspensions of endothelial cells were used in the assays due to available analytical equipment instead of monolayers which might reduce viability per se. Additionally biotinylated Sialyl Lewis X was applied without any further chromatographic purification so that residual potentially toxic cross-linking agents were present. To solve this problem, the assays should be repeated on monolayers after coating the wells and the targeter should be purified.

6 ANHANG A

A 4.1.2 Entzündung von Endothelzellen

Tabelle 6: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVECTert und mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVECTert nach Entzündung mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen (Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoresceinmarkiertem E-Selectin-Antikörper (Inkubation 1,5 Stunden) im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen mit 50 ng/ml TNF- α ohne Antikörperzusatz.

	lebende Zellen (%)	lebende, fluoreszierende Zellen (%)	mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität lebender, fluoreszierender Zellen
unbehandelte Zellen	77,09	1,40	0,76
5 ng/ml TNF- α +AK	69,04	8,09	10,30
10 ng/ml TNF- α +AK	61,76	8,78	13,70
25 ng/ml TNF- α +AK	56,40	9,59	10,58
50 ng/ml TNF- α ohne AK	73,19	2,22	0,73

Tabelle 7: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVECTert und mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVECTert nach Entzündung mit TNF- α (50ng/ml, Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoresceinmarkiertem E-Selectin-Antikörper (5 μ l, Inkubation 2 oder 4 Stunden) im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen, die entweder nur mit TNF- α oder E-Selectin -Antikörper behandelt wurden.

	lebende Zellen (%)	lebende, fluoreszierende Zellen (%)	mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität lebender, fluoreszierender Zellen
unbehandelte Zellen	77,09	1,40	0,76
TNF- α ohne AK	65,83	4,25	0,79
ohne TNF- α + AK 4 h	23,60	1,97	26,83
TNF- α + AK 2 h	67,36	17,68	6,85
TNF- α + AK 4 h	32,36	8,42	25,23

Tabelle 8: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVEC und mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVEC nach Entzündung mit TNF- α (50ng/ml, Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoresceinmarkiertem E-Selectin-Antikörper (5 μ l, Inkubation 2 oder 4 Stunden) im Vergleich zu unbehandelten und Zellen, die entweder nur mit TNF- α oder E-Selectin-Antikörper inkubiert wurden.

	lebende Zellen (%)	lebende, fluoreszierende Zellen (%)	mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität lebender, fluoreszierender Zellen
unbehandelte Zellen	76,16	0,19	0,91
TNF- α ohne AK	37,84	0,12	1,29
ohne TNF- α + AK 4 h	28,03	0,42	4,94
TNF- α + AK 2 h	30,68	12,27	6,11
TNF- α + AK 4 h	30,88	14,13	6,34

A 4.1.3 Bindung von biotinyliertem Sialyl Lewis X an Endothelzellen

Tabelle 9: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVEC und mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVEC nach Entzündung mit TNF- α und Detektion der Entzündung mit biotinyliertem Sialyl Lewis X/fluoresceinmarkiertem Avidin. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen, nicht entzündete Zellen, die entweder nur mit FITC-Avidin oder biotinyliertem Sialyl Lewis X inkubiert wurden und entzündeten Zellen, die nur mit FITC-Avidin behandelt wurden. Der Index „alt“ weist auf das alternative Versuchsprotokoll, wie oben im Text beschrieben, hin.

	lebende Zellen (%)	lebende, fluoreszierende Zellen (%)	mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität lebender, fluoreszierender Zellen
unbehandelte Zellen	76,16	0,193	0,911
FITC-Avidin	52,55	2,50	1,51
TNF- α + FITC-Avidin	20,47	5,23	1,57
biotinylierter Sialyl Lewis X	48,34	15,07	1,42
TNF- α + biotinylierter Sialyl Lewis X	13,53	8,44	2,04
TNF- α + biotinylierter Sialyl Lewis X alt	16,51	13,99	2,53

Tabelle 10: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVECTert und mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVECTert nach Entzündung mit TNF- α und Detektion der Entzündung mit biotinyliertem Sialyl Lewis X/fluoresceinmarkiertem Avidin. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen, nicht entzündete Zellen, die entweder nur mit FITC-Avidin oder biotinyliertem Sialyl Lewis X inkubiert wurden und entzündete Zellen, die nur mit FITC-Avidin behandelt wurden.

	lebende Zellen (%)	lebende, fluoreszierende Zellen (%)	mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität lebender, fluoreszierender Zellen
unbehandelte Zellen	65,57	2,94	0,713
FITC-Avidin	22,66	14,77	1,72
TNF- α + FITC-Avidin	29,62	12,58	1,86
biotinylierter Sialyl Lewis X	31,83	30,03	4,97
TNF- α + biotinylierter Sialyl Lewis X	30,88	29,51	3,79

Tabelle 11: Prozentanteil lebender und lebender, fluoreszierender HUVECTert und mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVECTert nach Entzündung mit TNF- α und Detektion der Entzündung mit biotinyliertem Sialyl Lewis X/ fluoresceinmarkiertem Avidin. Als Vergleich dienten unbehandelten Zellen und nicht entzündete Zellen, die nur mit biotinyliertem Sialyl Lewis X inkubiert wurden.

	lebende Zellen (%)	lebende, fluoreszierende Zellen (%)	mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität lebender, fluoreszierender Zellen
unbehandelte Zellen	50,20	1,8	0,873
biotinylierter Sialyl Lewis X	35,14	34,61	4,72
TNF- α + biotinylierter Sialyl Lewis X	36,63	36,40	3,81

A 4.2.2 Variation des PLGA/TAAc Verhältnisses

Tabelle 12: Kalibration von TAAc in ACN mittels HPLC (ACN/H₂O = 90/10).

TAAc ($\mu\text{g/ml}$)	Peakfläche
2	102,62
5	235,61
10	450,86
15	681,32
20	866,25
25	1110,38
30	1335,42
40	1751,95
50	2210,34

Abbildung 15: Kalibrationsgerade von TAAc in ACN mittels HPLC (ACN/H₂O = 90/10).

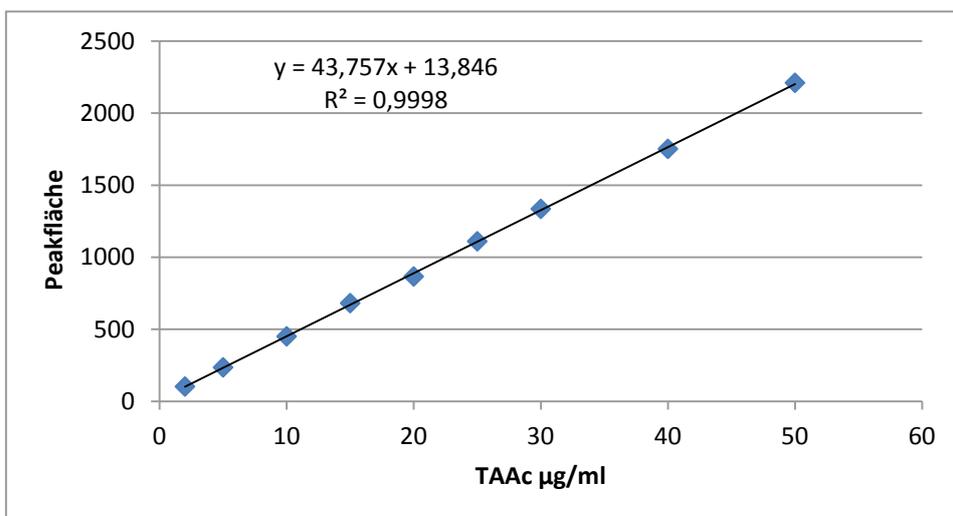


Tabelle 13: TAAc-Gehalt der Mikropartikel (Ausgangsmenge: 20 mg TAAc, 30 mg PLGA)

Verdünnungsgrad	Probe	Injection	Retentionszeit	Peakfläche	TAAc (µg/ml)
unverdünnt	Vial 1	1	2,87	2537,58	57,69
		2	2,87	2534,7	57,62
	Vial 2	1	2,87	2548,91	57,94
		2	2,86	2528,06	57,48
	Mittelwert		2,87	2537,31	57,68
	Standard-abweichung			8,70	0,193
1:1 verdünnt	Vial 3	1	2,87	1222,9	27,64
		2	2,87	1223,31	27,65
	Vial 4	1	2,87	1221,07	27,59
		2	2,87	1222,92	27,67
	Mittelwert		2,87	1222,55	27,63
	Standard-abweichung			0,87	0,030

Tabelle 14: PLGA Gehalt der Mikropartikelpräparation (Ausgangsmenge: 20 mg TAAc, 30 mg PLGA)

	Peakfläche	GA (mg/ml)	PLGA (mg/ml)	Mittelwert	Mittelwert
Probe 1	550,11	0,084	0,143		
	563,05	0,086	0,147	0,145	
Probe 2	730,02	0,112	0,192		
	755,28	0,116	0,199	0,196	0,17

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
Aqua bidest.	Aqua bistillata
BODIPY	4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
BSA	Bovine Serum Albumin
ECGS	Endothelial cell growth supplement
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGM-2	Endothelial growth medium-2
FBS	Fetal bovine serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Forward scatter
HBR	Bromwasserstoff
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HMEC	human dermal microvascular endothelial cells, immortalisiert
HPLC	High pressure liquid chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
HUVECtert.	HUVEC mit humaner Telomerase Reverse Transkriptase immortalisiert
IgG	Immunglobulin G
LAF	Laminar Air Flow
M199	Bio Whittaker® Medium 199
NHS	N-Hydroxysuccinimid
pBPB	para-Bromphenacylbromid
PBS	Phosphate buffered saline
PBS Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Phosphate buffered saline mit Calcium und Magnesium
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEMA	Polyethylmethacrylat
PLGA	Poly (D,L-laktid-co-glykolid)
PVA	Polyvinylalkohol
UpM	Umdrehungen pro Minute
SS	Side scatter
TAAc	Triamcinolonacetonid
TEA	Triethylamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S.K. Sahoo, V. Labhasetwar, Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today* 8 (2003), 1112-1120
- [2] P. Langguth, G. Fricker, H. Wunderli-Allenspach, *Biopharmazie*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2004
- [3] F. Roth-Walter, I. Schöll, E. Untersmayr, A. Ellinger, G. Boltz-Nitulescu, O. Scheiner, F. Gabor, E. Jensen, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Mucosal targeting of allergen-loaded microspheres by *Aleuria aurantia* lectin, *Vaccine*, 23 (21) (2005), 2703-2710
- [4] C. Dallas, *Crashkurs Pharmakologie*, 3., überarbeitete Auflage, 2011, München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 131-135
- [5] K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, 9., völlig überarbeitete Auflage, 2005, München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 670-682
- [6] M. Prantl, *Etablierung und Charakterisierung eines artifiziellen Endothels in 3D – Mikrokanälen*, Diplomarbeit, Universität Wien, 2011
- [7] M.E. Keegan, S.M. Royce, T. Fahmy, W.M. Saltzman, In vitro evaluation of biodegradable microspheres with surface-bound ligands, *J. Control. Release* 110 (2006), 574-580
- [8] Jain RA, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials* 21 (2000), 2475 – 2490
- [9] M.D., Blanco, M.J., Alonso, Development and characterization of protein-loaded poly-(lactide-co-glycolide)nanospheres, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43 (1997), 287-294
- [10] K.A. Althansiou, G.G. Niederauer, C.M. Agrawal, Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical application of polylactic acid/polyglycolic acid and copolymers, *Biomaterials* 17 (1996), 93-102
- [11] T. Nakamura, S. Hitomi, S. Watanabe, Bioabsorption of polylactides with different molecular properties, *J. Biomed. Mater. Res.* 23 (1989), 1115-1130

- [12] M. Asano, H. Fukuzaki, M. Yoshida, In-vivo characteristics of low molecular weight copoly (D, L-Lactic acid) formulations with controlled release of LHRH agonist, *Biomaterials* 10 (1989), 569-573
- [13] G. Ratzinger, C. Fillafer, V. Kerleta, M. Wirth, F. Gabor, The role of surface functionalization in the design of PLGA micro- and nanoparticles. *Crit. Rev. Ther. Drug* 27 (1) (2010), 1–83
- [14] E. Jubeli, et al., E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging, *J. Control. Release* (2011), 194-206
- [15] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996
- [16] www.malvern.com
- [17] www.carbosynth.com
- [18] M.N. Fukuda, C. Ohyama, et al., A Peptide Mimic of E-Selectin Ligand Inhibits Sialyl Lewis X-dependent Lung Colonization of Tumor Cells, *Cancer Research* 60 (2000), 450-456
- [19] M.E. Keegan, J.L. Falcone, T.C. Leung, et al., Biodegradable microspheres with enhanced capacity for covalently bound surface ligands, *Macromolecules* 37 (2004), 9779–9784

9 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Stephanie Deinhammer
Geburtsdatum: 11. Oktober 1985
Geburtsort: Wien, Österreich
Staatsbürgerschaft: Österreich

Familie:

Mutter: Margit Deinhammer (* 30. Dezember 1959)
Vater: Herbert Deinhammer (* 20. September 1958)
Bruder: Matthias Deinhammer (* 22. Oktober 1990)

Ausbildung:

Sept. 1992 – Juni 1996: Volksschule der Dominikanerinnen, 1130 Wien
Sept. 1996 – Juni 2004: Gymnasium der Dominikanerinnen, 1130 Wien
Juni 2004: Reifeprüfung
ab Oktober 2004: Pharmaziestudium an der Universität Wien
Dezember 2004: geringfügige Beschäftigung bei Parfümerie Mona, 1180 Wien
ab Februar 2005: Beschäftigung bei Allerheiligen Apotheke, 1200 Wien
September 2011-März 2012: Diplomarbeit am Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien
WS 2011: Tutorin in den Übungen „Anwendung von Zellkulturen in der pharmazeutischen Technologie“ am Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien
WS 2011, SS 2012, WS 2012: Tutorin in den Übungen „Industrielle Arzneimittelherstellung“ am Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien