

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Interaktionen verschiedener Formulierungen von
Poly(n-butylcyanoacrylat)-Nanopartikeln mit der
Blut-Hirn-Schranke *in vivo* und *in vitro*

vorgelegt von
Apothekerin
Isolde Maria Reimold
aus Oberkirch
Tag der mündlichen Prüfung:

Interaktionen verschiedener Formulierungen von
Poly(n-butylcyanoacrylat)-Nanopartikeln mit der
Blut-Hirn-Schranke *in vivo* und *in vitro*

Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker
Prof. Dr. Jürgen Reichling

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Pharmakologie, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gert Fricker, angefertigt.

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne Verwendung anderer als der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen angefertigt wurde und die Arbeit in dieser oder anderer Form an keiner anderen Fakultät als Dissertation eingereicht wurde. Es wurde ferner an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt.

Heidelberg, den

Für meine Familie

*Durch Wissenschaft wird bewiesen,
durch Intuition aber entdeckt.*

Henri Poincaré (1854 - 1912)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gert Fricker für die Überlassung dieses vielschichtigen und faszinierenden Themas, für seine Anregungen und Hilfestellungen bei gleichzeitig gewährtem Freiraum bei der Gestaltung und Durchführung dieser Arbeit, sowie für seine Unterstützung in allen Phasen der Promotionszeit bedanken. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Weiterbildung bei Vorträgen und Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Reichling danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt ferner der NanoDel Technologies GmbH in Magdeburg für die finanzielle Unterstützung der Doktorarbeit.

In den Reihen der NanoDel Technologies GmbH möchte ich mich besonders bedanken bei:

- Frau Diana Domke, die mich immer sowohl mit frischen Nanopartikeln als auch mit vielen sehr bereichernden Gesprächen versorgt hat,
- Prof. Dr. Hans-Eckart Radunz für ein immer offenes Ohr und die vielen Anregungen
- Herrn Dr. Christoph A. Seyfried für seinen Großeinsatz im Labor, die vielen Hilfestellungen und vor allem für seine unerschöpfliche Geduld bei jeglichen Fragen

In Heidelberg möchte ich mich besonders bedanken bei:

- Herrn Ramadan Ali und Herrn Dr. Jürgen Burhenne in der klinischen Pharmakologie für das Durchführen der HPLC-Analysen
- Frau Simone Burghard für die Unterstützung bei vielen Versuchen und die vielen schönen Gespräche
- Frau Sabrina Nickel für ihr Verständnis für jegliche Situationen, sowie für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und die vielen schönen gemeinsamen Stunden
- Frau Dr. Caroline MacLean für die unzähligen aufbauenden Worte während der Endphase und das Korrekturlesen, sowie die lustigen Spieleabende
- Herr Christoph Vogel für die liebe Unterstützung beim Drucken
- Herrn Alberto Onieva Jiménez für seine hervorragende Arbeit in jeglicher Hinsicht und für die vielen schönen gemeinsamen Stunden

- Frau Anita Voigt für das unermüdliche Chromatographieren von NP, ihren großen und sehr produktiven Fleiß und für den großen Spaß bei der Zusammenarbeit
- Frau Catharina Cadmus für das Gefrierschneiden und Chromatographieren
- Frau Sandrine Stiegler für die hervorragende Arbeit in der Zellkultur, für das freiwillige Verlängern ihres Praktikums und die schönen und produktiven „Wissenschaftsfrühstücke“

Ferner möchte ich mich beim gesamten Arbeitskreis bedanken, für die vielen schönen Kaffeepausen, Ausflüge, Weihnachtsfeiern, Gespräche, Kochabende, Unternehmungen in der Heidelberger Innenstadt und dafür, dass immer jemand da ist, der ein offenes Ohr hat und einem weiterhelfen kann. Ich habe mich während der Arbeit immer sehr wohl und gut aufgehoben gefühlt.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Hanna Beier für die vielen schönen und wichtigen Telefonate und dafür dass sie es immer wieder geschafft hat, mich aufzubauen und für das Kommende zu motivieren.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Tanja Meidinger für die aufbauenden Aufenthalte in Florenz und die vielen Gespräche, die mir immer wieder neue Kraft gegeben haben.

Für die immer offenen Ohren meiner Freunde Hannes Kühn, Alexander Büchele, Anna Tewes, Verena Collmer, Simone Hornstein, Carolin Schwab und Kerstin Dörflinger möchte ich mich ebenfalls von Herzen bedanken. Es ist wunderbar, solche Freunde zu haben.

Bei meinen Eltern Waltraud und Kurt Bayer möchte ich mich ganz herzlich für die umfassende Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken. Ohne ihr Zutun wäre diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen. Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Papa für das Korrekturlesen bedanken.

Meinem Bruder Konrad Bayer danke ich besonders für die Organisation eines englischsprachigen Korrektors in letzter Sekunde. Meiner Schwester Judith Horstschäfer möchte ich dafür danken, dass sie mich in meinem Leben immer begleitet und unterstützt hat. Außerdem möchte ich mich bei meiner gesamten Familie für die große Hilfsbereitschaft und die schönen Stunden bedanken, wann immer wir uns treffen oder hören.

Bei meinem Schatz und Ehemann Benjamin Reimold möchte ich mich von ganzem Herzen für die seelische Unterstützung, das hervorragende Essen, das Korrekturlesen, aber auch für sein fast grenzenloses Verständnis bedanken und dafür, dass er immer für mich da ist.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht oder vorgetragen

Reimold, I., Fricker, G.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Gehirngängigkeit von PBCA-Nanopartikeln

10. Treffen der Blut-Hirn Schranke-Experten und Caco-2 Anwender, Bad Herrenalb (2008), Vortrag

Reimold, I., Domke, D., Bender, J., Seyfried, C.A., Radunz, H.E., Fricker, G.

Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 70 (2008) 627-632, Artikel

Reimold, I., Domke, D., Bender, J., Seyfried, C.A., Radunz, H.E., Fricker, G.

A nanoscaled approach to target the central nervous system

11th Symposium of the Blood-Brain Barrier, Amsterdam (2008), Posterpräsentation

Reimold, I., Fricker, G.

A nanoscaled approach to target the central nervous system

Neurex SEISC Meeting „Blood-Brain-Interfaces“, Strasbourg (2009), Vortrag

Fricker, G., Reimold, I., Radunz, H.E.

Drug transport across the Blood-brain barrier by polymeric nanoparticles

2009 AAPS Annual Meeting and Exposition, Los Angeles (2009), Posterpräsentation

Preise

PHOENIX Pharmazie Wissenschaftspreis 2009 in der Kategorie Pharmazeutische Technologie

für

„Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy“

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 70 (2008) 627-632,

Best Paper Award 2008 des European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

für

Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy“

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 70 (2008), 627-632,

Zusammenfassung

Isolde Maria Reimold, Apothekerin, Tag der mündlichen Prüfung:

Interaktionen verschiedener Formulierungen von Poly(n-butylcyanoacrylat) Nanopartikeln mit der Blut-Hirn-Schranke *in vivo* und *in vitro*

1. Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker, 2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Reichling

Krankheiten des Zentralnervensystems (ZNS) können meist nicht zufriedenstellend behandelt werden, da die Blut-Hirn-Schranke (BHS) als Schutzwall das ZNS vor dem Eindringen körperfremder und dadurch vieler Arzneistoffe abschirmt. Nach der Literatur sind beladene, mit Polysorbat 80 (P-80) umhüllte PBCA-NP in der Lage, zentrale pharmakologische Effekte hervorzurufen. Diese Arbeit sollte daher die Interaktion beladener PBCA-NP mit der BHS in mehrerer Hinsicht näher beleuchten.

Zuerst sollte die Passage von mit verschiedenen Modell-Substanzen (FITC-Dextran, Rhodamin 123 und Doxorubicin) beladenen NP durch die BHS *in vivo* dargestellt werden. Dabei war zu untersuchen, ob eine Oberflächenmodifikation mit P-80 essentiell für eine Passage der BHS ist. Anhand von konfokal-mikroskopischen Aufnahmen konnte für alle drei NP-Formulierungen demonstriert werden, dass die PBCA-NP die BHS passieren. Ebenso wurde bewiesen, dass eine Umhüllung der NP mit P-80 unbedingt notwendig für eine Permeation der BHS ist.

Da Doxorubicin cardiotoxisch ist, sollte für die Doxorubicin-NP darüber hinaus untersucht werden, inwieweit sich die Anreicherung des freien Doxorubicins von der des partikulär gebundenen unterscheidet. Die qualitative Analyse legt nahe, dass die partikuläre Form aufgrund einer geringeren lokalen Konzentration des freien Doxorubicins weniger kardiotoxisch ist als die freie Substanz, da Proben mit freiem Doxorubicin eine flächige Fluoreszenz zeigten, während die partikulären Zubereitungen punktuell fluoreszierten.

Im Anschluss wurde die Freisetzung von Doxorubicin aus PBCA-NP *in vitro* in Puffer und Gehirnhomogenat quantitativ bestimmt. Dazu wurde zunächst sowohl eine präparative als auch eine analytische Aufreinigungsmethode für die NP mit Größenausschlusschromatographie etabliert. Die Freisetzung in Puffer war im Gegensatz zum Gehirnhomogenat leicht pH-abhängig, denn bei pH 7,4 war sie größer als bei pH 5. Sie folgte stets einer Kinetik 0. Ordnung.

Im nächsten Teil der Arbeit sollte der Aufnahmemechanismus von NP ins Gehirn am Beispiel Rhodamin 123 beladener NP untersucht werden. Dazu wurde die Interaktion von PBCA-NP mit isolierten Schweinehirn-Kapillarendothelzellen betrachtet. Zunächst wurde der Einfluss von P-80 *Coating* in serumfreiem Medium getestet. Ohne P-80 Modifikation adsorbierten die NP an die Zellen, während mit P-80 die NP eindeutig in die Zellen aufgenommen wurden. Die Literatur enthält Hinweise, dass mit P-80 beschichtete NP durch Adsorption von Apolipoproteinen im Blutstrom per rezeptorvermittelter Endozytose bzw. Transzytose ins Gehirn gelangen können. Weshalb aber eine Aufnahme der gecoateten NP in Abwesenheit von Apolipoproteinen in die Zellen erfolgte, war nun durch Aufnahme-Experimente mit Serumzusatz zu untersuchen. Der Serumzusatz resultierte jedoch in einer massiven Aufnahmehemmung. Möglicherweise führte ein Überangebot an Apolipoproteinen zu einer kompetitiven Hemmung oder aber der Aufnahmemechanismus ist ein gänzlich anderer.

Abschließend wurde mit diesen Primärzellen der AlamarBlue™ Assay durchgeführt, um die Auswirkungen verschiedener PBCA-NP Konzentrationen auf den Zellstoffwechsel zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Inkubation mit PBCA-NP zunächst (bis 120 µg/ml) den Stoffwechsel der PBCEC anregte, dieser dann stagnierte (240-480 µg/ml) und dass bei hohen Konzentrationen (>960 µg/ml) die Zellen starben. Folglich könnte der Aufnahmemechanismus der NP ATP-abhängig sein, denkbar wäre auch eine Entzündungsreaktion. Letzteres erscheint plausibler, da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass der transendotheliale Widerstand primärer Gehirnzell-Monolayer nach Konfrontation mit PBCA-NP zeitweise massiv sank.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die in dieser Dissertation untersuchten PBCA-NP eine Arzneiform darstellen, die zur Behandlung von Erkrankungen des ZNS verwendet werden können, da sie in der Lage sind, die BHS zu passieren, den inkorporierten Wirkstoff nach 0. Ordnung kontrolliert freisetzen und erst in recht hohen Konzentrationen zum Zelltod führen.

Summary

Isolde Maria Reimold, pharmacist, Oral examination:

Interactions of different poly(n-butylcyanoacrylate)-nanoparticle formulations with the blood-brain barrier *in vivo* and *in vitro*

Supervisor: Prof. Dr. Gert Fricker, Co-Supervisor: Prof. Dr. Jürgen Reichling

Many diseases of the central nervous system (CNS) cannot be treated successfully because the blood-brain barrier (BBB) acts as a firewall against both xenobiotics and pharmacologically active substances. The literature includes many reports about how loaded and surface modified poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles may lead to central mediated effects.

Within this body of work, the interaction between loaded PBCA nanoparticles and the BBB *in vivo* and *in vitro* should be elucidated in several aspects. First the passage of nanoparticles loaded with different model compounds (FITC-dextran, rhodamine 123 and doxorubicin) through the BBB *in vivo* was studied. These experiments concentrated on the question of whether surface modification of the nanoparticles with polysorbate 80 is really essential to overcome the BBB. Careful analysis by confocal laser scanning microscopy gave clear evidence that PBCA-nanoparticles passed the BBB. Furthermore it was shown that nanoparticle-coating with p-80 is necessary to overcome the BBB.

Due to the cardio-toxic side effects of doxorubicin, the extent of tissue distribution in the heart was investigated for this formulation of nanoparticles. The effect of free and particle bound doxorubicin was studied. Qualitative analysis of confocal pictures indicated less cardiotoxicity as a result of lower local doxorubicin concentrations for the particle-bound substance than for free doxorubicin. Free doxorubicin showed a more uniform distribution in the tissue, whereas the particle-bound substance exhibited a more punctuated pattern.

Following the *in vitro* release of doxorubicin loaded PBCA nanoparticles was quantified in buffer and brain homogenate. For this purpose a size exclusion chromatography method for preparative and analytical use was established to purify the nanoparticles from remaining free and particle-adsorbed doxorubicin. Compared to the release-properties in brain homogenate, the release in buffer showed a certain pH dependency, because with pH 7,4 the release was slightly more than with pH 5. This release occurred always according to a zero order kinetics. The next section explores the uptake mechanism of rhodamine 123 loaded PBCA nanoparticles by the brain. Therefore, the interaction of these nanoparticles with monolayers of porcine brain capillary endothelial cells (PBCEC) was monitored. First the influence of p-80 coating of PBCA nanoparticles in serum-free medium was tested. Without p-80 modification a strong adsorption of nanoparticles at the cell surfaces was observed whereas with p-80 coating an uptake in the cells could be assessed. In the literature there are some references which indicate that p-80 coated nanoparticles adsorb lipoproteins from the bloodstream on their surface, bind to a lipoprotein-receptor at the BBB and may undergo receptor-mediated endo- or transcytosis and thus pass the BBB. Since the previous experiments were performed in a serum free medium, then the question arises of why the nanoparticles were internalised into the PBCEC even though there were no lipoproteins present. To discover the influence of lipoproteins, serum was added during the experiments. This addition of serum lead to a strong inhibition of nanoparticle uptake to PBCEC. Possibly this occurred due to a competitive inhibition through lipoproteins present in serum or the uptake-mechanism could be completely different.

Finally the AlamarBlue™ Assay was performed to investigate the influence of different PBCA nanoparticle concentrations of unloaded nanoparticles on PBCEC metabolism. Results showed an increase of cell metabolism up to a certain nanoparticle concentration (15-120 µg/ml) followed by a stagnancy during higher concentrations (240-480 µg/ml) to the point of a breakdown and cell-death at high concentrations (960-2000 µg/ml). The reason for an increase of cell metabolism could be an ATP-dependent uptake-mechanism or perhaps an inflammatory response to nanoparticle exposition. This possibility seems more likely, because the literature confirms that the transendothelial electrical resistance (TEER) of PBCEC temporarily decreased a lot.

In conclusion,-this work demonstrates that PBCA nanoparticles can be used for the treatment of CNS diseases due to their ability to pass the BBB. Furthermore the incorporated drug is released by a zero order kinetics and toxic effects occur only at high nanoparticle-concentrations.

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette-Transporter</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	n-Butyl- α -cyanoacrylat
BCEC	<i>Brain capillary endothelial cells</i>
Bcrp	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
BUI	<i>Brain uptake index</i>
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit
EPR-Effekt	Erhöhte Permeabilität und Retention-Effekt
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HCl	Hydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
i.v.	intravenös
JAMs	<i>Junction adhesion molecule</i>
KG	Körpergewicht
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
Mrp	<i>Multidrug resistance associated proteines</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
NCS	<i>New born calf serum</i>
NP	Nanopartikel
P-80	Polysorbat 80
PACA	Poly(alkylcyanoacrylat)
PBCA	Poly(n-butylcyanoacrylat)
PBCEC	<i>Porcine brain capillary endothelial cells</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	P-Glykoprotein
PMMA	Polymethylmethacrylat
RES	Retikuloendotheliales System
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TEER	Transendothelial electrical resistance
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE (BHS)	1
1.2	HISTORISCHES ZUR BHS	2
1.3	BESONDERHEITEN, AUFBAU UND FUNKTION DER BHS	3
1.4	TRANSPORTPROZESSE AN DER BHS	7
1.4.1	PASSIVER TRANSPORT	7
1.4.2	TRANSPORT DURCH CARRIERPROTEINE	7
1.4.3	EXPORTPROTEINE/EFFLUXPROTEINE	9
1.4.4	ZYTOTISCHE PROZESSE	10
1.5	ÜBERWINDUNG DER BHS	13
1.5.1	INVASIVE METHODEN	13
1.5.2	CHEMISCHE MODIFIKATION VON SUBSTANZEN	14
1.5.3	VERWENDUNG VON AN DER BHS EXISTIERENDEN WEGEN	14
1.5.4	BLOCKADE DER EXPORTPROTEINE AN DER BHS	15
1.5.5	BEHANDLUNG MIT FOKUSSIERTEM ULTRASCHALL	15
1.5.6	PARTIKULÄRE TRÄGERSYSTEME	16
1.6	IN VIVO UND IN VITRO MODELLE DER BHS	23
1.6.1	<i>IN VIVO</i> MODELLE DER BHS	23
1.6.2	<i>EX VIVO</i> MODELLE DER BHS	25
1.6.3	<i>IN VITRO</i> MODELLE DER BHS	26
1.7	IN VITRO FREISETZUNGS-EXPERIMENTE	28
1.7.1	FREISETZUNG VON WIRKSTOFFEN UND ABBAUVERHALTEN POLYMERBASIERTEN NANOPARTIKULÄREN ARZNEIFORMEN	28
1.7.2	<i>IN VITRO</i> FREISETZUNGSMODELLE FÜR NANOPARTIKULÄRE ARZNEIFORMEN	29
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	31
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	32
3.2	PUFFERLÖSUNGEN, KULTURMEDIE UND SONSTIGE LÖSUNGEN	33
3.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	36
3.4	GERÄTE	36
3.5	SOFTWARE	37
3.6	HERSTELLUNG BELADENER PBCA-NANOPARTIKEL	38
3.6.1	FITC-DEXTRAN (1,5 %) MARKIERTE PBCA-NANOPARTIKEL	38

3.6.2	RHODAMIN 123 (1,5 %) MARKIERTE PBCA-NANOPARTIKEL	38
3.6.3	DOXORUBICIN-HCL (10 %) BELADENE PBCA-NANOPARTIKEL	39
3.6.4	DOXORUBICIN-HCL (5 %) BELADENE PBCA-NANOPARTIKEL	39
3.6.5	OBERFLÄCHENMODIFIKATION DER NANOPARTIKEL MIT POLYSORBAT 80	40
3.7	CHARAKTERISIERUNG BELADENER PBCA-NANOPARTIKEL	40
3.7.1	PARTIKELGRÖÙE, POLYDISPERSITÄTSINDEX UND ZETAPOTENTIAL	40
3.7.2	BESTIMMUNG DES BELADUNGSGRADES MIT FLUORESZENZMARKER/ DOXORUBICIN HCL	40
3.8	EXPERIMENTE	40
3.8.1	INTRAARTERIELLE APPLIKATION VON FITC-DEXTRAN MARKIERTEN PBCA- NANOPARTIKELN	41
3.8.2	INTRAVENÖSE APPLIKATION VON PBCA-NANOPARTIKELN	41
3.9	IN VITRO EXPERIMENTE	45
3.9.1	GENERELLE EINSTELLUNGEN DES FLUOROSKAN ASCENT®	45
3.9.2	FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN	45
3.9.3	KAPILLARENDOTHELZELLEN AUS SCHWEINEHIRN	51
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	60
4.1	CHARAKTERISIERUNG VON BELADENEN PBCA-NP	60
4.1.1	FITC-DEXTRAN MARKIERTE PBCA-NP	60
4.1.2	RHODAMIN 123 MARKIERTE PBCA-NP	60
4.1.3	DOXORUBICIN BELADENE PBCA-NP (10 %)	60
4.1.4	DOXORUBICIN BELADENE PBCA-NP (5 %)	60
4.2	IN VIVO EXPERIMENTE	62
4.2.1	INTRAARTERIELLE APPLIKATION VON FITC-DEXTRAN MARKIERTEN PBCA- NANOPARTIKELN	62
4.2.2	INTRAVENÖSE APPLIKATION VON PBCA-NANOPARTIKELN	66
4.3	IN VITRO EXPERIMENTE	93
4.3.1	FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN	93
4.3.2	KAPILLARENDOTHELZELLEN AUS SCHWEINEHIRN	130
5	ABSCHLUSSBETRACHTUNG UND AUSBLICK	161
6	LITERATURVERZEICHNIS	165

1 Einleitung

1.1 *Die Blut-Hirn-Schranke (BHS)*

Das zentrale Nervensystem (ZNS) wird von der Blut-Hirn-Schranke (BHS) abgeschirmt, welche dieses vor gefährlichen Eindringlingen wie Toxinen, Bakterien, Viren und anderen unerwünschten Substanzen schützt. Die BHS hat aber nicht nur eine schützende Funktion, sie reguliert auch selektiv die Aufnahme und Ausschleusung von Stoffen, sowie deren Metabolismus.

Bedauerlicherweise können sehr viele pharmakologisch aktive Substanzen nicht für die Behandlung von Erkrankungen des ZNS verwendet werden, da sie nicht in der Lage sind, die BHS in für einen therapeutischen Effekt ausreichend hoher Konzentration zu überwinden [2;3].

Aus diesem Grund wird auf der ganzen Welt daran gearbeitet, neue Strategien zu finden, um Arzneistoffe ins Gehirn zu schleusen und die BHS zu überwinden. Noch immer müssen aufgrund der geringen Permeabilität der BHS einige Arzneistoffe in sehr hohen Dosen verwendet werden, um Erkrankungen des ZNS zu behandeln, was oft mit sehr hohen Nebenwirkungen in den peripheren Organen einhergeht. So muss man bei schweren Erkrankungen des ZNS wie beispielsweise Gehirntumoren bis heute erhebliche Nebenwirkungen in Kauf nehmen, wie es auch beim Zytostatikum Doxorubicin der Fall ist. Diese Substanz ist sehr toxisch für das Herz und andere Organe [4]. Gerade Zytostatika sind meist nutzlos für die Behandlung von Gehirntumoren, da sie die BHS nicht überwinden können. Grund hierfür sind hauptsächlich Exportproteine wie z.B. P-Glykoprotein (P-gp) oder das Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp), die in der luminalen Membran der zerebralen Kapillarendothelzellen lokalisiert sind und viele Substanzen wieder auswärts transportieren [5;6].

Da viele Erkrankungen des ZNS bis heute nicht zufriedenstellend behandelt werden können, ist es umso wichtiger, neue zielgerichtete Arzneiformen zu entwickeln, die die BHS überwinden und das ZNS erreichen können. Ein Versuch hierzu sind mit Arzneistoffen beladene Nanopartikel-Formulierungen, auf die in dieser Arbeit noch eingegangen werden wird.

1.2 Historisches zur BHS

Die Entdeckung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) schreibt man dem Pharmakologen, Physiologen und Mikrobiologen Paul Ehrlich zu. Er führte bereits um das Jahr 1885 herum Experimente durch, die im Ergebnis dafür sprachen, dass es eine Barriere zwischen dem Gehirn und den nicht neuronalen Organen und Geweben geben muss. Die intravenöse Verabreichung eines Anilinfarbstoffes bei Versuchstieren führte zu einer Färbung aller Organe mit Ausnahme des Zentralnervensystems (ZNS). Ehrlich interpretierte die Ergebnisse indes etwas anders. Er ging davon aus, dass dem Gewebe des ZNS die Voraussetzungen fehlen würden, den Farbstoff zu binden [7].

Edwin Goldmann, ein Student Paul Ehrlichs, führte die Experimente fort und injizierte Versuchstieren den Farbstoff Trypanblau zunächst intravenös und stellte fest, dass zwar der Choroid Plexus, nicht aber das umliegende Gehirngewebe gefärbt war [8]. Später führte Goldmann diese Experimente weiter und injizierte das Trypanblau subarachnoidal direkt in die Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) und erhielt das ZNS gefärbt, nicht aber die umliegenden Organe [9]. Aufgrund dieser Ergebnisse vermutete er, dass die CSF und der Choroid plexus zwar auf der einen Seite für den Transport von Nährstoffen ins ZNS verantwortlich sind, auf der anderen Seite aber auch eine Schrankenfunktion gegenüber solchen Substanzen ausüben, die ansonsten für das ZNS toxisch sein könnten.

Walter und Spatz kamen zu Beginn der dreißiger Jahre unabhängig voneinander zu dem Schluss, dass zwischen einer Blut-Hirn-Schranke (BHS) und Blut-Liquor Schranke (BLS) unterschieden werden muss [10;11].

Im Jahre 1946 sprach Krogh dann bereits von einer Blut-Hirn-Schranke und vermutete erstmals aktive Transportprozesse an der BHS [12]. Man schrieb damals noch den Glia-Zellen, die eine Großfläche der neuronalen Kapillaren bedecken, die barrierebildenden Eigenschaften zu [13]. Ende der 60er Jahre wurde schließlich der Aufbau der BHS durch elektronenmikroskopische Aufnahmen aufgeklärt. Die Barrierefunktion konnte nun eindeutig den Kapillarendothelzellen der zerebralen Blutgefäße zugeordnet werden [14;15]. Abbildung 1.1 zeigt eine Plastination der BHS.

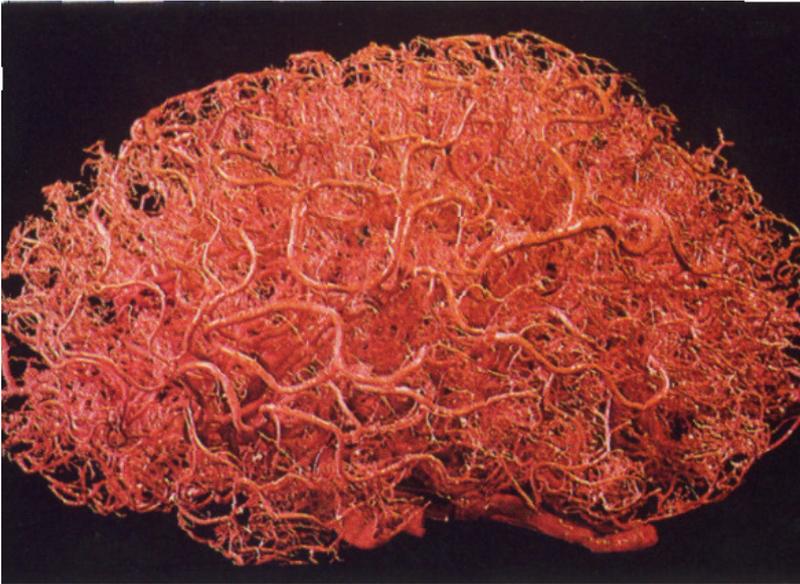


Abbildung 1.1

Plastination der zerebralen Gehirnkapillaren, entnommen aus [16]

1.3 *Besonderheiten, Aufbau und Funktion der BHS*

Das am höchsten spezialisierte bekannte menschliche Organ stellt das Gehirn dar. In seiner Funktion ist es extrem abhängig von einem konstanten physiologischen Milieu. Die Stabilität eines solchen Milieus, die Homöostase, ist vor allem zum Schutz des neuronalen Gewebes erforderlich. Zum einen muss die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und Sauerstoff garantiert werden, zum anderen muss das neuronale Gewebe vor potentiell toxischen, im Blut gelösten Fremdstoffen (Xenobiotika) geschützt werden. Schwankungen des pH-Wertes oder Änderungen der Ionenkonzentration der Interstitialflüssigkeit, dürfen nicht an das Gehirn vermittelt werden. Auch peripher zirkulierende Neurotransmitter, die mit zentralen Synapsen interagieren könnten, dürfen nicht in das ZNS eindringen. Andererseits müssen zentrale Neurotransmitter und Neurohormone, die für eine lokale Wirkung nur in sehr niedrigen Konzentrationen freigesetzt werden auf das Gehirn beschränkt bleiben. Diese komplexe Schutz- und Versorgungsfunktion wird durch das Kapillarsystem des Gehirns wahrgenommen. Dessen mikrovaskuläres Endothel wird aufgrund seiner Schrankenfunktion als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet.

Die aus den Gehirnendothelzellen geformten Kapillaren bilden den Grundbaustein der BHS. Mit ihnen stehen Astrozyten über Endfüßchen in Verbindung und die Astrozyten wiederum mit Neuronen (s. Abbildung 1.2) Die besondere Funktion als Schranke ist nur dadurch möglich, dass die Kapillaren sich in mehrfacher Hinsicht

1. Einleitung

deutlich von den peripheren Kapillaren unterscheiden. Hierzu zählen neben metabolischen Besonderheiten insbesondere die morphologischen Unterschiede. Das Endothel im Allgemeinen stellt eine einlagige Zellschicht dar, die bei Wirbeltieren alle Blut- und Lymphgefäße auskleidet. In Geweben mit besonders hohem,

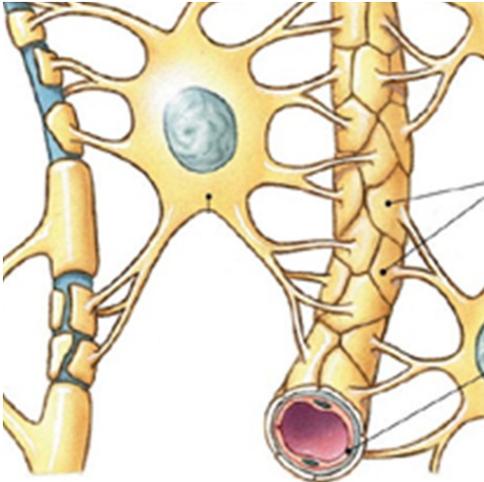


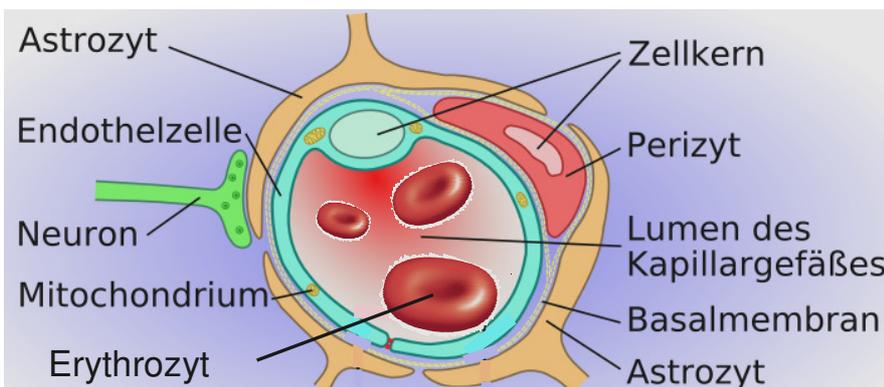
Abbildung 1.2
Gehirnkapillare mit angrenzendem sternförmigem Astrozyten und an diesen angrenzendem Neuron aus [1]

unkontrolliertem Stoffaustausch tritt die Endothelschicht der Blutgefäße in Form eines diskontinuierlichen oder fenestrierten Endothels auf, dessen interzelluläre Lücken einen freien, diffusionsgetriebenen Stoffaustausch zwischen Gefäßlumen und umgebenden Gewebe ermöglichen.

In Organen oder Geweben, in denen eine strikte Kontrolle des Stoffaustausches nötig ist, bilden Endothelzellen eine kontinuierliche, dichte Zellschicht. Diese auch Schrankenendothel genannte Struktur ist gekennzeichnet durch *tight junctions*, d. h. durch besonders enge Zell-Zell-

Kontakte, die keine interzellulären Lücken aufweisen. Das Gefäßlumen wird so vom Interstitium des umgebenden Gewebes räumlich vollständig getrennt. Gewebe mit Schrankenfunktion sind bislang unter anderem im *Plexus choroidei*, in den *Testes*, an der *Plazenta* und in Hirnkapillaren beschrieben worden.

Die mikrovaskulären Hirnkapillaren weisen einen Durchmesser von 3 bis 10 μm auf



und durchziehen das menschliche Gehirn auf einer Länge von schätzungsweise 600 km und einem Abstand zueinander von nur etwa 40 μm [14;17].

Abbildung 1.3
Zerebrale Kapillare im Querschnitt mit Endothelzelle, angrenzendem Perizyten und Astrozytenendfüßchen mit daran anliegendem Neuron, teilweise übernommen und modifiziert nach [18]

1. Einleitung

Die Bausteine der Kapillaren sind die **Endothelzellen**. Sie sind spindelförmig und lückenlos miteinander durch *tight junctions* verbunden. Sie grenzen das Lumen der Kapillare vollständig ab (s. Abbildung 1.3). Die **tight junctions** schließen Lücken zwischen den Zellen und schränken somit die parazelluläre Diffusion auch von niedermolekularen Substanzen stark ein und fungieren als physikalische Barriere. Nur kleine, lipophile Moleküle können frei durch die Lipidmembran der Endothelzellen diffundieren. Solche Moleküle sind beispielsweise Sauerstoff, Kohlendioxid, Ethanol, und wenige Arzneistoffe wie die Opioide und Barbiturate [19]. Für die Funktion der BHS sind die *tight junctions* essentiell [20]. Sie bewirken einen außerordentlich hohen transendothelialen Widerstand (TEER) von bis zu $2000 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ [21]. Eine weitere Funktion ist die Aufrechterhaltung der Verteilung von Membranproteinen zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran [22;23]. Der Aufbau von *tight junctions* ist außerordentlich komplex und noch immer nicht ganz vollständig bekannt. Charakteristische Proteine für die *tight junctions* sind Occludin und Claudine, die mit für die Schrankenfunktion verantwortlich sind, sowie auch die *junctional adhesion molecules* (JAMs), die eine Rolle bei der Leukozytenmigration im Falle eines Entzündungsprozesses an der BHS spielen [24]. Eine weitere Besonderheit der zerebralen Kapillarendothelzellen stellt die umfangreichere Ausstattung mit Mitochondrien gegenüber peripheren Endothelzellen dar. Darüber hinaus besitzen sie auch eine breit angelegte Enzymausstattung, was ihnen sowohl Phase I- wie auch Phase II-Biotransformationsreaktionen möglich macht. Somit verfügt die BHS auch über eine metabolische Barriere, die vor allem im Abbau von Neurotransmittern eine große Rolle spielt [25;26].

Auch für im Blutkreislauf zirkulierende Pathogene, für Proteine der unspezifischen humoralen Abwehr, für Antikörper und für Leukozyten ist die BHS undurchlässig und stellt somit zusätzlich eine immunologische Barriere dar. Im pathophysiologischen Zustand kann sich dies jedoch ändern wie z.B. bei Schlaganfällen [27].

Die Gehirnkapillare ist von einer proteinreichen Matrix, der **Basalmembran**, umschlossen. Sie enthält sowohl Kollagen IV, Laminin und Fibronectin als auch Proteoglykane wie z. B. Heparansulfat [28].

In diese Basalmembran eingebettet findet man **Perizyten**, einen weiteren kapillar-assoziierten Zelltyp. Hierbei handelt es sich um polymorphe Zellen, welche die Hirnkapillaren zu 20-30 % bedecken [29]. Dabei befinden sie sich vorzugsweise über

1. Einleitung

den *tight junctions* der Endothelzellen. Die Perizyten stehen mit den Endothelzellen über sogenannte *gap junctions* in Verbindung. Somit ist ein Austausch kleiner Moleküle und Ionen zwischen den beiden Zelltypen und dadurch gegenseitige Beeinflussung möglich. Perizyten können auch in andere mesenchymale Zelltypen differenzieren und üben dadurch eine multifunktionale Rolle an der BHS aus. Außerdem sind Perizyten zur Phagozytose befähigt und sind auf diesem Wege aktiv in die Immunantwort an der BHS involviert. Des Weiteren sind sie auch an der Regulation des kapillaren Blutflusses (durch vorhandene Aktinfilamente), sowie der Regulation des Gefäßwachstums und der Gefäßstabilität (Beeinflussung der *tight junctions*) beteiligt [30].

Ein dritter Zelltyp, die **Astrozyten**, ist ebenfalls am Aufbau der Hirnkapillaren beteiligt. Die Astrozyten-Endfüßchen, Ausläufer dieser gliären Zellen, besetzen die Kapillaren auf der dem Gehirn zugewandten Kapillarseite zu ca. 90 % (s. Abbildung 1.3) und besitzen eine Stützfunktion [31]. Diese großen sternförmigen Zellen werden auch als Makroglia bezeichnet und stellen den größten Anteil der Gliazellen im Gehirn. Sie stehen über zahlreiche Fortsätze sowohl mit den Kapillaren, als auch mit den Nervenzellen in Verbindung und sind zudem wie auch die Perizyten zur Phagozytose befähigt. Dieser Zelltyp trägt allerdings nicht direkt zur Schrankenfunktion der BHS bei. Durch Abgabe löslicher Faktoren ist er aber in der Lage, die Schrankeneigenschaften im benachbarten Endothel und dessen Differenzierung zu induzieren [32-34]. Außerdem exprimieren Astrozyten Wasserkanälchen, sogenannte Aquaporine und tragen so auch zur Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS bei [35], indem sie von Neuronen ausgeschiedene Stoffe wie z.B. Glutamat abtransportieren [36]. Bei pathologischen Prozessen spielen Astrozyten ebenfalls eine bedeutende Rolle: Sie können nämlich auch inflammatorische Zytokine, sowie Proteasen freisetzen, die beispielsweise zur Entstehung von Alzheimer beitragen [32].

Die verschiedenen Zelltypen an der BHS, die alle nun genauer beschrieben wurden, formen zusammen eine funktionelle Einheit, die sogenannte „*neurovascular unit*“ [37]. Durch ihre Nähe zueinander können diese Zellen schnell kommunizieren und regulieren gemeinsam vielerlei Prozesse wie Angiogenese, Neurogenese, Blutfluss, BHS-Barriereigenschaften, enzymatische Funktionen, u.v.m. [38]. Fehlfunktionen dieser Einheit können zu vielen Erkrankungen bis hin zum Verlust der

Barrierefunktion führen. Der Fokus sollte sich nun im Verständnis der BHS und des ZNS immer mehr auf das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen richten, um im ZNS und an der BHS ablaufende Prozesse besser verstehen zu können.

1.4 Transportprozesse an der BHS

1.4.1 Passiver Transport

Unter passivem Transport versteht man die Diffusion von Molekülen durch eine Lipid-Doppelmembran und somit auch durch eine Zellschicht ohne Aufwendung von Energie. Die Diffusionsrate ist direkt proportional zum Gradienten, ist nicht absättigbar und kann nicht durch andere Stoffe gehemmt werden. Die Geschwindigkeit und somit die Diffusionsrate hängt von mehreren Parametern, wie Molekulargewicht, Form oder Ladung der diffundierenden Substanz ab. Generell diffundiert ein Molekül umso schneller durch Membranen, je kleiner und lipophiler es ist. (s. Fick'sches Gesetz)

Fick'sches Gesetz:

Die Geschwindigkeit der Diffusion q ist

*proportional dem Konzentrationsgradienten ($C_2 - C_1$),
proportional der Oberfläche A ,
proportional dem Verteilungskoeffizienten VK ,
proportional einer Diffusionskonstanten k ,
umgekehrt proportional der Diffusionsstrecke d .*

$$q = k \cdot A/d \cdot VK (C_2 - C_1)$$

1.4.2 Transport durch Carrierproteine

Nährstoffe, die das Gehirn benötigt, gelangen über spezielle, in der Zellmembran lokalisierte Transportsysteme ins Gehirn. Dieser Transport kann sowohl passiv als auch aktiv sein. Von einem aktiven Transport spricht man, wenn eine Substanz gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert wird. Die dazu benötigte Energie wird in der Regel durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Die wichtigsten Transportproteine in den apikalen und basolateralen Membranen der Kapillarendothelzellen sind jene

1. Einleitung

für Glucose und Aminosäuren. Glucose ist die Hauptenergiequelle des Gehirns. Daher muss die kontinuierliche und ausreichende Glucoseversorgung des Gehirns durch die Kapillarendothelzellen sichergestellt werden. Das Glucose-Transportprotein an der BHS ist der GLUT-1-Transporter. Er transportiert D-Glucose, aber auch andere Zucker mit verschieden hoher Affinität. D-Glucose wird passiv mit einem Konzentrationsgefälle transportiert [39;40].

Auch Aminosäuren werden in ausreichender Menge im Gehirn sowohl für die Proteinbiosynthese als auch für die Synthese von Neurotransmittern in den Neuronen benötigt. Vor allem essentielle Aminosäuren werden aus dem Blutstrom ins Gehirn aufgenommen, während nicht-essentielle Aminosäuren kaum ins Gehirn gelangen [41]. Der Transport der verschiedenen Aminosäuren an der BHS erfolgt durch verschiedene, teils nur auf einer Membranseite präsenärer Proteine. Das L-System hat eine hohe Affinität zu großen, neutralen Aminosäuren wie Tryptophan, Phenylalanin und Leucin, wohingegen seine Affinität zu Alanin oder Glutamin gering ist [42]. Man findet es in beiden Membranbereichen [43]. Es akzeptiert auch das zur Parkinson-Therapie eingesetzte L-DOPA, das den Mangel an Dopamin im Gehirn beheben soll.

Als Beispiel eines rein abluminalen Transportsystems sei das A-System genannt. Hierbei handelt es sich um einen Na^+ -abhängigen Co-Transporter für Glycin und Aminosäuren mit kurzen, linearen oder polaren Seitenketten. Diese Aminosäuren verlassen die Endothelzelle anschließend über das L-System in das Kapillarlumen [44]. Es existieren noch weitere Transportsysteme für Aminosäuren wie das γ^+ -System für kationische Aminosäuren, das ASG- oder B^{0+} -System für neutrale Aminosäuren, das T-System für Schilddrüsenhormone, das β -System für Taurin, sowie das X-System für anionische Aminosäuren. An dieser Stelle soll auf diese Systeme nicht genauer eingegangen werden.

Eine weitere Möglichkeit für den Stofftransport stellen die Ionenkanäle und Ionentransporter dar. Sie dienen der Aufrechterhaltung der Ionenkonzentrationsgradienten zwischen dem Zytoplasma der Endothelzellen und der Interstitialflüssigkeit. In der abluminalen Membran des zerebralen Kapillarendothels ist die Na^+/K^+ -ATPase lokalisiert. In der luminalen Membran befinden sich Na^+/Cl^- -Co-Transporter. Weiterhin wurden Na^+/H^+ -Antiporter zur intrazellulären pH-Regulation sowie Na^+ -, K^+ - und Ca^{++} -Ionenkanäle identifiziert [45;46].

1. Einleitung

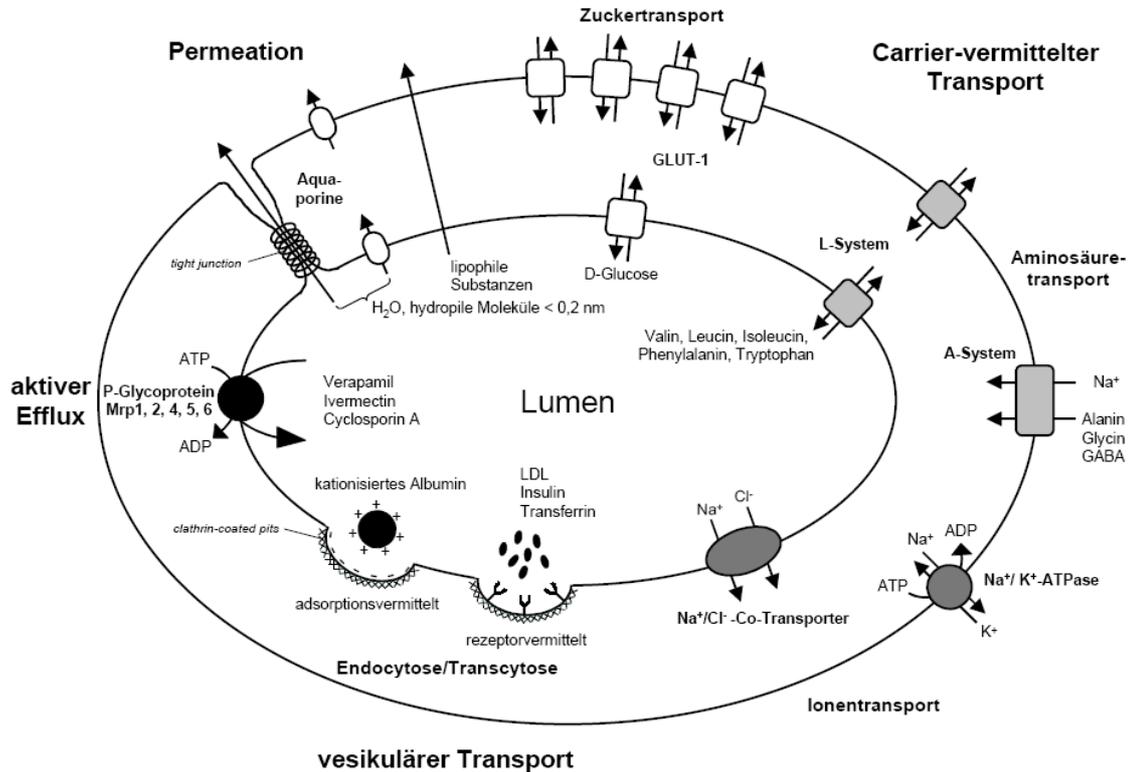


Abbildung 1.4 Transportprozesse an der BHS nach [47]

1.4.3 Exportproteine/Effluxproteine

Neben Transportsystemen, die der Versorgung des Hirnparenchyms dienen, sind an den Membranen der Hirnkapillarendothelzellen auch Transporter mit direkter Schutz- oder Entgiftungsfunktion zu finden. Eine Vielzahl von Substanzen weist trotz ausreichender Lipophilie nur eine geringe Permeabilität an der BHS auf. Nähere Untersuchungen dieses Phänomens führten zu der Erkenntnis, dass diese Moleküle zwar in die Endothelzellen hinein gelangen, dort jedoch zum Teil von einem membranständigen Carrierprotein erkannt und wieder aktiv aus der Zelle transportiert werden. Diese Efflux-Transporter gehören zur Familie der ABC-Transportproteine (*ATP-binding-cassette* Transportproteine), die Substanzen aktiv unter ATP-Verbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten durch auswärtsgerichteten Transport aus dem zerebralen Kapillarendothel wieder in das Gefäßlumen befördern. In Gehirnkapillarendothelzellen wurden bisher die Transporter *permeability-glycoprotein* oder auch P-Glycoprotein (Pgp) genannt, das *breast cancer related protein* (Bcrp) und *multidrug resistance associated proteins* (Mrp1, Mrp2, Mrp4, Mrp5 und Mrp6) identifiziert (s. Abbildung 1.5) [48-52].

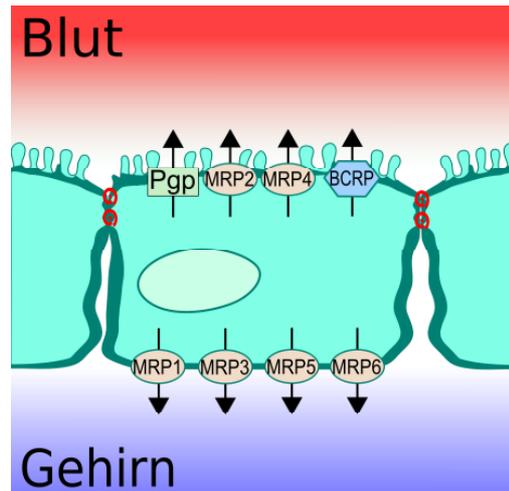


Abbildung 1.5

Lokalisation verschiedener Efflux-Proteine an der BHS aus [53]

1.4.4 Zytotische Prozesse

Große Moleküle (z.B. Proteine) und Molekülkomplexe (z.B. Lipoproteine) werden über Endozytose in zerebrale Kapillarendothelzellen aufgenommen und vesikulär durch die Zellen hindurch transportiert (Transzytose) oder wieder aus der Zelle ausgeschleust (Exozytose). Die Aufnahme von großen Partikeln wie Bakterien oder abgestorbenen Zellen bezeichnet man als Phagozytose. Hierbei umschließt die Zellmembran den an die Zelloberfläche gebundenen Festkörper durch Membranausstülpungen, bis er sich im Zellinneren befindet. Phagozytose spielt eine wesentliche Rolle für das Immunsystem. Nur wenige spezialisierte Zelltypen sind zur Phagozytose befähigt, z.B. Makrophagen, Granulozyten oder Perizyten. Die unspezifische Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeit und darin gelöster Moleküle im Rahmen der kontinuierlichen Regeneration der Zellmembran wird Pinozytose genannt. Ihr Ausmaß ist abhängig vom Zelltyp. Die Endothelzellen der BHS verfügen nur über eine geringe Pinozytoseaktivität. Die Endozytose von Molekülen beobachtet man bei den meisten Zelltypen. Dabei unterscheidet man zwischen rezeptorvermittelter und adsorptionsvermittelter Endozytose [54].

1.4.4.1 Adsorptionsvermittelte Endozytose

Die Aufnahme von Makromolekülen ist nicht immer an die Existenz eines Rezeptors gekoppelt, so können elektrostatisch geladene Makromoleküle z.B. von der Zellmembran adsorbiert werden. Diese Art der Internalisierung wird adsorptive

Endozytose genannt. Durch das Vorkommen von Proteoglykanen wie Heparan- oder Chondroitinsulfat sind Zellmembranen negativ geladen. Daher werden kationische Moleküle besser adsorbiert. In welchem Ausmaß diese Adsorption und die anschließende Endozytose stattfinden, ist zelltypabhängig. Beispiele für auf diese Weise aufgenommene Moleküle an der BHS sind kationisiertes Albumin [55;56] und Histon [57].

1.4.4.2 Rezeptorvermittelte Endozytose

Bei der rezeptorvermittelten Endozytose binden Moleküle hochspezifisch an luminale Membran-Rezeptoren. Durch die Internalisierung des beladenen Rezeptors bilden sich intrazellulär Transportvesikel, sogenannte Endosomen, die entweder in der Zelle mit Lysosomen verschmelzen oder über Transzytose durch die Zellen befördert werden und auf der gegenüberliegenden Zellseite mit der abluminalen Membran verschmelzen, wobei das gebundene Molekül wieder freigesetzt wird [58;59]. Nach diesem Mechanismus werden das Cholesterin-transportierende Lipoprotein LDL (*low density lipoprotein*), das Eisen-transportierende Protein Transferrin sowie Insulin in Gehirnkapillarendothelzellen aufgenommen [58;60-62].

1.4.4.3 Phagozytose und Makropinozytose

Generell lassen sich zytotische Prozesse des Weiteren auch nach der Beteiligung bestimmter Proteine unterteilen, die daran beteiligt sind oder auch anhand der Region in der Membran, an der sie stattfinden.

Große Partikel wie beispielsweise Mikroorganismen werden durch Phagozytose aufgenommen. Dabei stülpen sich Membranabschnitte über das zu internalisierende Objekt und transportieren das so entstandene Phagosom zu den Lysosomen, wo es abgebaut wird. Bei diesen Prozessen spielen Aktinfilamente eine stabilisierende Rolle. Die Makropinozytose funktioniert vergleichbar. Allerdings werden hierbei Flüssigkeiten aufgenommen [63]. Zerebrale Kapillarendothelzellen zeichnen sich durch eine besonders geringe Pinozytoseaktivität aus.

1.4.4.4 Clathrin-abhängige Endozytose

Einbuchtungen der Zellmembran, die auf der zytosolischen Seite mit dem Protein Clathrin besetzt sind, nennt man *clathrin-coated pits*. Zur Internalisierung schnürt

sich diese Einstülpung unter dem Einfluss von Dynamin ab, das entstehende Vesikel verliert seine Clathrinhülle und befördert seinen Inhalt zum frühen Endosom.

Die Clathrin-abhängige Endozytose kann sowohl konstitutiv als auch ligandeninduziert stattfinden. So werden beispielsweise der Transferrin- und der LDL-Rezeptor, die in *clathrin-coated pits* lokalisiert sind, in regelmäßigen Abständen internalisiert, unabhängig von der Bindung eines Liganden. Beispiele für ligandeninduzierte Endozytose finden sich bei den Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [64].

1.4.4.5 Caveolin-abhängige Endozytose

Caveolae (vermutlich von lat. *cavus* = hohl, umhüllend) wurden zunächst als kleine, omega-förmige Membraneinstülpungen beschrieben [65]. Heute definiert man Caveolae über ihre biochemische Zusammensetzung. Caveolae sind reich an Cholesterol, Glykosphingolipiden und intrazellulären Membranproteinen, wie z.B. Caveolin [66]. Diese Caveolae-Membraneinbuchtungen werden unter Beteiligung von Dynamin und dem Aktin-Zytoskelett eingeschnürt. Über Caveolae werden beispielsweise der Simian-Virus SV40, ein Teil des Choleratoxins und Albumin endozytiert [67].

1.4.4.6 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose

Darüber hinaus gibt es aber auch Endozytosewege, die weder in *clathrin coated pits* noch in Caveolae stattfinden. Sie lassen sich in Dynamin-abhängige und -unabhängige Prozesse einteilen. Die entstandenen Vesikel wandern weiter zum frühen Endosom [68]. Danach kann das endozytierte Material zum späten Endosom und weiter zum Lysosom gelangen. Dieser Weg hängt von der Beschaffenheit des transportierten Inhaltes ab und es werden verschiedene Modelle dafür diskutiert [69]. Häufig ist noch nicht klar, welcher Weg für ein bestimmtes zu endozytierendes Molekül eingeschlagen wird, da die Regelung der Mechanismen sehr komplex ist und sowohl bei verschiedenen Zelltypen als auch bei unterschiedlichen Bedingungen jeweils anders ausfallen kann [68]. Abbildung 1.6 stellt schematisch mögliche ablaufende endozytotische Prozesse dar.

1. Einleitung

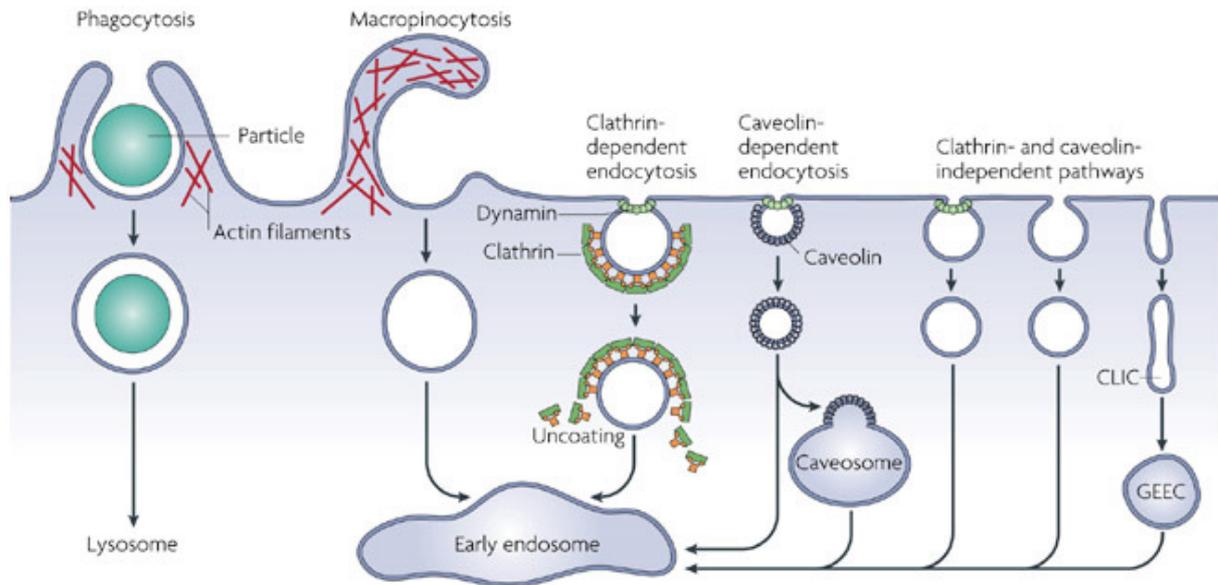


Abbildung 1.6
Endozytotische Prozesse nach [68]

1.5 Überwindung der BHS

Für Arzneistoffe, die im ZNS wirken sollen, ist es sehr schwierig, dort hinzugelangen. Es wurden bisher einige Strategien entwickelt, um Arzneistoffe ins Gehirn zu schleusen. Nachfolgend werden einige Möglichkeiten genannt.

1.5.1 Invasive Methoden

Zu den invasiven Methoden zählt die intraventrikuläre Infusion, das Einsetzen intrazerebraler Implantate und die osmotische Öffnung des zerebralen Kapillarendothels, worauf etwas genauer eingegangen werden soll. Durch kurze Infusion einer hyperosmotischen Lösung (z.B. Mannitol, Arabinose) in die Halsschlagader kann die BHS geöffnet werden. Die Endothelzellen schrumpfen durch die hyperosmotische Lösung und geben so parazelluläre Kanäle frei. Diese Technik wurde in Verbindung mit der Infusion von Chemotherapeutika zur Behandlung von Hirntumoren genutzt [70]. Das Peptid Bradykinin erhöht die Permeabilität der BHS durch eine Öffnung der *tight junctions*. Dieser Effekt soll rezeptorvermittelt sein [71]. Eine ähnliche Erhöhung der Durchlässigkeit konnte mit Leukotrienen, Histamin und 5-Hydroxytryptamin erzielt werden [72]. Durch diese Methoden wird die BHS unspezifisch für alle im Blut zirkulierenden Substanzen geöffnet und verliert zeitweise ihre Schutzfunktion. Somit ist eine regelmäßige Anwendung des Verfahrens mit einem hohen Risiko behaftet.

1.5.2 Chemische Modifikation von Substanzen

Eine Möglichkeit der chemischen Modifizierung stellt die Erhöhung der Lipophilie von Substanzen dar. Die Diffusion über die BHS ist abhängig von dem Molekulargewicht und der Lipophilie der zu transportierenden Substanz. So kann die Hirngängigkeit durch das Einfügen von lipophilen Gruppen verbessert werden. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Diacetylierung von Morphin zu Heroin, die eine 25-fach erhöhte Aufnahme ins Gehirn bewirkt [73].

Eine besondere Form der Verbesserung des Diffusionsverhaltens stellt der sequentielle Metabolismus redoxbasierter Systeme dar. Hierbei wird der Arzneistoff kovalent an 1,4-Dihydrotrigonellinat und zusätzlich an ein lipophiles Trägermolekül gebunden. Dieses lipophile Konstrukt ist in der Lage, durch die BHS und andere zelluläre Barrieren zu diffundieren. Eine Rückdiffusion wird durch die Oxidation des Trigonellinats analog zur Oxidation des Coenzym NADH zu NAD^+ verhindert. So kann die Verbindung im Gehirn verbleiben und nach Hydrolyse der Ester- oder Amidbindungen zu den Trägermolekülen den Wirkstoff freigeben. Experimentell wurde die Anwendbarkeit des Systems für Enkephaline [74], Estradiol [75], sowie die Virustatika Ganciclovir und Zidovudin gezeigt [76;77].

1.5.3 Verwendung von an der BHS existierenden Wegen

Das Transportprotein für neutrale Aminosäuren wird für die Behandlung des Morbus Parkinson ausgenutzt. Dopamin selbst wird nicht an der BHS transportiert und zudem schnell durch die Enzyme Monoaminoxidase und Katecholamin-O-Methyltransferase metabolisiert. Die Aminosäure L-Dopa jedoch wird von dem Carrierprotein erkannt und im Gehirn zu Dopamin umgesetzt. Dieses Dopamin kann dann von den Neuronen in der substantia nigra aufgenommen werden und den Neurotransmitter-Mangel ausgleichen. Ebenfalls durch das Carrierprotein für neutrale Aminosäuren transportiert werden das Zytostatikum Melphalan, der antiepileptisch wirkende Arzneistoff Gabapentin [72] und das Muskelrelaxans Baclofen [78]. Da Carrierproteine jedoch nicht beliebig große Moleküle transportieren können, und ein hohes Maß an struktureller Übereinstimmung mit den physiologischen Substraten gegeben sein muss, ist diese Strategie nur eingeschränkt anwendbar. Deshalb bietet sich für große Moleküle wie Proteine die Verwendung von chimären Peptiden an. Chimäre Peptide sind Konjugate aus einem nicht an der BHS transportierten

Peptidarzneistoff und einem Vektor, der den Transport in das Gehirn vermittelt. Als Vektoren dienen dabei Proteine, die an der BHS adsorptiv oder rezeptorvermittelt endozytiert werden. Die Arzneistoffe werden meist kovalent an den Träger gekoppelt. Der Transport des Arzneistoffs erfordert die Endozytose des Konjugats an der Blutseite der BHS, gefolgt von der Exozytose auf der Hirnseite, dem Lösen der Bindung zwischen Vektor und Peptidarzneistoff und dem Binden des Arzneistoffs an seinem Rezeptor im Gehirn. Als experimentelle Vektoren genutzt wurden bisher Insulin [79], Transferrin [80;81], der Anti-Insulin-Rezeptor Antikörper [82], der Anti-Transferrin-Rezeptor Antikörper OX26 [83;84] und kationisiertes Albumin [85-87]. Einen entsprechenden Vektor vorausgesetzt, ermöglicht diese Strategie ein selektives *drug targeting* zum Gehirn.

1.5.4 Blockade der Exportproteine an der BHS

Für Arzneistoffe, die an Substrate der Exportproteine an der BHS sind besteht auch noch die Möglichkeit, diese mit potenten Inhibitoren zu blocken und dadurch deren Penetration ins ZNS zu ermöglichen. Die gezielte Hemmung der ABC-Exportproteine in der BHS, vor allem von P-gp und Bcrp wäre sinnvoll, da sie die „Haupt-Exportproteine“ darstellen. Die ZNS-Konzentration verschiedener Wirkstoffe kann bei Blockade oder Fehlen von P-gp in knock-out-Tieren drastisch erhöht sein, wie z.B. für das Pestizid Ivermectin um das bis zu 100-fache [88]. In einem Mäuse-Modell mit intrazerebral implantiertem Glioblastom konnte der Tumor nach gezielter Hemmung von p-gp mit Taxol erfolgreich therapiert werden, es wurde eine Reduktion des Tumors um 90 % erreicht [89]. Aufgrund einer solchen Blockade gelangen aber auch andere Substanzen besser in das Gehirn, die unter Umständen schädlich sind. Die BHS sollte auf jeden Fall nicht zu lange durch blockierte Exportproteine ungeschützt sein.

1.5.5 Behandlung mit fokussiertem Ultraschall

Neuerdings wird auch fokussierter Ultraschall verwendet, um die BHS reversibel zu öffnen [90]. Mit dieser Methode war es bereits möglich, den in der Brustkrebstherapie verwendeten Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]) über die BHS zu bringen, um möglicherweise zukünftig Brustkrebsmetastasen im Gehirn behandeln zu können [91]. Auch für das Zytostatikum Doxorubicin konnte ein Übergang durch die BHS in therapeutischen Dosen erreicht werden [92]. Bei dieser Methode wird Ultraschall im

Bereich von 0,5 bis 2 MHz mit kurzen Pulslängen im Millisekundenbereich und Wiederholfrquenzen im Bereich von 1 Hz über einen Zeitraum von weniger als einer Minute angewendet [93]. Die Öffnung kommt vermutlich durch Scherkräfte zustande, die durch Mikroströmungen im Behandlungsfeld erzeugt werden. Durch simultane Magnetresonanztomographie (MRT) lassen sich die geöffneten Areale identifizieren. Eine Infiltration des Gehirngewebes von Makrophagen wurde auch nicht beobachtet aufgrund der Öffnung der BHS bei optimal gewählten Bedingungen [94]. Die Öffnung der BHS scheint komplett reversibel zu sein.

1.5.6 Partikuläre Trägersysteme

Der Vorteil von partikulären Arzneistoffträgern liegt neben der hohen Transportkapazität in der Möglichkeit, über die Wahl der Trägerpolymere und der Herstellungsbedingungen, verschiedenste Arzneistoffe transportieren zu können. Die Anforderungen an ein ideales Trägersystem sind neben einer einfachen Herstellung eine hohe Beladungskapazität für Arzneistoffe unterschiedlichster Art, dem Schutz dieser Ladung vor Abbau und den Verbleib der Ladung am Zielort. Es sollte zudem noch untoxisch und biodegradierbar sein. Außerdem sollte es den Wirkstoff in aktiver Form in einer gewünschten Geschwindigkeit und in angemessener Konzentration freisetzen. Ein Beispiel für ein partikuläres Trägersystem sind Liposomen.

Liposomen sind kugelförmige kolloidale Vesikel, die einen wässrigen Innenraum mit einem oder mehreren Lipidbilayern umschließen. Sie bilden sich oberhalb der kritischen Mizellbildungs-Konzentration spontan, indem sich die lipophilen Molekülteile zueinander organisieren und gleichzeitig die hydrophilen Gruppen auf beiden Seiten die lipophile Schicht gegen das wässrige Medium abschirmen. Schon bald nach der erstmaligen Beschreibung durch Bangham et al. 1965 [95] wurde das Potential der Liposomen als Modellsystem zur Untersuchung von Biomembranen und als Arzneistoffträger erkannt. Heute werden Liposomen als System zur Solubilisierung schlecht wasserlöslicher Substanzen, zur Erhöhung der Plasmahalbwertszeit, zur Vermeidung toxischer Nebenwirkungen, als System für eine verzögerte Wirkstofffreigabe und eine erhöhte Bioverfügbarkeit, für ein passives Targeting von Tumoren und Infektionsherden, sowie ein organspezifisches Targeting durch liposomale Konjugate mit Vektoren, die an bestimmten Epitopen der Zielzellen binden, genutzt.

Das zweite Beispiel partikulärer Systeme sind Nanopartikel, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

1.5.6.1 Nanopartikel

Unter Nanopartikeln versteht man kleine feste Körper aus Polymeren im Größenbereich von 10 nm bis 1 µm. Diese können auf unterschiedliche Weise dargestellt und mit Arzneistoffen beladen werden [96;97]. Die Materialien, die für ihre Herstellung verwendet werden, können synthetischen (Polymethacrylate, Polyalkylcyanoacrylate, Polystyrole, Polylactide) oder natürlichen (Albumin, Gelatine, Stärke, Dextran, Chitosan) Ursprungs sein [98]. Arzneistoffe können an das Trägersystem sowohl adsorptiv als auch kovalent an die Oberfläche gebunden sein, sowie auch in die Partikelmatrix eingeschlossen werden [97;99]. NP werden nach intravenöser Applikation meist schnell opsonisiert und von den Organen und Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) aufgenommen.

NP können Blutgefäße an fenestrierten Stellen des Endothels verlassen und sich so in bestimmten Geweben anreichern. Bei Tumorgefäßen führt die schnelle Vaskularisierung zur Ausbildung von lückenhaften und stark fenestrierten Gefäßen. Dies bedingt, dass sich intravenös applizierte NP in diesen Bereichen verstärkt anreichern [100]. Man bezeichnet diese Eigenschaft von NP auch als „*Enhanced Permeation and Retention Effect*“ (EPR-Effekt) [101;102]. Da die beiden oben erwähnten Körperverteilungen der Nanopartikel allein auf deren physikochemischen Eigenschaften beruhen, wird diese Art des *drug targeting* auch als *passives Targeting* bezeichnet.

Eine Möglichkeit dieses Verteilungsmuster zu ändern, besteht in der Oberflächenmodifikation der eingesetzten NP. Überzieht man die NP vor ihrer Applikation mit bestimmten Emulgatoren (*Coating* von NP), wie z.B. Polysorbat 80, Poloxamin 908, so ist die Aufnahme in Makrophagen und andere Organe des RES deutlich herabgesetzt [103-105]. Die Hydrophilie kann durch eine Modifikation der Partikeloberfläche mit Polyethylenglykol-Ketten (PEG) erhöht werden. Auf diesem Wege wird die Aufnahme in das phagozytierende System minimiert, man nennt diesen Effekt „Stealth Effect“ [106;107].

Eine gezielte Anlagerung der Nanopartikel an beispielsweise Tumorzellen kann durch die Bindung von Tumor-spezifischen Molekülen an die Partikeloberfläche

bewerkstelligt werden. Durch die Bindung von Antikörpern an deren Oberfläche kann eine deutliche Steigerung der Selektivität erzielt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Albumin-NP, welche an ihrer Oberfläche einen Antikörper gegen das Tumorantigen HER2 tragen, eine verstärkte Anreicherung in den Tumorzellen zeigen [108]. Man bezeichnet die geänderte Körperverteilung aufgrund einer modifizierten Nanopartikelstruktur als *aktives Targeting*. Hierfür gibt es außer Tumor-Antigenen auch viele andere Möglichkeiten.

1.5.6.1.1 Polybutylcyanoacrylat (PBCA)-Nanopartikel

Untersuchungen zur Entwicklung nanopartikulärer Systeme erstreckten sich in den letzten Jahrzehnten häufig auf Experimente mit Nanopartikeln aus synthetischen Polymeren, wie Polyacrylat (Abbildung 1.7) und Polystyrol. Nanopartikel aus synthetischen Polymeren können in der Regel nur sehr langsam aus dem Körper eliminiert werden. Daher wird in letzter Zeit viel an Nanopartikelformulierungen aus biologisch abbaubaren Materialien gearbeitet wie z.B. Polylactid-NP oder aber Albumin-NP. Eine Ausnahme bei den synthetischen Polymeren bilden hierbei Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel, welche eine gute Biodegradation aufweisen. Sie werden schnell abgebaut, jedoch entsteht bei ihrem Abbau möglicherweise toxisches Formaldehyd [109;110]. Die in dieser Arbeit verwendeten PBCA-NP wurden aus dem BCA-Monomer durch ein Miniemulsions-Verfahren hergestellt [111]. Das Monomer BCA ist unter dem Handelsnamen Indermil™ als Gewebekleber im Handel.

Mit einer P-80 Oberflächenmodifikation konnte eine erhöhte Aufnahme in kultivierte Hirnkapillarendothelzellen festgestellt werden [108]. Nanopartikel, die mit dem Enkephalin-analogen Peptid Dalargin beladen waren, führten nach einer P-80-Beschichtung zu einer Analgesie in Mäusen [112]. Dieser Effekt konnte ebenso mit dem Opioid-Rezeptor-Antagonisten Loperamid erreicht werden, der durch seine Impermeabilität an der BHS bei normaler Applikation keine analgetische Wirkung zeigt [113]. Es wurden noch weitere Substanzen verwendet wie Tubocurarin, FITC-Dextran, Rhodamin 123, Doxorubicin und NGF [114-117]. Auch Nebenwirkungen des Zytostatikums Doxorubicin konnte durch Anwendung der PBCA-NP Formulierung vermindert werden [118]. Meist ist der Teil der Nanopartikel, der das Gehirn erreicht, auch nach der Modifikation mit P-80 im Vergleich zu anderen Organen gering [119]. Gulyaev et al. fanden in ihren Studien einen signifikanten Transport von Doxorubicin

über die BHS mittels P-80 gecoateten PBCA-NP. Die gefundenen Mengen entsprachen etwa einer Gleichverteilung des Wirkstoffes im Körper der Versuchstiere, also einer Verteilung, als ob die BHS nicht vorhanden wäre [120]. Dies konnte allerdings bisher noch nicht in anderen Arbeiten bestätigt werden.

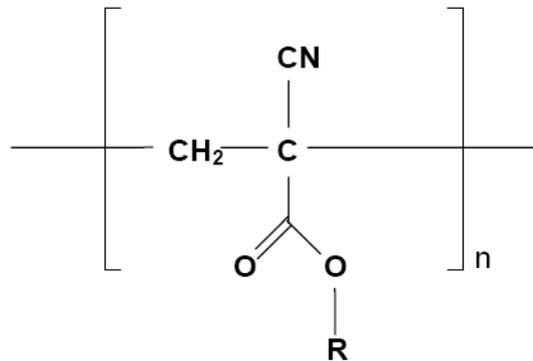


Abbildung 1.7

Strukturformel der Cyanoacrylate. R kennzeichnet den Alkylrest, der bei den in dieser Arbeit verwendeten Partikeln einem Butylrest entspricht.

1.5.6.1.2 Degradation von Nanopartikeln

Der Begriff der Degradation umfasst die komplexen Abbauvorgänge der Matrix polymerer Träger. Die Anforderungen, die an Nanopartikel als kolloidale Arzneistoffträger in Hinblick auf die Degradation gestellt werden, sind folgende:

- Sie sollen der Degradation im Körper so lange widerstehen, bis der Wirkstoff am Zielort angelangt ist und ihn dann erst freigegeben, damit er seine therapeutische Wirkung entfalten kann und
- sie sollen nach der Erfüllung ihrer Aufgabe als Wirkstoff-Carrier rasch zu untoxischen Produkten abgebaut und eliminiert werden.

Zu den nicht biodegradierbaren Kunststoffmaterialien gehört zum Beispiel Polystyren oder Polyacrylamid, das in kolloidaler Form nur für Impfstoffe oder Entwicklungsexperimente eingesetzt wird [121]. Sie blockieren als Nanopartikel das RES, in dem sie bei einer intravenösen Gabe in einer großen Menge die phagozytierenden Zellen übersättigen. Diese Zellen sind damit praktisch nicht mehr fähig, Krankheitserreger zu vernichten. Dadurch wird der Schutzmechanismus und somit die ganze körpereigene Abwehr stark beeinträchtigt. PMMA-NP sind zwar biodegradierbar, allerdings nur mit einer sehr geringen Abbaugeschwindigkeit [122]. Sie werden nach

1. Einleitung

einer subkutanen Applikation erst nach 160 Tagen signifikant ausgeschieden und eignen sich deshalb für den Einsatz als Adjuvans bei Impfstoffen. Als Arzneistoffträger für eine orale oder parenterale Applikation sind sie aufgrund ihrer nur geringen Abbaurate nicht geeignet [123]. PBCA-NP, die in dieser Arbeit zum Einsatz kommen, sind wie auch andere abbaubare Nanopartikel (z.B. Albumin-Partikel, Polylactide), für eine orale und auch parenterale Applikation geeignet. Die Biodegradation von Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikeln ist auf zwei Wegen möglich:

1. Alkalische Hydrolyse der Esterbindung unter Bildung wasserlöslicher Polycyanocarbonsäure [109],
2. Reverse Knoevenagel-Reaktion: Zerstörung der Polymerkette unter Bildung von Formaldehyd und Alkylcyanoacrylat [110]. Der entstehende Formaldehyd wurde für die in Zellkulturen beobachtete Zytotoxizität verantwortlich gemacht.

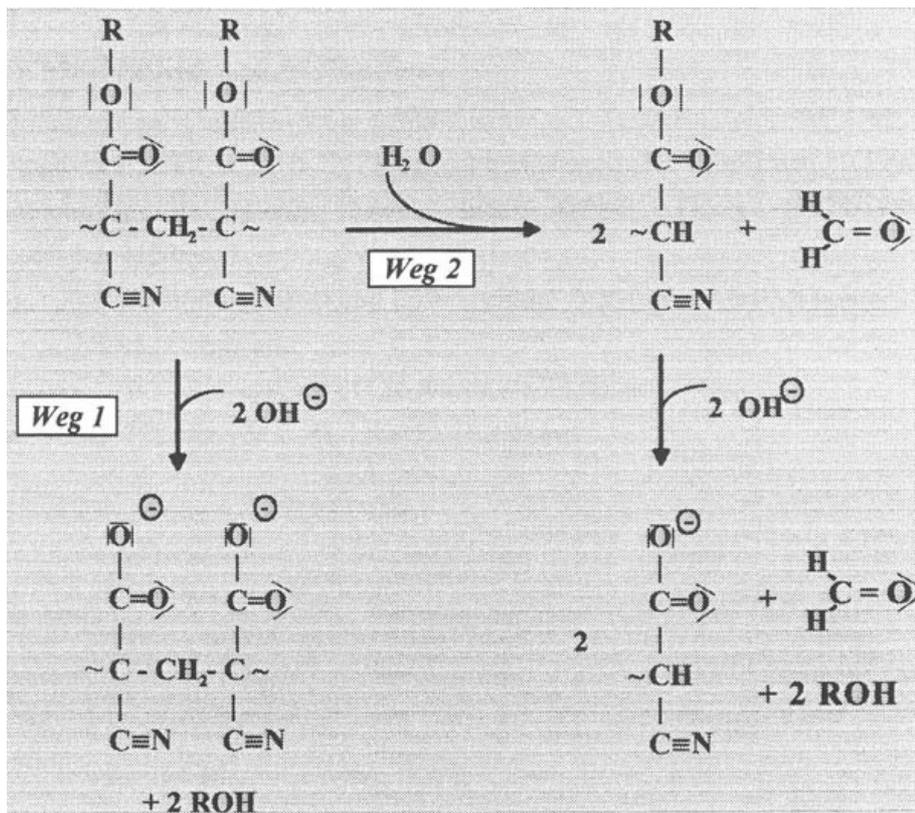


Abbildung 1.8

Abbau von Poly(alkylcyanoacrylat) nach [109]

1. Einleitung

Verlauf und Resultat der alkalischen Hydrolyse sind sowohl vom pH-Wert als auch von den Oberflächeneigenschaften der Partikel abhängig [110]. In der Startphase dominiert die Oberflächenerosion [124]. Da der erste Weg bedeutend schneller abläuft als der zweite und noch durch Esterase beschleunigt wird, stellt er den Hauptabbauweg unter physiologischen Bedingungen dar. Für diese Hypothese spricht, dass bei *in vitro* Experimenten zur Polymerdegradation das Molekulargewicht des Polymers praktisch gleich bleibt und parallel zum Abbau die Bildung des Alkohols aus den Alkylresten läuft. Im Gegensatz zum zweiten Weg, bei dem die Polymerkette zerstört wird, bleibt sie beim Hauptabbauweg intakt, wird aber durch die entstehenden Carboxylreste immer hydrophiler, bis sie schließlich wasserlöslich ist. Der zweite Weg mit Abbau zu Formaldehyd spielt *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Formaldehyd zwar abgespalten wird aber zu einem großen Anteil wieder an das andere C-H azide Ende der Polymerkette bindet (siehe Abbildung 1.9) [125], was natürlich aus toxikologischer Sicht wichtig ist.

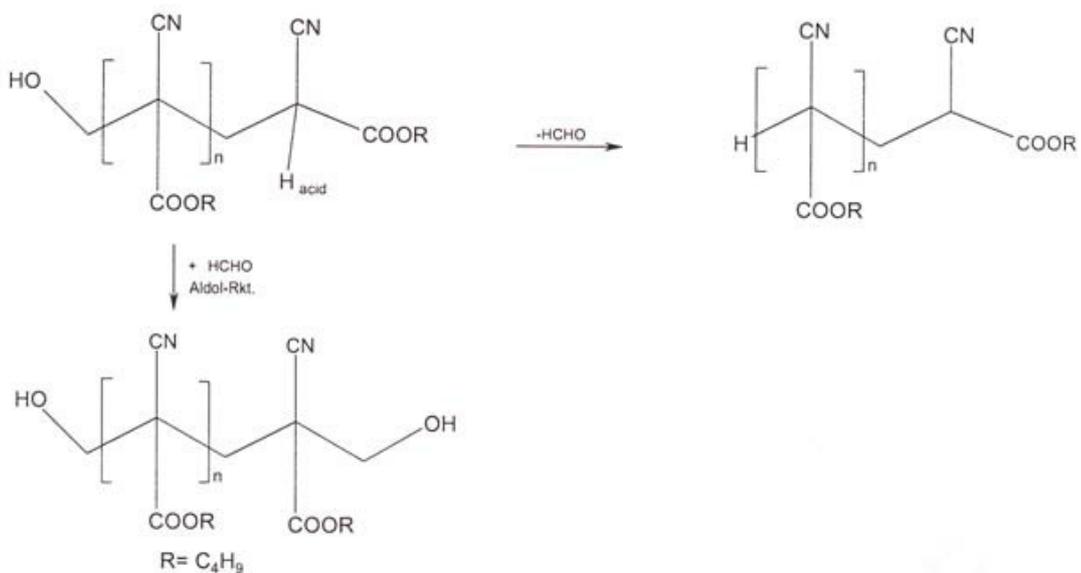


Abbildung 1.9

Bildung der PBCA-Derivate. Abspaltung und Addition von Formaldehyd

Die Geschwindigkeit der Polymerdegradation ist abhängig von der Länge der Esterseitenkette [126;127]. Ist bei inkorporativ beladenen Nanopartikeln die Abbaugeschwindigkeit des Polymers größer als die Diffusionsgeschwindigkeit des Arzneistoffes aus den Partikeln, so wird die Arzneistofffreisetzung durch die Degradationsgeschwindigkeit bestimmt [128].

Nach i.v. Gabe von PBCA-NP wird das Polymer durch Esterasen schnell abgebaut und die sich dabei bildenden, hydrophilen Polycyanocarbonsäuren können nach Erreichen eines Molekulargewichts unter $M_r = 5000$ über die Niere ausgeschieden werden.

1.5.6.1.3 Toxizität von Nanopartikeln

Bei Arzneistoffträgern wie PACA-NP ist die Toxizität der unbeladenen Partikel genauso wichtig wie die Frage, ob sich Arzneistoffe, die an Partikel gebunden sind, in ihrer Toxizität verändern. Studien über toxikologische Aspekte wurden in der Vergangenheit vielfach durchgeführt [96;124;129].

Insgesamt wird die Zytotoxizität der heute verwendeten Partikelmaterialien *in vitro* und *in vivo* als eher gering eingestuft. Daher werden sie für den Einsatz am Menschen als geeignet angesehen [130]. Bei oraler Anwendung von PACA-Nanopartikeln ist die Belastung des Organismus durch (toxische) Abbauprodukte geringer als bei parenteraler Anwendung, weil nur ein geringer Teil der verabreichten Partikel absorbiert wird [131]. Die akute Toxizität (LD_{50}) wird bei Ratten für Polybutylcyanoacrylat mit 230 mg/kg Körpergewicht und für Polyhexylcyanoacrylat mit 285 mg/kg Körpergewicht angegeben [96].

Eine Reihe von PACA-Partikeln wurde auch *in vitro* an unterschiedlichen Zellkulturen getestet, zum Beispiel Fibroblasten [124;132], Hepatozyten [130] und Makrophagen [130].

Es konnte gezeigt werden, dass toxische Effekte an Hepatozyten auftraten, wenn auch erst in einer hohen Konzentration (2×10^4 Partikel pro Zelle) [96]. Dies wurde auf die Abbauprodukte und deren Akkumulation durch fehlenden Abtransport zurückgeführt. Gipps et al. (1987) [132] untersuchten verschiedene PACA-Nanopartikel an Fibroblasten-Zellkulturen. Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der Alkylseitenkette, der verwendeten Tenside und der Partikelkonzentration auf die Zellkultur zu untersuchen. Im Hinblick auf die Partikelkonzentration konnte demonstriert werden, dass es eine direkte Proportionalität zwischen der Konzentration und den toxischen Effekten gibt. Unter einer Konzentration von 0,2 % werden praktisch keine toxischen Effekte beobachtet. Lherm et al. (1989) untersuchten an Fibroblastenkulturen verschiedene PACA-Nanopartikel, die mit Polysorbat 20 stabilisiert waren. Es zeigte sich, dass die Zytotoxizität mit steigender

Alkylseitenkette abnimmt [124]. Dieses wird damit erklärt, dass der Abbau langkettiger Alkylseitenketten langsamer abläuft und zusätzlich Alkohole mit zunehmender Kettenlänge untoxischer werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen an Fibroblasten-Zellkulturen konnte bei Versuchen an Makrophagen kein Zusammenhang zwischen Toxizität und Länge der Alkylseitenkette gezeigt werden [133].

Bei Toxizitätsuntersuchungen muss allerdings beachtet werden, dass die Untersuchungen an Zellkulturen nur beschränkt aussagekräftig sind. Zellkulturen sind biologische Systeme, die sich nicht vollkommen standardisieren lassen und daher von Zellreihe zu Zellreihe andere Reaktionen auf Nanopartikel auftreten können. Zum anderen muss beachtet werden, dass Degradationsprodukte in den Zellen akkumulieren können.

1.6 *In vivo und in vitro Modelle der BHS*

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Modelle der BHS entwickelt, die sich generell in *in vivo*, *ex vivo* und *in vitro* Modelle einteilen lassen.

1.6.1 *In vivo Modelle der BHS*

1.6.1.1 *Brain uptake index (BUI)*

Der *brain uptake index* (BUI) wird durch schnelle Injektion einer Mischung aus radioaktiv markierter Test- und Referenzsubstanz in die innere Carotis-Arterie ermittelt [134]. Nach 5-15 Sekunden wird das Versuchstier dekapitiert, das Gehirn entnommen und die Radioaktivität bzw. die Konzentration der beiden injizierten Substanzen im Gehirn gemessen. Der BUI wird aus dem Verhältnis von Test- zu Referenzsubstanz im Gehirn und der Injektion [135] berechnet. Aufgrund der kurzen Versuchszeit ist dieses Verfahren nur für Substanzen geeignet, die die BHS schnell überwinden. Hydrophile Substanzen, die nur sehr langsam in das Gehirn aufgenommen werden (z.B. Peptide und Proteine), können mit dieser Methode nicht untersucht werden [136]. Dieser Versuch scheint auch generell relativ störanfällig für Artefakte zu sein. Hardebo et al. untersuchten verschiedene Parameter wie Injektionsvolumen und Zirkulationszeit und stellten hierbei große Unterschiede fest [137]. Der BUI kann also nur begrenzt eingesetzt werden.

1.6.1.2 Perfusion des Gehirns

Bei dieser Methode wird eine Carotis-Arterie mit Medium und messbarer Testsubstanz perfundiert. Anschließend wird das Gehirn entnommen, homogenisiert und die Testsubstanz vermessen. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem fehlenden Blutfluss, so dass die Metabolisierung der Testsubstanz durch Blutbestandteile minimiert werden kann und zudem noch die Möglichkeit einer optimierten Perfusatzusammensetzung besteht [138]. Diese Technik wurde hauptsächlich für die Untersuchung von Ratten und Meerschweinchen entwickelt [139;140]. Die übliche Perfusionszeit beträgt in der Ratte 30 Sekunden, während im Meerschweinchen, aufgrund der nicht verzweigten Carotis-Arterie, Zeiten bis zu 20 Minuten möglich sind [140].

1.6.1.3 Capillary Depletion-Methode

Um bei der im Gehirn gemessenen Arzneistoffmenge zwischen Arzneistoff in den Kapillaren und im Extrazellularraum des Gehirns unterscheiden zu können, wurde die Capillary Depletion-Methode speziell zur Untersuchung des Transports von Makromolekülen an der BHS via Transzytose von Triguero et al. 1990 entwickelt. Es handelt sich hierbei um eine kombinierte Methode aus Gehirnperfusion nach Takasato mit anschließender Capillary Depletion.

Hierbei wird das Gehirn nach dem Experiment homogenisiert und durch eine Dextran-Dichte-Zentrifugation in Kapillaren (Pellet) und Hirngewebe (Überstand) fraktioniert [141]. Durch die Abtrennung der Kapillaren vom Hirngewebe ist es möglich, zwischen Transzytose der untersuchten Substanz ins Hirngewebe und einfacher Bindung der zirkulierenden Substanz an die Kapillarendothelzellen und/oder Endozytose in diese Zellen zu unterscheiden. Mit dieser Methode konnte z.B. gezeigt werden, dass mit dem gegen den Transferrin-Rezeptor gerichteten Antikörper OX26, der an Liposomen gekoppelt war, Liposomen durch Transzytose ins Gehirn gelangten und dass diese nicht nur in den Kapillarwänden festgingen [142].

1.6.1.4 Mikrodialyse

Bei der intrazerebralen Mikrodialyse wird eine Mikrokanüle, die mit einer semipermeablen Membran versehen ist, in das Gehirn des Versuchstieres implantiert

und perfundiert. Im Anschluss an die Injektion der Testsubstanz werden Proben des Perfusates gesammelt und vermessen. Je nachdem, wo der Schlauch im Gehirn implantiert wird, ist die Mikrodialyse vielseitig verwendbar und sind Untersuchungen unterschiedlicher Wege des Arzneistoff-Transports an der Blut-Hirn-Schranke möglich.

Der Vorteil dieser Methode besteht auch darin, dass die Tiere während der Zeit der Probensammlung nicht narkotisiert werden müssen und sich im Käfig frei bewegen können. Dadurch werden sogar verhaltensbiologische Untersuchungen möglich.[143] Beispiele für Mikrodialyseexperimente sind Experimente zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke nach Perfusion mit einer hypertonen Lösung [144] oder Erstellungen von Konzentrations-Zeit-Profilen von Arzneistoffen in der Extrazellular-Flüssigkeit, nachdem diese intravenös verabreicht wurden [145;146]. Mikrodialyse-Experimente wurden auch durchgeführt, um den Transport von Rhodamin 123 durch P-Glykoprotein oder eines Dynorphin ähnlichen Peptids an der Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen [144;147;148]. Auch durch nanopartikuläre Formulierungen transportierte Substanzen wurden bereits mit Hilfe des Mikrodialyseverfahrens erfasst [149].

1.6.2 Ex vivo Modelle der BHS

1.6.2.1 Isolierte Gehirnkapillaren

Die Entwicklung von Methoden zur Isolierung von Kapillaren aus dem Gehirn von Versuchstieren erlaubte erstmals die gezielte Untersuchung von Transportprozessen an der BHS *in vitro*. Die zur Verfügung stehenden Protokolle zur Isolierung und Aufreinigung der Kapillaren sind vielfältig. Mit ihnen wurden zahlreiche Studien zur Physiologie, Biochemie und Entwicklungsbiologie der BHS durchgeführt. Vorteil dieses Modells ist, dass der intakte Gewebeverband nicht erst zerstört und später in Kultur wieder zu einem konfluenten Monolayer herangezüchtet werden muss. Der Verband bleibt intakt, ist der *in vivo* Situation also sehr ähnlich [150]; Joó, 1985). Ebenso entfällt der Nachteil, dass wichtige Charakteristika der Blut-Hirn-Schranke wie die Dichtigkeit der *tight junctions* und die Expression von spezifischen Markern während der Kultivierung nachteilig verändert werden, wie es bei Zellkulturmodellen meist der Fall ist. Allerdings lässt sich mit diesem Modell nicht eindeutig differenzieren, ob die beobachtete Aufnahme in die intakten Kapillarfragmente von

der basolateralen (Hirnseite) oder der apikalen (Blutseite) Membran erfolgt [138]. Da die basolaterale Membran für in der Lösung vorliegende Substanzen allerdings leicht zugänglich ist und außerdem das Kapillarlumen zumindest an den Enden deutlich kollabiert, sind die im Kapillarmodell erkannten Transportprozesse zum Großteil auf Vorgänge an der basolateralen Membran zurückzuführen [151]. Verunreinigungen durch andere Zelltypen [152] und der Verlust von metabolischer Aktivität während der Präparation [153] sind weitere Einschränkungen des Modells. So ist z.B. der Verlust von Adenosin-Triphosphat (ATP) durch die Schädigung der Zellen mit enzymatischen oder mechanischen Methoden für die Untersuchung energieabhängiger Prozesse kritisch [154].

1.6.3 *In vitro* Modelle der BHS

Die *in vitro* Systeme der BHS spielten in den vergangenen Jahren eine wichtige Rolle im Verständnis der biochemischen Eigenschaften der BHS. Zu den *in vitro* Modellen der BHS zählen diverse Zellkultursysteme. Jedes dieser Modelle hat seinen Beitrag geleistet zum besseren Verständnis der zellulären, biochemischen und molekularen Eigenschaften der BHS [155;156].

1.6.3.1 *Primäre zerebrale Endothelzellkulturen*

Neben den isolierten Kapillaren werden Gehirnkapillarendothelzellen (*BCECs*; *brain capillary endothelial cells*) als Hauptbestandteil der BHS als Zellkulturmodell verwendet. Sie können aus den Gehirn-Kapillaren isoliert und in Kultur gehalten werden. Es wurde bereits die Kultivierung von primären oder passagierten BCECs aus Maus [157], Ratte [158], Rind [159], Mensch [160] und Schwein [157] beschrieben. Die Isolierung der Zellen erfolgt durch mechanische und enzymatische Dispergierung, gefolgt von Filtrations- und Zentrifugationsschritten. Die Zellen wachsen in unterschiedlich vorbehandelten Kulturgefäßen in einer einzigen Zellschicht heran. Diese Monolayer weisen viele der charakteristischen Eigenschaften der BHS *in vivo* auf. So konnte gezeigt werden, dass primäre BCECs aus Rinderhirn *tight junctions*, eine geringe Pinozytoseaktivität und ein polarisiertes Wachstum aufweisen [161]. Auch das Vorkommen charakteristischer Enzyme und Proteine, wie der alkalischen Phosphatase oder des von-Willebrand-Faktors wurde demonstriert [162;163]. Neben der Präparation aus Rinderhirnen hat sich die Präparation von Schweinehirnen durchgesetzt [157;164].

Spezies ist relativ einfach auf Schlachthöfen zu bekommen und eine große Zahl von Zellen (mehr als 10 Mio. Zellen pro Hirn) kann isoliert werden. Dagegen lassen sich aus 6-10 Rattenhirnen maximal 5 Mio. Zellen gewinnen [165]. Menschliches Hirnmaterial steht nur in geringer Menge zur Verfügung, da das Gewebe aus Biopsien stammt (1,0-1,8 g). Darüber hinaus stammen die Gewebeproben aus unterschiedlichen Hirnregionen, was eine Vergleichbarkeit der Experimente erschwert.

1.6.3.2 Zelllinien

Zelllinien werden entweder durch Immortalisierung normaler Zellen oder aus Tumorgewebe gewonnen. Immortalisierte Zellen sind derart verändert, dass spontan aus einer Primärzelllinie eine permanent wachsende Zelllinie entsteht. Generell verlieren sie meist die ursprünglichen charakteristischen Eigenschaften der BHS wieder und diese lassen sich meist nur in Co-Kultur mit Astrozyten, Perizyten oder Neuronen halten [159;166-168]. Es wurden dennoch einige Zelllinien etabliert, die einige Eigenschaften der BHS behalten haben. RBE4 Zellen etwa sind ein Klon zerebraler Rattenkapillarendothelzellen und zeigen einen Phänotyp wie nicht transformierte Zellen. Sie exprimieren typische endothelzellspezifische Marker und bleiben empfindlich gegenüber Angiogenese- und astroglialen Faktoren für die Expression der BHS bezogenen Funktion der γ -Glutamyl-Transpeptidase und der alkalischen Phosphatase [169]. Ähnliche Systeme, die sich von zerebralen Mäuse- oder Rinderkapillarendothelzellen ableiten, zeigten ebenfalls, dass einige morphologische wie auch biochemische Marker erhalten bleiben [170]. Bei Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranke Eigenschaften ist auch der transendotheliale elektrische Widerstand Zellen von Bedeutung [171]. Dieser war in Zelllinien bisher aber im Vergleich zu primär isolierten Hirnkapillarendothelzellen [172] nur abgeschwächt zu messen. Die Etablierung einer Zelllinie, die den Eigenschaften primärer Zellen nahe käme, wäre von erheblichem Vorteil, aufgrund einfacherer Handhabung. Ferner sind viele Zelllinien noch nicht so gut charakterisiert wie die primären Zellkulturen. Es besteht jedoch das Bemühen, Zelllinien hinsichtlich ihrer Eigenschaften besser zu charakterisieren und mitunter auch nur für gezielte Fragestellungen einzusetzen [171;173;174]. Für eine Gesamtdarstellung aller Eigenschaften stellen indes Primärzellen das Modell der Wahl dar.

1.7 *In vitro* Freisetungs-Experimente

1.7.1 Freisetzung von Wirkstoffen und Abbauverhalten polymerbasierten nanopartikulären Arzneiformen

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus Depotarzneiformen auf Basis bioabbaubarer Polymere ist vom Typ der Arzneiform und dem Diffusions- und Abbauverhalten der verwendeten Polymere abhängig (Abbildung 1.10).

Prinzipiell kann man zwei Typen von Freigabesystemen unterscheiden:

- Solche, die den Wirkstoff mit einer Hülle umgeben = Reservoir-Typ [a],
- solche, in der der Wirkstoff homogen verteilt als Dispersion = solid dispersion [b] oder gelöst = solid solution [c] vorliegt.

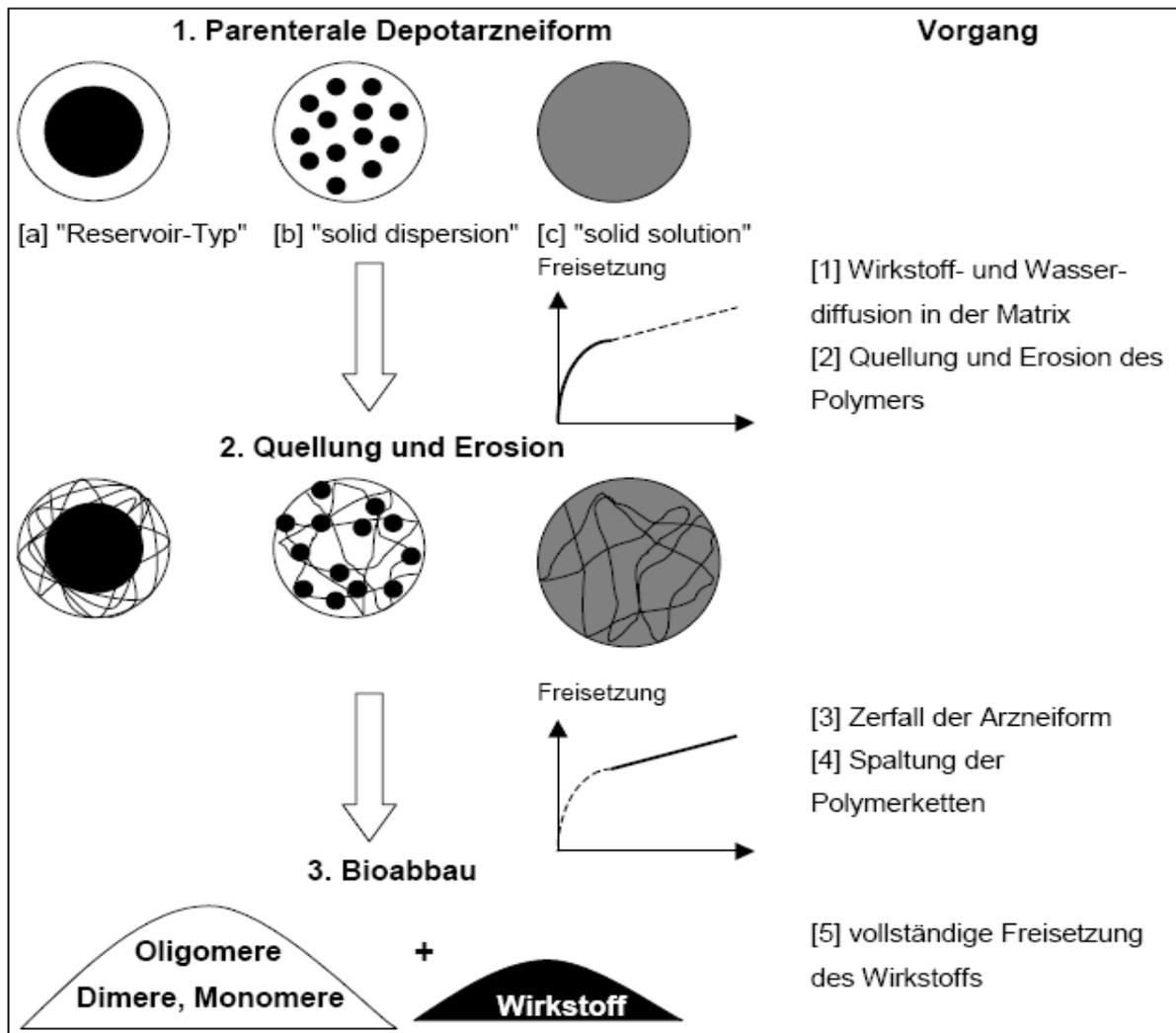


Abbildung 1.10

Freisetzung und Abbau von nanopartikulären Depotarzneiformen auf Basis bioabbaubarer Polymere, schematisch aus [175]

Grundsätzlich kann man feststellen, dass sich die Prozesse [1] bis [4] überlagern und so zum Freisetzungsprofil bis zur vollständigen Freigabe des Wirkstoffs [5] aus der jeweiligen Formulierung beitragen. Welchen Einfluss die Teilprozesse auf die Freisetzung ausüben, wird in Abbildung 1.11 verdeutlicht. Aufgrund der Überlagerung der Prozesse ist das Freisetzungsverhalten aus Polymeren schwer vorherzusagen und zu steuern [176].

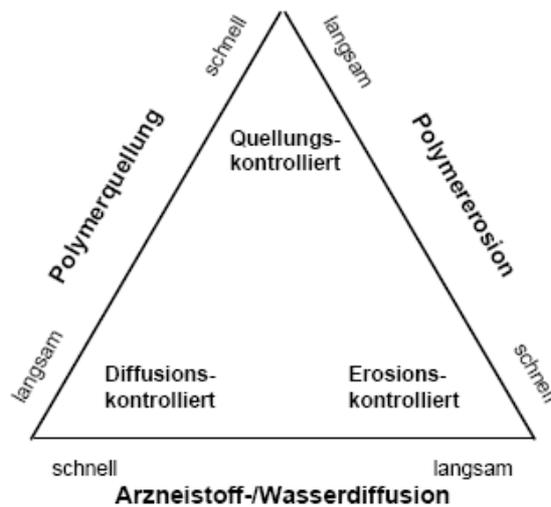


Abbildung 1.11

Einfluss von Wasser- und Wirkstoffdiffusion, Erosionsgeschwindigkeit und Quellungsverhalten des Polymers auf den Freisetzungsmechanismus aus einer parenteralen Depotarzneiform [176]

1.7.2 *In vitro* Freisetzungsmodelle für nanopartikuläre Arzneiformen

Zur Durchführung von Auflösungs- und Freisetzungsversuchen sind in der Literatur eine Vielzahl an Methoden beschrieben worden. In den nationalen und internationalen Arzneibüchern wird zwischen geschlossenen (z. B. Drehkörbchen (Basket), Blattrührer (Paddle)) und offenen Systemen (z. B. Durchflusszelle, Stricker-Lösemodell [177]) unterschieden. Die Testgeräte der offiziellen Methoden sind exakt dimensioniert und die Untersuchungsparameter verbindlich festgelegt worden [178]. Im Allgemeinen werden für die *in vitro* Freisetzung von Depotarzneiformen auf 37 °C temperierbare Inkubationsgefäße verwendet, die einen leichten Austausch des Akzeptormediums ermöglichen.

Apparative freisetzungsbeeinflussende Faktoren sind dabei Temperatur, Flüssigkeitsvolumen, pH-Wert, Osmolarität, Umdrehungszahl und Tensidzusatz.

1. Einleitung

Die Dissolutionapparatur, wie sie in den Pharmakopöen beschrieben wird, ist jedoch für partikuläre Arzneiformen aus unterschiedlichen Gründen nicht anwendbar. Die Freigabe pro Zeiteinheit ist meist so klein, dass man unterhalb der Nachweisgrenze des jeweiligen Wirkstoffes liegt. Demzufolge muss mit zum Teil sehr kleinen Volumina gearbeitet werden, um akzeptabel analysieren zu können. Es wurden daher vielfach auch kleinere Probenansätze im 1-2 ml Bereich gemacht [179;180]. In der Regel finden die Freisetzungsexperimente bei 37 °C, auf einem Schüttler bei definierter Umdrehungszahl pro min statt. Als FreisetzungsmEDIUM wird überwiegend Phosphatpuffer pH 7,4 [181] verwendet, bei der Freisetzung von Proteinen wird häufig humanes Serum-Albumin als Stabilisator und Adsorptionsinhibitor [182] zugesetzt. Tris-NaCl-Puffer-Lösungen werden ebenfalls eingesetzt [183], wie auch Natriumazid-haltige Lösungen [184]. Auch Lösungsvermittler wie z.B. P-80 [185] werden wässrigen Pufferlösungen zugesetzt. Für vielerlei NP-Zubereitungen sind zwei Arten von Freisetzungsexperimenten beschrieben. Die NP-Zubereitung wird entweder in ein Dialysesäckchen oder Dialysetube überführt und in ein Flüssigkeitsreservoir (Wasser, PBS, ...) eingebracht [186-190] oder die NP werden in einem bestimmten Medium (verschiedene Puffer, Plasma, Serum, Gewebhomogenate, ...) direkt inkubiert [179;180;184;185;191;192]. Zu bestimmten Zeiten wird abzentrifugiert und der freigesetzte Stoff im Überstand vermessen. Die direkte Inkubation im umgebenden Medium liegt den hier durchgeführten Freisetzungsexperimenten zugrunde. Nach Arzneibuch sind die Freisetzungsexperimente bekanntermaßen standardisiert, was bei Experimenten mit Nanopartikeln noch nicht der Fall ist. Somit ist es schwierig, die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Andererseits lassen sich solche Experimente auch nicht problemlos standardisieren, da viele verschiedene Trägermaterialien, freizusetzende Substanzen und ebenso Anwendungsgebiete im Körper existieren

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Penetration und die Aufnahme, sowie den Mechanismus der Aufnahme beladener PBCA-NP Formulierungen durch die BHS zu untersuchen. Des Weiteren sollte die Freisetzung von Doxorubicin aus PBCA-NP im Gehirn und die Interaktion von PBCA-NP mit der BHS im Hinblick auf eine eventuelle Stoffwechselbeeinflussung und Toxizität näher beleuchtet werden.

Die Arbeit gliederte sich in zwei Teile. Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit waren *in vivo* Studien an gesunden Ratten. Es sollte die Passage verschiedener PBCA-NP Formulierungen durch die BHS visualisiert und qualitativ bewertet werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine Oberflächenmodifikation (*Coating*) mit P-80 zwingend für die Überwindung der BHS erforderlich ist.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit *in vitro* Experimenten zum Thema Freisetzung von Doxorubicin aus PBCA-NP im Gehirn und der Interaktion von PBCA-NP mit isolierten Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn.

Bei den Freisetzungsexperimenten sollte untersucht werden, welche Menge des inkorporierten Doxorubicins nach einer gewissen Zeit aus den PBCA-NP im Gehirn freigesetzt wird. Dies sollte unter physiologischen Bedingungen in Gehirnhomogenat und Puffer untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Stabilität des reinen Doxorubicin untersucht werden, sowie eine Methode entwickelt werden, die PBCA-NP von nicht inkorporierter Substanz zu reinigen, ohne dabei einen Verlust an Doxorubicin durch Adsorption des Doxorubicin an vielerlei Materialien zu haben.

Experimente mit Kapillarendothelzellen sollten zeigen, ob bestimmte PBCA-NP Formulierungen in die Kapillarendothelzellen aufgenommen werden und welcher Mechanismus dieser Aufnahme zugrunde liegt. Eine weitere Reihe Experimente sollte Aufschluss darüber geben, wie unbeladene PBCA-NP die Stoffwechselaktivität der Atmungskette in Kapillarendothelzellen beeinflussen und ob die Zellen toxische Erscheinungen zeigen. Es sollte zudem die für Kapillarendothelzellen toxische Grenze der Feststoffkonzentration ermittelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
0,9 % NaCl-Lösung	Braun, Melsungen, D
Amphotericin B	Biochrom, Karlsruhe, D
AlamarBlue [®]	AbD Serotec, Oxford, UK
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Riedel-de Haën, Seelze, D
Ciprobay [®] (Ciprofloxacin)	Bayer-Schering, Berlin
Collagen G	Biochrom, Karlsruhe, D
Collagenase-Dispase	Roche, Mannheim, D
DABCO	Roth, Karlsruhe, D
Dextran (durchschnittliches MG: 63.700 g/mol)	Sigma, Taufkirchen, D
D-Glucose Merck,	Darmstadt, D
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	J.T. Baker, Deventer, NL
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Riedel-de Haën, Seelze, D
Dispase	Becton Dickinson, Heidelberg, D
DMEM/Ham's F12 (1:1)	Biochrom, Berlin, D
Doxorubicin HCl	Sigma, Taufkirchen, D H.G. and C. Blau GmbH, Hamburg, D
Earles buffer (1x) mit Phenolrot	Biochrom, Berlin, D
FITC-Dextran (M _r 70.000)	Sigma, Taufkirchen, D
Essigsäure 99-100 %	Theoretikum, Universität Heidelberg, D
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, D
HEPES Lösung 1 M	Biochrom, Berlin, D
Immersionsöl 3C 247 (Brechungsindex = 1,482)	Chroma, Münster, D
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, D
Isopentan	VWR international, Fontenay sous Bois, F
Kaliumchlorid (KCl)	Ferak, Berlin, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën, Seelze, D
Kanamycin	Biochrom, Berlin, D
Ketavet (Ketamin)	Pfizer, Berlin, D
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, D
Lutrol F68	BASF, Ludwigshafen, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	J.T. Baker, Deventer, NL

3. Material und Methoden

Substanz	Hersteller
Medium 199	Biochrom, Berlin, D
Medium 199 (10x)	Sigma, Taufkirchen, D
Methanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe, D
Nagellack, farblos (handelsüblich)	DM Drogeriemarkt, Heidelberg,
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker, Deventer, NL
n-Butyl- α -cyanoacrylat	Henkel-Loctide, Dublin, Ir
New born calf serum (NCS)	Biochrom, Berlin, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PenStrep	Biochrom, Berlin, D
Polysorbat 80	Roth, Karlsruhe, D
Percoll™	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Rhodamin 123	Sigma, Taufkirchen, D
Rompun® 2 % (Xylazin)	Provet AG, Lyssach b. Burgdorf, CH
Sephadex® G50 fine Pulver	GE Healthcare, Uppsala, S
Tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat (Na ₃ PO ₄ x 12 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, D
Triton-X-100	Merck, Darmstadt, D
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma, Taufkirchen, D
Trypsin (1:250), 0,25 % in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, D
Wasser, bidestilliert	Hauseigene Destillationsanlage

Falls nicht in Tabelle 3.1 oder Tabelle 3.2 erwähnt, wurden die Stoffe/Lösungen etc. von gängigen Firmen mindestens in der Reinheitsstufe „zur Analyse“ verwendet.

3.2 Pufferlösungen, Kulturmedien und sonstige Lösungen

Zusätze zu Pufferlösungen und Kulturmedien (Stammlösungen):

Kanamycin	50 mg/ml
HEPES	1 M
L-Glutamin	200 mM
PenStrep	10.000 IE bzw. 10.000 µg/ml
Kälberserum (NCS)	

Tabelle 3.2 listet alle in der Arbeit verwendeten Puffer, Medien und sonstige Lösungen auf, sowie deren Zusammensetzung

3. Material und Methoden

Tabelle 3.2 Pufferlösungen, Kulturmedien und sonstige Lösungen

Pufferlösungen

Krebs-Ringer-Puffer (KRB), pH 7,4

NaCl	8,30 g	142 mM
KCl	0,23 g	3 mM
K ₂ HPO ₄	0,34 g	1,5 mM
HEPES	2,40 g	10 mM
D-Glucose	0,72 g	4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,24 g	1,2 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,21 g	1,4 mM
Aqua bidestillata	ad 1000 ml	

Phosphat-gepufferte Salze (PBS⁻), Ca²⁺-/Mg²⁺-frei, pH 7,4

NaCl	8,00 g	137 mM
KCl	0,20 g	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	0,20 g	1,5 mM
Wasser	ad 1000 ml	

Pufferlösungen

Phosphat-gepufferte Salze (PBS⁺⁺), Ca²⁺-/Mg²⁺-haltig, pH 7,4

NaCl	8,00 g	137 mM
KCl	0,20 g	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	0,20 g	1,5 mM
MgCl ₂	0,048 g	0,5mM
CaCl ₂	0,1 g	0,9mM
Wasser	ad 1000 ml	

Kulturmedien

Einfriermedium

DMSO	5 ml
NCS	ad 50 ml

Kulturmedium, serumhaltig

Medium 199	500 ml	
L-Glutamin	2 ml	1,5 mM
PenStrep	5 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
Kanamycin	5 ml	0,5 µg/ml
Ciprofloxacin	2,5 ml	10 µg/ml
Pferdeserum	100 ml	16 %

3. Material und Methoden

Kulturmedium, serumfrei

DMEM/Ham's F12 (1:1), glucosefrei	500 ml	
L-Glutamin	5 ml	4,5 mM
PenStrep	5 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
Kanamycin	5 ml	0,5 µg/ml
Ciprofloxacin	2,5 ml	10 µg/ml

Präparationsmedium

Medium 199	500 ml	
L-Glutamin	2 ml	1,5 mM
PenStrep	5 ml	100 IE/ml bzw. 100 µg/ml
Kanamycin	5 ml	0,5 µg/ml
Ciprofloxacin	2,5 ml	10 µg/ml

sonstige Lösungen

Dextran-Lösung

dextran (~160 kDa/mol)	360 g
Earle's buffer (1x) mit Phenolrot	ad 2 l

Mowiol® Eindeckmedium

Mowiol 4-88	2,4 g	9 %
Glycerin	6 g	
DABCO	0,266 g	0,1 %
TRIS 2M (pH 8,5)	12 ml	
Wasser	6 ml	

Percoll-Lösung ($\rho = 1.03 \text{ g/cm}^3$)

PBS --	400 ml
Percoll ($\rho = 1.131 \text{ g/cm}^3$)	90 ml
Medium 199 (10x)	10 ml

Percoll-Lösung ($\rho = 1.07 \text{ g/cm}^3$)

PBS --	200 ml
Percoll ($\rho = 1.131 \text{ g/cm}^3$)	270 ml
Medium 199 (10x)	30 ml

Triton-X-100-Lösung 1 %

Triton-X-100	1 g	1 %
KRB	ad 100 ml	

3.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.3 führt in dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien auf
Alle übrigen nicht genannten Verbrauchsmaterialien wurden bei gängigen Herstellern bezogen

Tabelle 3.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser 24x50 mm	Roth, Karlsruhe, D
Einbettmedium für Gefrierschnitte, Jung	Leica Microsystems, Nussloch, D
Einmalpipetten 5 ml/10 ml/25 ml	Corning Costar, Wiesbaden, D
Einmalskalpelle, Paragon	NeoLab Migge, Heidelberg, D
Einmalspritzen 1 ml Luer Lock	Braun, Melsungen, D
Filtereinheit Bottletop Filter 150 ml	Corning Costar, Wiesbaden, D
Mikrotomklingen, S35 Feather	PfM, Köln, D
Objekträger Superfrost Plus®	Menzel, Braunschweig, D
Objekträgerkammer Lab-Tek® Permanox® 8 Well	Nunc, Wiesbaden, D
Sephadex® PD Midi Trap g 10 Fertigsäulen	GE Healthcare, Uppsala, S
Sephadex® PD 10 Desalting Fertigsäulen	GE Healthcare, Uppsala, S
Siebgewebe Scrynell® 180 µm	Heidland, Harsewinkel, D
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zellkulturflaschen 175 cm ²	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zellkulturplatten 96 Well	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zellkulturplatten 6 Well	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zellschaber	Corning Costar, Wiesbaden, D
Zentrifugenbecher 250 ml	Beckman, München, D

3.4 Geräte

Tabelle 3.4 führt alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte auf

Tabelle 3.4 verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
-85 °C Ultra-Tiefkühlschrank UA1085	New Brunswick Scientific, Nürtingen, D
Autoklav Systec VX-95	Systec GmbH, Wetztenberg, D
Brutschrank BBD6220, heißluftsterilisierbar	Heraeus, Hanau, D
Brutschrank Cytoperm® 2, heißluftsterilisierbar	Heraeus, Hanau, D
Einfrierbox Nalgene®	Nunc, Wiesbaden, D
Eismaschine, Iceflaker Gel-o-mat	ELGE Eismaschinen, Lippstadt, D
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, D
Fluoreszenz-Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent®	Labsystems, Frankfurt, D
Homogenisator, Typ 50201	Heidolph-Instruments, Schwabach, D

3. Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Inkubator 1000, Kombi mit Schüttler	Heidolph-Instruments, Schwabach, D
Inversmikroskop Zeiss ID 03	Zeiss, Jena, D
Kräuter/Fleischroller	WMF, Geislingen, D
Kryostat, CM 3050	Leica Microsystems, Bensheim, D
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Ika-Werk, Staufen, D
Mikroskop DM IRBE, konfokal	Leica Microsystems, Bensheim, D
pH-Meter 766 CaliMatic	Knick, Berlin, D
Pipette Handystep [®] für PD-Tips	Brand, Wertheim, D
Pipetten für Wechselspitzen	Labsystems, Frankfurt, D
Pipettierhilfe (Pipetboy [®] , Acuboy [®])	Integra Biosciences, Fernwald, D
Rundschüttler Unimax 1010 mit Inkubator	Heidolph-Instruments, Schwabach, D
Tischzentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg, D
Trockenschrank FUNCTIONline UT 6	Heraeus, Hanau, D
Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 70	Bandelin, Berlin, FRG, D
Vakuumpumpe Vacuubrand MZ 2C	Vacuubrand, Wertheim, D
Vortex-Genie	Bender-Hobein, Zürich, CH
Waage 3736	Sartorius, Göttingen, D
Waage 1216MP	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbadrundschtler	Aquatron Infors, Bottmingen, CH
Wasserdstillationsanlage Bi-Dest 2108	GFL, Burgwedel, D
Werkbank CEAG Bio Bench	Envirco, Dortmund, D
Werkbank CEAG Dominit	Envirco, Dortmund, D
Werkbank HERAsafe	Heraeus, Hanau, D
Zählkammer nach Neubauer	Renner, Darmstadt, D
Zentrifuge Beckman J2-MC, Rotor JA-12	Beckman Instruments, München, D
Zentrifuge Sorvall Superspeed RC2-B, Sorvall GSA-Rotor	Sorvall, Bad Homburg, D
Zentrifuge Universal 16R Rotor: 1624	Hettich, Tuttlingen, D
Zetasizer NanoZS	Malvern Instruments GmbH, Karlsruhe, D

3.5 Software

Für Text- und Datenverarbeitung, sowie zum Erstellung von Tabellen und Abbildungen wurden die Programme Microsoft[®] Word 2003, Microsoft[®] Excel 2003 (Microsoft[®], Unterschleissheim, D), sowie GraphPad Prism[™] 4 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Die Datenerfassung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop erfolgte mittels Leica TCS-SP Software (Leica Microsystems, Heidelberg, D). Zur Datenerfassung am Fluoroskan Ascent[®] wurde das Programm Ascent Software[®], Version 2.4.1 (Labsystems, Helsinki, FIN) verwendet.

3.6 Herstellung beladener PBCA-Nanopartikel

Die fluoreszenzmarkierten bzw. beladenen PBCA-NP wurden bei der Firma NanoDel Technologies GmbH in Magdeburg hergestellt und charakterisiert bezüglich Größe, Polydispersität, Zetapotential und Beladungsgrad. Das Herstellungsverfahren beruht auf einer Mini-Emulsionstechnik, die von der Firma NanoDel Technologies GmbH entwickelt wurde.[2]. Hierbei ist hervorzuheben, dass bei diesem Verfahren der Stoff, mit dem beladen wird, direkt inkorporiert wird und dass dieser nicht nachträglich an die Oberfläche adsorbiert wird, wie bei anderen Verfahren. [193;194] Man erzielt sowohl einen höheren Feststoffgehalt als auch einen höheren Beladungsgrad.

3.6.1 FITC-Dextran (1,5 %) markierte PBCA-Nanopartikel

Es wurden 2 Lösungen für die Miniemulsion hergestellt. Lösung 1 enthielt 33,75 mg FITC-Dextran, 0,513 g Polysorbat 80 und 9 ml 0,8 M Phosphorsäure, die zuletzt zugegeben wurde. Nach 30 Minuten wurde die entstandene klare Lösung in Eiswasser gestellt.

Lösung 2 enthielt 90 mg Sojaöl und 2,3 g des Monomers n-Butyl- α -cyanoacrylat (BCA). Diese beiden Komponenten wurden vorsichtig in einem Reaktionsgefäß gemischt. Lösung 2 wurde zu Lösung 1 gegeben und mit einem Ultraschallhomogenisator bei 70 % Leistung 2 min unter Eiskühlung behandelt.

Die Polymerisation wurde durch Tropfen der Miniemulsion in 9 ml 0,8 M Ammoniak-Lösung gestartet. Hierbei wurde stets gerührt. Nach 5 min wurde der pH wiederum mit 0,8M Ammoniak-Lösung auf 7 eingestellt. Die Lagerung der Suspension erfolgte bei 4 °C unter Lichtausschluss.

3.6.2 Rhodamin 123 (1,5 %) markierte PBCA-Nanopartikel

Auch hierfür wurden wiederum 2 Lösungen vorbereitet. Lösung 1 bestand aus 18 mg Rhodamin 123, 60 mg Lutrol F68 und 24 mg Natrium-Dodecylsulfat (SDS). Zuletzt wurden 4,8 ml 0,1 M Phosphorsäure zugegeben. Nach 30 min wurde die klare Lösung in Eiswasser platziert.

Lösung 2 setzte sich aus 72 mg Sojaöl und 1,2 g des Monomers BCA zusammen, die gemischt wurden. Lösung 2 wurde wiederum in Lösung 1 überführt und 4 min unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt. Das Auslösen der Polymerisation erfolgte

unter tropfenweiser Zugabe der Miniemulsion in 4,8 ml 0,1 M Ammoniak-Lösung unter stetigem Rühren.

Nach 5 min wurde der pH mit 1 M Ammoniak-Lösung auf 7 eingestellt und die NP-Suspension von da an bei 4 °C dunkel gelagert.

3.6.3 Doxorubicin-HCl (10 %) beladene PBCA-Nanopartikel

Zwei Lösungen wurden auch für die Doxorubicin-HCl beladenen NP benötigt. Lösung 1 beinhaltete 75 mg Lutrol F 68, sowie 30 mg SDS, welche beide zunächst in 6 ml 0,1 M Phosphorsäure gelöst wurden. Nach 15 min Rühren wurden 150 mg Doxorubicin-HCl zugesetzt. Die Lösung wurde auf Eis gelagert.

Für Lösung 2 wurden 90 mg Sojaöl und 1,2 g BCA gemischt und auf Eis gestellt.

Lösung 2 mit Lösung 1 vereinigt und für 2 min mittels Ultraschallhomogenisator zu einer Miniemulsion verarbeitet. Auch hierbei wurde unter ständiger Eiskühlung gearbeitet. In diesem Fall wurde die Polymerisation durch Zugabe von 8,75 ml 0,1 M Ammoniak-Lösung zur Miniemulsion ausgelöst.

Die fertige Suspension wurde bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

3.6.4 Doxorubicin-HCl (5 %) beladene PBCA-Nanopartikel

Für die etwas geringer beladenen Doxorubicin-HCl beladenen NP wurden abermals zwei Lösungen benötigt. Lösung 1 beinhaltete 125 mg Lutrol F 68, sowie 50 mg SDS, welche beide zunächst in 10 ml 0,1 M Phosphorsäure gelöst wurden. Nach 15 min Rühren wurden 125 mg Doxorubicin-HCl zugesetzt. Die Lagerung der Lösung erfolgte auf Eis.

Als Lösung 2 wurden 150 mg Sojaöl und 2,5 BCA gemischt und auf Eis gestellt.

Lösung 2 wurde zu Lösung 1 gegeben und für 2 min mittels Ultraschallhomogenisator zu einer Miniemulsion verarbeitet. Bei diesem Vorgang wurde unter ständiger Eiskühlung gearbeitet. Das Auslösen der Polymerisation wurde durch Zugabe von 15 ml 0,1 M Ammoniak-Lösung zur Miniemulsion bewerkstelligt. Zum Einstellen der Suspension auf pH 6,5 wurden noch weitere 4 ml 0,5 M Ammoniak-Lösung zugegeben.

Die Lagerung der fertige Suspension erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

3.6.5 Oberflächenmodifikation der Nanopartikel mit Polysorbat 80

Zu den entsprechend beladenen PBCA-NP-Formulierungen wurde für die Modifikation der Oberfläche mit P-80 (*P-80-Coating*) 1 mg P-80 per mg NP-Feststoff zugegeben und diese Mischung eine halbe Stunde unter leichtem Schütteln in Dunkelheit belassen und anschließend verwendet.

3.7 Charakterisierung beladener PBCA-Nanopartikel

3.7.1 Partikelgröße, Polydispersitätsindex und Zetapotential

Die Größenverteilung, der Polydispersitätsindex (PDI), sowie das Zetapotential der beladenen PBCA-NP wurden mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) mit einem Zetasizer bestimmt. Die Analytik der beladenen NP wurde von der Firma NanoDel Technologies GmbH in Magdeburg durchgeführt.

3.7.2 Bestimmung des Beladungsgrades mit Fluoreszenzmarker/ Doxorubicin HCl

Der nicht in die NP eingeschlossene Fluoreszenzmarker bzw. das nicht inkorporierte Doxorubicin HCl wurden folgendermaßen bestimmt: Es wurden 5 ml der frisch hergestellten NP-Suspension mit 5 ml demineralisiertem Wasser gemischt und in ein Amicon™ Ultra 15 Zentrifugenröhrchen überführt. Die Membran hatte einen Ausschlussgröße von 100.000 Dalton. Die Trennung erfolgte mit einer Zentrifugation der Röhrchen, 15 min lang bei 100.000 x g. Die im Filter verbliebenen NP wurden noch einmal in 10 ml Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das Filtrat aus beiden Zentrifugationen wurde vereinigt und FITC-Dextran, Rhodamin 123, sowie Doxorubicin HCl wurden mit UV/VIS-Spektroskopie quantifiziert und auf diesem Wege die Inkorporationsrate ermittelt.

3.8 Experimente

Alle Experimente wurden mit männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, die zwischen 230 g und 250 g wogen. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten (12 h Tag, 12 h Nacht) und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser (V1534-000

R/M-H, Ssniff, Soest, D). Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den aktuellen Tierschutzstandards durchgeführt.

Alle NP-Formulierungen wurden zum Zwecke der Resuspendierung vor Verwendung mindestens 5 min im Ultraschallbad bei RT belassen.

3.8.1 Intraarterielle Applikation von FITC-Dextran markierten PBCA-Nanopartikeln

Zunächst wurden die Ratten mit einer Kombination aus Ketamin (100 mg/kg KG) und Xylazin (5 mg/kg KG) durch intraperitoneale Applikation narkotisiert und die Körpertemperatur mit einem Thermometer rektal überwacht. Die Ratten wurden während der Narkose mit einer Rotlichtlampe gewärmt, um ein Auskühlen zu verhindern. Am Hals wurde vorsichtig die *Arteria carotis* frei präpariert und eine Introcan[®], Venenverweilkanüle hineingelegt. Da das arterielle Blut sehr schnell in die Kanüle schießt, wurden die NP-Formulierungen sofort appliziert und die Kanüle mit einem Luer-Lock[®]-Verschluss geschlossen, sodass das Blut weiter zirkulieren konnte.

Die FITC-Dextran markierten PBCA-NP wurden in 0,9 % Kochsalzlösung verdünnt zu einer Endkonzentration von 12,6 mg/ml Feststoffgehalt. Es wurden 0,5 ml in die *Arteria carotis* gespritzt, was eine Dosis von ca. 25,2 mg/kg KG an Feststoffgehalt bedeutete und eine Volumendosis von ca. 2,5 ml/kg KG. Es wurden zum einen NP mit oder ohne P-80-Umhüllung appliziert. Es wurden immer 3 Ratten eingesetzt. Ratte 1 erhielt reine 0,9 % Kochsalzlösung, Ratte 2 FITC-Dextran markierte PBCA-NP ohne Oberflächenbehandlung mit P-80, Ratte 3 hingegen FITC-Dextran markierte PBCA-NP mit 1 mg P-80 per mg NP-Feststoff.

3.8.2 Intravenöse Applikation von PBCA-Nanopartikeln

Zur intravenösen Applikation wurden die Ratten in einer Zwangröhre fixiert (Maßanfertigung der Feinmechanik der Universität Heidelberg). Anschließend wurde der Schwanz in 45 °C heißem Wasser gebadet, um die Durchblutung der Schwanzvenen zu fördern. Für diese Applikation wurden wiederum Introcan[®] Verweilkanülen verwendet. Bei jeder Zubereitung betrug das applizierte Volumen 1 ml. Zum festgesetzten Zeitpunkt wurden die Tiere mit Isofluran betäubt, durch zervikale Dislokation getötet und das Gehirn präpariert.

3.8.2.1 FITC-Dextran markierte PBCA-Nanopartikel

Die FITC-Dextran PBCA-NP wurden vor Applikation mit 0,9 % Kochsalzlösung verdünnt zu einer Feststoffkonzentration von 12,6 mg/ml. Davon wurde 1 ml appliziert, was einer Dosis von ca. 50,4 mg/kg KG Feststoffgehalt sowie einem Volumen von ca. 5 ml/kg KG entspricht. Pro Versuch wurden 3 Ratten verwendet. Ratte 1 erhielt nur 0,9 % Kochsalzlösung, Ratte 2 erhielt die NP-Formulierung ohne P-80, Ratte 3 erhielt die mit P-80 oberflächenmodifizierte NP-Formulierung. Zum geplanten Zeitpunkt wurden die Tiere mit Isofluran betäubt, durch zervikale Dislokation getötet und das Gehirn entnommen.

3.8.2.2 Rhodamin 123 markierte PBCA-Nanopartikel

Auch für diese Experimente wurden jeweils 3 Ratten verwendet: Ratte 1 erhielt 1,2 mg/kg KG Rhodamin 123 mit Zusatz von 80 mg/kg KG P-80 in physiologischer Kochsalzlösung, Ratte 2 erhielt 80 mg/kg KG Rhodamin 123 markierte PBCA-NP und Ratte 3 bekam 80 mg/kg KG Rhodamin 123 markierte PBCA-NP mit 1 mg P-80 per mg Nanopartikelfeststoff *Coating*. Das Injektionsvolumen für jede Ratte betrug 1 ml, was einer Volumendosis von 4 ml/kg kg entspricht.

Zum festgesetzten Zeitpunkt erfolgte die Betäubung der Tiere mit Isofluran. Sodann wurden sie zervikale Dislokation getötet und das Gehirn entnommen.

3.8.2.3 Doxorubicin-HCl beladene PBCA-Nanopartikel

Die Applikation der Doxorubicin HCl beladenen PBCA-NP erfolgte in den gleichen Mengen wie unter 3.8.2.2 beschrieben. Ratte 1 erhielt hierbei allerdings entsprechend dem höheren Beladungsgrad mit Doxorubicin HCl eine Dosis von 5,9 mg/kg KG freies Doxorubicin. Alles andere entspricht den unter 3.8.2.2 gemachten Angaben.

3.8.2.3.1 Qualitative Untersuchung des Herzgewebes

Die Applikation der Doxorubicin HCl beladenen PBCA-NP erfolgte in den gleichen Mengen wie unter 3.8.2.2 beschrieben. Ratte 1 erhielt hierbei wiederum entsprechend dem höheren Beladungsgrad mit Doxorubicin HCl eine Dosis von 5,9 mg/kg KG freies Doxorubicin. Zum geplanten Zeitpunkt wurden die Tiere mit Isofluran betäubt, durch zervikale Dislokation getötet und das Herz entnommen.

3.8.2.4 Co-Administration von FITC-BSA und Rhodamin123 oder Doxorubicin-HCl beladenen PBCA-Nanopartikeln

Für die Co-Administration der beiden verschiedenen NP-Zubereitungen und FITC-BSA wurden die Dosierungen wie unter 3.8.2.2 und 3.8.2.3 gewählt. Für jeden Zeitpunkt wurden wiederum 3 Ratten verwendet.

15 min vor dem festgesetzten Zeitpunkt der Tötung bekamen die Ratten noch zusätzlich 1 ml einer 2 %igen FITC-BSA-Lösung in 0,9 % Kochsalzlösung gespritzt.

3.8.2.5 Gewebebehandlung

Das frisch isolierte Gehirn wurde in eiskalter 0,9 % Kochsalzlösung gewaschen und die beiden Gehirnhemisphären wurden mit einem Skalpell voneinander getrennt. Das Herzgewebe wurde ebenfalls gewaschen, um das Blut zu entfernen und in 3 Stücke geteilt.

Anschließend wurde das Gewebe in Isopentan über Trockeneis schockgefroren. Isopentan bleibt auch bei den -80 °C des Trockeneises noch flüssig und so kann eine optimale Benetzung des Gewebes erreicht werden. Außerdem ist auf diesem Wege vermeidbar, dass das Gewebe durch zu extreme Kälte wie beispielsweise beim direkten Kontakt mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) Kälterisse bekommt.

Die Lagerung des Gewebes erfolgte bis zum Schneiden am Kryotom bei -80 °C unter Lichtausschluss.

Zum Schneiden wurde das gefrorene Gehirngewebe mit Kryo-Einbettmedium auf einem Objektblock aufgefroren und nachfolgend bei -13 °C am Kryotom in einer Schnittdicke von 25 µm geschnitten und unmittelbar auf einen Superfrost® plus Objektträger aufgebracht. Diese speziellen Objektträger besitzen eine positive Oberflächenladung. Auf diese Weise wird der Gefrierschnitt sowohl von der Ladung als auch von der Wärme des Objektträgers angezogen und haftet sehr gut auf dem Untergrund. Mit dem Herzgewebe wurde identisch verfahren, allerdings betrug die Schneidetemperatur in diesem Fall -20 °C.

Fixiert wurde das Gewebe durch 15 min Lufttrocknung (dunkel). Der fixierte Gefrierschnitt wurde anschließend in Mowiol® Eindeckmedium eingebettet, mit einem Deckglas versehen und direkt am konfokalen Mikroskop untersucht.

3.8.2.5.1 Nissl-Färbung

Diese Nissl-Färbung stellt eine lichtmikroskopische Routinefärbung dar, bei der die Zellkerne im Gewebe blau angefärbt werden. Da sich die Zellen im Gehirngewebe morphologisch unterscheiden, können auf diesem Wege verschiedene Gehirnareale differenziert werden.

Für die Nissl-Färbung wurden die Objektträger mit den frischen Gefrierschnitten 30 min im Trockenschrank bei 37 °C getrocknet und anschließend 20 min mit einer Methylenblaulösung nach Löffler gefärbt. Das Präparat sollte hierbei ganz benetzt werden.

Im Folgenden wurde der gefärbte Schnitt für 1-2 min in 99 %igem Isopropanol getaucht und dadurch gewaschen und zusätzlich weiter entwässert. Die gefärbten Schnitte wurden dann mit dem lipophilen Eindeckmedium Entellan[®] eingedeckt und ohne Zeitverzug am konfokalen Lasermikroskop betrachtet.

3.8.2.6 Studien am konfokalen Lasermikroskop

Zur Betrachtung der Präparate wurde das Leica Mikroskop DM IRBE (Leica Mikrosysteme, Bensheim) verwendet. Die Ausstattung dieses Invertmikroskops umfasste:

- Phasenkontrasteinrichtung
- Objektive 20 ´ / 0,4 ; 40 ´ / 1,25 Öl ; 63 ´ / 1,32 Öl ; 63 ´ / 1,0 W
- luftgekühlter Argon/Krypton-Laser

Die Steuerung des Mikroskops erfolgte mit der Software TCS-SP (Leica Mikrosysteme, Bensheim)

Einstellung der Wellenlängen:

FITC-Dextran/FITC-BSA:	Ex 488 nm, Em 515-550 nm
Rhodamin 123:	Ex 488 nm, Em 515-530 nm
Doxorubicin HCl:	Ex. 488 nm, Em 560-600 nm

Die Justierung des Mikroskops erfolgte für jede PBCA-NP Zubereitung mit einer unbehandelten Probe und daraufhin wurde ein Profil in solcher Weise abgespeichert, dass keinerlei Fluoreszenz zu erkennen war. Bei Betrachtung nachfolgender Proben gleicher Art konnten diese Einstellungen wieder verwendet werden.

3.9 *In vitro Experimente*

3.9.1 **Generelle Einstellungen des Fluoroskan Ascent[®]**

Plate Template:	96-Wells Costar 3596
Filter Set:	s. jeweilige Versuchsbeschreibung
Measurement Time:	Single
Integration Time:	20 ms
Ambient Temperature:	37,0 °C

3.9.2 **Freisetzungsuntersuchungen**

3.9.2.1 ***Aufreinigung der Nanopartikel***

Das Aufreinigen der Doxorubicin-HCl beladenen PBCA-NP erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie. Hierzu wurden zunächst im Rahmen der Etablierung einer Aufreinigungsmethode verschiedene Trenngele sowie verschiedene Eluenten getestet.

Die verwendeten Trennmaterialien waren Sephadex[®] G50 fine, mit dem die Säulen selbst gepackt wurden, sowie die Fertigsäulen PD Midi Trap G 10 und PD 10 Desalting der Firma GE Healthcare (s. Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 Verwendete Säulen und Trenngele

	Sephadex[®] G 50 fine	PD Midi Trap G 10	PD 10 Desalting
Säulenmaße (cm)	Ø 1,5 , Länge 12	Ø 1,3 , Länge 4	Ø 1,45 , Länge 5
Trenngel	Sephadex [®] G 50 fine	Sephadex [®] G 10	Sephadex [®] G 25 medium
Gelvolumen (ml)	21,2	5,3	8,3
Ausschlussgrenze	M _r 500-10.000	M _r 700	M _r 5000

Das Sephadex[®] G 50 fine wurde immer im verwendeten Eluenten mindestens über Nacht quellen lassen und danach in eine Säule überführt. Die Konditionierung der Fertigsäulen vor Verwendung erfolgte mit dem dreifachen Gelbettvolumen an Eluent. Die Säule wurde trocken laufen gelassen, dann die Probe aufgegeben und im Anschluss eluiert. Beim Sephadex[®] G 50, sowie bei den PD Midi Trap G 10 Säulen wurde der Eluent vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette zugetropft, um das Gelbett oben

3. Material und Methoden

nicht aufzuwirbeln. Bei den PD 10 Desalting Säulen war dies nicht notwendig, da diese oben eine Fritte enthielten, die das Gelbett vor Verwirbelungen schützte.

Es wurden 2 ml Fraktionen in 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen und je nach Bedarf weiterverwendet. Auf die Säulen wurde immer ein Volumen von 100 µl aufgegeben, außer bei einer Gesamtmenge von 400 µg Doxorubicin, dort waren es 150 µl.

Tabelle 3.6 zeigt die verschiedenen durchgeführten Versuche

Tabelle 3.6 Verschiedene Versuche zur Aufreinigung

Eluent	Sephadex[®] G 50 fine	PD Midi Trap G 10	PD 10 Desalting
Aqua bidestillata	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin HCl als PBCA-NP Suspension • 200 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und als PBCA-NP Suspension • 400 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und als PBCA-NP Suspension 	<ul style="list-style-type: none"> • 400 µg reines Doxorubicin HCl 	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension
0,9 % NaCl-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl als PBCA-NP Suspension • 200 µg Doxorubicin HCl als PBCA-NP Suspension • 200 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und PBCA-NP Suspension • 400 µg Doxorubicin HCl als reines Dos und PBCA-NP Suspension 	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 50 µg reines Doxorubicin HCl • 20 µg reines Doxorubicin HCl 	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension • 100 µg reines Doxorubicin HCl • 100 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension
3 % NaCl-Lösung		---	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension

3. Material und Methoden

Eluent	Sephadex® G 50 fine	PD Midi Trap G 10	PD 10 Desalting
<p style="text-align: center;">1 % Polysorbat 80 in Aqua bidestillata</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension • 200 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und als PBCA-NP Suspension • 400 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und als PBCA-NP Suspension 		<p style="text-align: center;">----</p>
<p style="text-align: center;">1 % Polysorbat 80 in 0,9 % NaCl- Lösung</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension • 200 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und als PBCA-NP Suspension • 400 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und als PBCA-NP Suspension 	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin HCl als PBCA-NP Suspension • 200 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und als PBCA-NP Suspension • 100 µg Doxorubicin HCl als PBCA-NP Suspension • 20 µg reines Doxorubicin HCl 	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension
<p style="text-align: center;">PBS</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension • 200 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und als PBCA-NP Suspension • 400 µg Doxorubicin HCl als reines Dox und als PBCA-NP Suspension • 	<p style="text-align: center;">---</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg reines Doxorubicin HCl • 200 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension

3. Material und Methoden

Eluent	Sephadex [®] G 50 fine	PD Midi Trap G 10	PD 10 Desalting
44 ml Aqua bidestillata, dann 44 ml 0,9 % NaCl-Lösung	<ul style="list-style-type: none">• 400 µg Doxorubicin HCl als PBCA-NP Suspension• Fraktionen 2 und 3 wurden ebenso 2 Mal rechromatografiert	<ul style="list-style-type: none">• 200 µg reines Doxorubicin HCl	<ul style="list-style-type: none">• 200 µg reines Doxorubicin HCl• 200 µg Doxorubicin als PBCA-NP Suspension

3.9.2.2 Stabilitätsuntersuchungen reines Doxorubicin-HCl

Verwendet wurde eine Doxorubicin-Lösung in 0,9 % NaCl-Lsg. ($c_{\text{stock}} = 2 \text{ ng/ml}$). Daraus wurden verschiedene Doxorubicin HCl Konzentrationen erstellt: 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml. Die Stabilität wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten überprüft. Zum einen wurde PBS pH 7,4 verwendet und ein 152 mM Natriumacetatpuffer pH 5. Die verschiedenen Doxorubicin HCl Konzentrationen wurden in den beiden Puffern angefertigt. Davon wurde jeweils 1 ml in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und unter moderatem Schütteln (200 rpm) bei 37 °C inkubiert. Pro Konzentration und Zeitpunkt wurden jeweils vier 2 ml Reaktionsgefäße hergestellt und davon zu jedem Zeitpunkt 2 Proben gezogen. Somit ergaben sich für jede Probelösung pro Zeitpunkt 8 Werte. Zu den untersuchten Zeitpunkten wurden jeweils 100µl im Fluoreszenzplattenleser vermessen. Außerdem wurde jede Lösung zum Zeitpunkt 0 h vermessen, um den 100 %-Wert zu ermitteln.

3.9.2.3 Freisetzungsuntersuchungen mit aufgereinigten Doxorubicin-HCl beladenen PBCA-NP in Puffer pH 5 und pH 7,4

3.9.2.3.1 Endgültige Aufreinigungsmethode der Doxorubicin HCl beladenen PBCA-NP

Das Sephadex[®] G 50 fine wurde vor Verwendung mindestens über Nacht im Eluenten (Wasser) quellen lassen. Das Sephadex[®] G 50 fine wurde bis zu drei Mal verwendet und nach Verwendung im jeweiligen Elutionsmittel bei Raumtemperatur gelagert.

Die verwendete PBCA-NP Suspension enthielt 5 % inkorporiertes Doxorubicin HCl. ($c = 3,97 \text{ mg/ml}$ Gesamtdoxorubicin)

Es wurden 100 µl NP-Suspension (= 400 µg Gesamtdoxorubicin) auf eine eben trocken gelaufene Säule aufgetragen und unmittelbar mit Wasser eluiert. Die NP-Fraktion 4 wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Es wurden immer 2 Säulen parallel laufen gelassen.

Danach wurden die Säulen mit gut 50 ml 0,9 % NaCl vom anhaftenden Doxorubicin gereinigt und wieder mit Aqua bidestillata konditioniert. Hierfür wurden mindestens 50 ml Aqua bidestillata verwendet.

Anschließend wurden die 2 ml der eben erhaltenen NP-Fraktion noch einmal auf die Säule aufgegeben und eluiert. Aufgefangen wurde wieder die gesamte Fraktion 4 und etwa 1 ml der Fraktion 5. Darin waren alle eluierten NP enthalten.

Die einmal rechromatographierten NP wurden in einem 15 ml Röhrchen gesammelt und über Nacht dunkel im Kühlschrank bis zur Verwendung am nächsten Tag gelagert.

3.9.2.3.2 Versuchsdurchführung

Für die Stabilitätsuntersuchung wurde ein 152 mM Na-Acetatpuffer verwendet, der mit Eisessig auf pH 5 eingestellt wurde, sowie PBS für die Untersuchungen bei pH 7,4. Die Einstellung des PBS erfolgte mit 1 N HCl.

Im Anschluss wurden von den aufgereinigten Nanopartikeln jeweils zwei 2 ml Reaktionsgefäße mit 1 ml für jeden Zeitpunkt befüllt, dann 200 µl Na-Acetatpuffer zugegeben und gevortext. Die Reaktionsgefäße wurden bei 37 °C unter moderatem Schütteln (200 rpm) im Dunkeln inkubiert, Der Zeitpunkt 0 h wurde direkt mit den über Nacht im Kühlschrank gelagerten NP durchgeführt.

3.9.2.3.3 Probenauswertung:

Zur Probenauswertung wurden die NP zum jeweiligen Zeitpunkt zuerst bei 15000 x g für 5 min abzentrifugiert und danach wurde 1 ml des Überstands über eine mit 0,9 % NaCl konditionierte PD 10 Desalting Fertigsäule gegeben. Es wurden 22 Fraktionen gesammelt. Für jeden Zeitpunkt wurden 2 Säulen verwendet und von jeder Fraktion 2 Messungen im Fluoreszenzplattenleser durchgeführt. Dadurch ergaben sich für jeden Zeitpunkt 4 Messwerte.

3.9.2.4 Freisetzungsexperimente mit aufgereinigten Doxorubicin beladenen PBCA-NP in Gehirnhomogenat pH 5 und pH 7,4

Für diese Experimente wurden aufgereinigte NP verwendet wie unter 3.9.2.3.1 beschrieben.

3.9.2.4.1 Herstellung des Gehirnhomogenats

Eine männliche Ratte (Stamm: Wistar) wurde kurz in Isofluran narkotisiert, gestreckt und sodann wurde unmittelbar das Gehirn sorgfältig präpariert und gewogen. Anschließend erfolgte unmittelbar die Homogenisation in eiskaltem PBS, pH 7,4 oder in 152 mM Natriumacetatpuffer pH 5 mit Hilfe eines *Potters*. Das entstandene Homogenat wurde auf 10 % (m/m) Homogenat eingestellt.

Die Homogenisation selbst erfolgte bei mittlerer Drehzahl durch 20 maliges Auf- und Abfahren des Kolbens unter Kühlung in Eiswasser. (Homogenisator Typ 50201 Heidolph-Instruments, Schwabach)

Danach wurde das Homogenat in einer Kühlzentrifuge 10 min. bei 700 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde sofort in 2 ml Reaktionsgefäße à 400 µl aliquotiert, über Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Für die Freisetzungsuntersuchung mit aufgereinigten Doxorubicin HCl beladenen PBCA-NP wurde das hier beschriebene bei -80 °C eingefrorene Gehirnhomogenat verwendet. Dieses wurde vor Verwendung bei 37 °C kurz aufgetaut und unmittelbar verbraucht.

3.9.2.4.2 Versuchsdurchführung

1 ml aufgereinigte PBCA-NP wurden in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben und mit 200 µl des Homogenat -Überstandes gut gemischt.

Die Ansätze wurden über den gewünschten Zeitraum bei 37 °C in einem Inkubator mit Schüttelfunktion bei 200 rpm inkubiert.

3.9.2.4.3 Probenauswertung

Zum Zeitpunkt der Analyse wurde die jeweils gewünschte Probe 5 min bei 15.000 x g abzentrifugiert und der Überstand auf eine PD 10 Desalting Säule aufgetragen (Probenvolumen ca. 1,1 ml). Zunächst erfolgte die Elution mit 44 ml Aqua bidestillata

und anschließend mit 44 ml 0,9 % NaCl-Lösung. Dadurch sollten die NP vom freigesetzten Doxorubicin abgetrennt werden. Die Menge an freiem Doxorubicin wurde sowohl mit dem Fluoreszenzplattenleser als auch per HPLC bestimmt. Die HPLC-Messungen wurden extern durchgeführt und ebenfalls mit einem Fluoreszenzdetektor gemessen. Zum Chromatographieren wurden immer zwei Säulen parallel verwendet und für jede vermessene Fraktion ergaben sich 2 Messwerte, sodass sich vier Messwerte pro Zeitpunkt ergaben, die gemittelt wurden. Bei den Versuchen, die mittels HPLC analysiert wurden, wurde vor Zentrifugation der Probe 100 µl -20 °C kaltes Methanol zur Proteinausfällung zugesetzt. Diese Modifikation erfolgte ab diesem Zeitpunkt aufgrund gewonnener Erfahrung.

3.9.3 Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn

3.9.3.1 Zellkulturbedingungen

Zur Herstellung von Kulturmedien wurden sterile Fertigmedien und sterile Zusätze verwendet. Sämtliche Pufferlösungen und sonstigen Lösungen für die Zellkultur wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und entweder durch Filtration sterilisiert oder falls möglich autoklaviert. Glasgeräte, nicht sterile Verbrauchsmaterialien und sonstige für die Zellkultur benötigten nicht sterilen Materialien wurden im Autoklaven (30 min, 121 °C, 2 bar) sterilisiert. Alle Arbeitsschritte, für die aseptisches Arbeiten erforderlich war, wurden an einer Laminar-Flow-Werkbank nach Desinfektion der Arbeitsplatte mit 70 %igem Ethanol durchgeführt. Die Innenräume der Brutschränke wurden alle 2 Monate mit der automatischen Desinfektions-Routine bei 180 °C für 3 h heißluftsterilisiert.

3.9.3.2 Isolierung von Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn

Am Tag vor der Isolierung der Zellen wurden zwanzig 175 cm² Zellkulturflaschen zunächst mit 2,5 ml Collagen G-Lösung (c = 133 µg/ml in Aqua bidestillata) beschichtet und im Brutschrank bis zur Verwendung gelagert.

Alle verwendeten Geräte und Lösungen, die in unmittelbarem Kontakt zu Gewebe standen, waren steril. Alle Arbeitsschritte an offenem Gewebe wurden an einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt.

Es wurden am Morgen des Isolationstages frische Schweinehirnhälften im Fleischverarbeitungszentrum in Mannheim geholt. Hierzu wurden die Gehirne direkt

3. Material und Methoden

aus den eben in der Hälfte zersägten Schweinen entnommen und sofort in 500 ml eiskalten 70 %igem Ethanol überführt. Wichtig bei der Auswahl der Hirnhälften war, dass die Meningen intakt und dass bei den Hälften noch ein Stück der zweiten Hemisphäre vorhanden war. Denn das später benötigte Gewebe sollte nicht direkt vom Ethanol berührt werden, da dieser beginnt, das Gewebe zu fixieren. Nachdem ca. 30 Gehirnhälften gesammelt waren, wurden diese mit 500 ml eiskaltem PBS mit 2 %igem Penicillin- und Streptomycin-Zusatz gewaschen und in weiteren 500 ml des antibiotikahaltigen PBS auf Eis ins Labor transportiert.

Im Labor wurden die Hirnhälften in zwei 1000 ml Bechergläser aufgeteilt und der antibiotikahaltige PBS des Transports durch jeweils 500 ml neuen ersetzt.

Ein Team von zwei Personen arbeitete jeweils an einer Sterilwerkbank zusammen. Für die Zellisolation wurden insgesamt 17 Hirnhälften eingesetzt.

Jede Person verwendete ein steriles Edelstahltablett zum Bearbeiten des Gewebes. Die erste Person entfernte die Meningen zunächst manuell und schnitt anschließend mit einem Skalpell den Anteil der zweiten Hemisphäre, sowie Choroid Plexus, Stammhirn, ggf. Cerebellum und das innere Nervengewebe weg. Zurück blieb dann ausschließlich der Cortex. Nach jeder bearbeiteten Gehirnhälfte wurden die Handschuhe erneuert.

Person 2 kontrollierte den Cortex auf Reste der Meningen, die dann mit Pinzetten entfernt wurden. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Kräuterschneiders aus Edelstahl zerkleinert bis eine homogene Masse entstand. Diese Masse wurde in einem Gefäß mit 200 ml Präparationsmedium gesammelt und ab und zu vorsichtig umgeschüttelt. Die 17 homogenisierten Gehirnhälften wurden in einer 1000 ml Flasche mit Rührfisch gesammelt und mit Präparationsmedium auf ein Volumen von 750 ml gebracht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 52 ml des Enzyms Dispase. Die Flasche wurde unter Rühren (~500 rpm) 2 h bei 37 °C in einem Trockenschrank inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde in die zwanzig mit Collagen G beschichteten 175 cm² Zellkulturflaschen jeweils 22 ml Kulturmedium vorgelegt, sowie 12 µl Puromycin. Nach dem Enzymverdau erfolgte eine Aufteilung des Homogenats auf acht 250 ml Zentrifugenbecher. Hierzu wurden jeweils 100 ml Homogenat mit 150 ml Dextranlösung im Zentrifugenbecher gemischt und anschließend zentrifugiert (6800 x g, 4 °C, 10 min). Die Gewichts Differenz zwischen den Zentrifugenbechern sollte nicht mehr als 0,5 g betragen. Nach der Zentrifugation

3. Material und Methoden

waren 3 Schichten im Becher zu erkennen: Oben befand sich Gehirngewebe, in der Mitte der Dextran und unten das rote Pellet aus Gehirnkapillaren.

Nach Abschütten des Überstands wurden die Zentrifugenbecher mit einem Zellschaber so gut wie möglich von anhaftendem Gehirngewebe gereinigt. Die Kapillarpellets wurden mit insgesamt 72 ml Präparationsmedium resuspendiert. Anschließend musste die Kapillarsuspension über eine Nylon-Gaze (Maschenweite 180 μm) in ein Becherglas filtriert werden. 10 ml Filtrat wurden mit einer Pipette aufgezogen und die Pipette wurde dann auf den Boden einer Petrischale aus Glas gedrückt. In dieser Position wurde das Filtrat unter Druck abgelassen. Durch die Scherkräfte wurden auf diese Weise größere Klümpchen zerstreut. Dieser Vorgang wurde mit jeder Pipettenfüllung 5 Mal wiederholt.

Die triturierten 72 ml Filtrat wurden in eine 100 ml Flasche mit Rührfisch überführt und 8 ml des Enzyms Collagenase/Dispase zugegeben ($c = 10 \text{ mg/ml}$). Der Verdau erfolgte bei 37 °C in einem Trockenschrank. Nach 30 min wurde mikroskopisch kontrolliert, wie weit der Anverdau der Kapillaren fortgeschritten war. Der Verdau sollte so weit vorangeschritten sein, dass die Kapillarendothelzellen gerade begannen, sich aus der Kapillarwand herauszulösen. Sie sollten aber noch nicht ausgeeinzelt sein.

Während dieser 30 minütigen Inkubation wurden 5 Percoll-Gradienten vorbereitet. Zuerst wurden 20 ml des Percoll mit einer Dichte von $1,03 \text{ g/cm}^3$ in ein 50 ml Röhrchen vorgelegt und danach 15 ml des Percoll mit einer Dichte von $1,07 \text{ g/cm}^3$ darunter geschichtet, sodass ein diskontinuierlicher Gradient entstand.

Das Homogenat aus dem Collagenase/Dispase- Verdau wurde auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, mit serumhaltigem Kulturmedium (= Präparationsmedium mit 10 % NCS-Zusatz) jeweils auf 50 ml aufgefüllt und abzentrifugiert ($110 \times g$, 4 °C, 10 min). Die beiden Überstände wurden abgesaugt und die Pellets in einem weiteren 50 ml Röhrchen vereinigt, mit Kulturmedium resuspendiert und wiederum auf ein Volumen von 50 ml gebracht.

Mit diesen 50 ml erfolgte die Beladung der Percoll-Gradienten. Dazu wurden ganz oben jeweils vorsichtig 10 ml der erhaltenen 50 ml aufgeschichtet.

Nach Beladung wurden die Gradienten zentrifugiert ($1300 \times g$, 4 °C, 10 min). Wichtig ist hierbei, dass die Bremse in der Zentrifuge ausgeschaltet ist, da sonst beim Anhalten der Zentrifuge der Gradient zerstört wird.

3. Material und Methoden

Nach der Zentrifugation erhält man folgende Schichten: Ganz oben erhält man das überstehende Kulturmedium, dann eine dünne Schicht Gewebe-Trümmer und Myelin, dann die klare Schicht des Percoll mit der Dichte $1,03 \text{ g/cm}^3$, dann in der Interphase die gewünschten Kapillarendothelzellen, danach die klare Schicht des Percoll mit $1,07 \text{ g/cm}^3$ Dichte und ganz unten Erythrozyten.

Die Zellen wurden dann aus der Interphase mit einer 5 ml Pipette abgesaugt und in einem 50 ml Tube gesammelt. Man sollte darauf achten, dass keine Bestandteile aus anderen Schichten abgesaugt werden und deshalb sehr vorsichtig sein, um Verunreinigungen zu vermeiden. Nachdem alle Gradienten abgesaugt wurden, wurde das 50 ml Zentrifugenröhrchen mit den gesammelten Zellen mit Kulturmedium auf 50 ml aufgefüllt und nochmals zentrifugiert ($110 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen waren nun bereit zu Aussaat. Das Pellet wurde in insgesamt 50 ml Kulturmedium resuspendiert. Es wurden jeweils 2,2 ml der Zellsuspension in eine der vorbereiteten 175 cm^2 Zellkulturflaschen gegeben, vorsichtig umgeschwenkt und wieder zurück in den Brutschrank überführt. Die eigentliche Isolation war hiermit abgeschlossen.

Das Auszählen der Zellen erfolgte erst nach dem Einfrieren, wenn Zellen zur Aussaat aufgetaut wurden. Die Zellausbeute aus 8,5 Gehirnen wurde pauschal auf 20 große 175 cm^2 Zellkulturflaschen verteilt.

3.9.3.2.1 Waschen der frisch isolierten Kapillarendothelzellen

Am Tag nach der Zellisolation müssen die Zellen gewaschen werden. Hierzu wurde PBS⁺⁺ verwendet, der Ca^{2+} und Mg^{2+} enthält.

Der PBS wurde auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad zum Waschen vortemperiert. Aus den großen 175 cm^2 Zellkulturflaschen wurde das Kulturmedium mit einer langen Pasteurpipette abgesaugt und anschließend erfolgte einer Zugabe von 22 ml des vorgewärmten PBS⁺⁺. Der PBS⁺⁺ wurde wieder abgesaugt, die Flaschen nochmals mit 22 ml davon versehen und nach dem zweiten Absaugen wurden die Flaschen mit Kulturmedium gefüllt. Zusätzlich wurden in jede Flasche noch $12 \mu\text{l}$ Puromycin zupipettiert. Die verschiedenen Lösungen wurden immer in stehende Flaschen pipettiert und das Waschen dieser erfolgte in horizontaler Position durch vorsichtiges Umschwenken.

3.9.3.2 Kryokonservation von Kapillarendothelzellen

Am zweiten Tag nach der Isolation der Zellen wurden diese eingefroren. Dafür wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS⁻ gewaschen (s. 2.7.2.3), der dieses Mal kein Ca²⁺ und Mg²⁺ enthielt.

Nach dem Waschen wurden 3 ml Trypsin und 7 ml PBS⁻ in die Flaschen gegeben. Die Flaschen wurden bei Raumtemperatur belassen und mit den Handflächen von unten und seitlich an Tischen geklopft, um das Ablösen der Zellen zu fördern. Nach 3-4 min wurde die Trypsinreaktion mit 20 ml eisgekühltem Kulturmedium gestoppt. Es wurden jeweils 4 große Flaschen gleichzeitig behandelt und das Kulturmedium mit den abgelösten Zellen in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Nachdem die Zentrifugenröhrchen auf 50 ml aufgefüllt waren, wurden die Zellen abzentrifugiert (110 x g, 4 °C, 10 min). Der Überstand in den Zentrifugenröhrchen wurde abgesaugt und beide Pellets mit in einem 50 ml Röhrchen vereinigt. Die Zellpellets wurden in 16 ml NCS mit 10 % DMSO aufgenommen und anschließend unter ständigem Resuspendieren in acht 2 ml Gefrieröhrchen aufgeteilt.

Das Einfrieren erfolgte bei – 80 °C auf 70 %igem Isopropanol. Nach einem Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt oder falls eine baldige Verwendung (innerhalb von ca. 2 Monaten) vorgesehen war im – 80 °C Tiefkühlschrank belassen.

3.9.3.3 Kultivierung von Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn

3.9.3.3.1 Beschichtung von Kulturflächen

Für die Beschichtung der Kulturflächen wurden diese mit einer Lösung aus Collagen G in bidestilliertem Wasser behandelt (c = 133 µg/ml). Für die aufgegebenen Mengen s. Tabelle 3.7. Die Gefäße wurden für mindestens 4 h mit Collagen G-Lösung bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert, meist aber auch über Nacht oder sogar mehrere Tage.

Tabelle 3.7 Collagen G-Volumina auf verschiedenen Kulturflächen

96-well Platten	75 cm² Zellkulturflaschen	175 cm² Zellkulturflaschen
100 µl pro Well	1 ml	2,5 ml

3.9.3.3.2 Aussaat von Kapillarendothelzellen

Zum Aussäen wurden die Zellen zunächst aufgetaut. Zuerst wurden sie aus dem - 80 °C Gefrierschrank oder dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 15 min im - 20 °C Tiefkühlschrank angewärmt. Danach wurden die Gefrier Röhrchen für 1 min im 37 °C Wasserbad aufgetaut, in 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 37 °C warmem Kulturmedium auf 50 ml aufgefüllt. Es wurden 3-4 Gefrier Röhrchen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (110 x g, 4 °C, 10 min), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet aus 4 Gefrier Röhrchen wurden in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zählung erfolgte mit einer Neubauer Improved Zählkammer unter dem Mikroskop. Es wurden hierfür je 100 µl Zellsuspension und 200 µl 0,4 % Trypanblau vermischt. Zellen, welche eine dunkelblaue Färbung angenommen hatten wurden nicht mitgezählt, da diese tot waren. Es wurden zehn große Quadrate (jeweils bestehend aus 16 kleinen Quadraten) gezählt. Der Mittelwert der Zellzahl aus zehn Quadraten wurde durch 16 dividiert, um die durchschnittliche Anzahl der Zellen im kleinsten Quadrat zu erhalten. Es ergab sich dann für die Errechnung der Zellzahl (N) in 5 ml Suspension folgende Formel:

$$N = V_{\text{Zellsuspension}} / V_{\text{kleines Quadrat}} * N_{\text{kleines Quadrat}} * 3 \text{ (Verdünnungsfaktor mit Trypanblau)}$$

Berechnet mit den Abgaben der Neubauer Improved Zählkammer:

$$N = 5 \text{ ml} / 2,5 \times 10^{-7} \text{ ml} * N_{\text{kleines Quadrat}} * 3$$

Die Zellen wurden in allen Gefäßen mit einer Dichte von 250.000 Zellen pro cm² ausgesät.

3.9.3.3.3 Kultivierung von Kapillarendothelzellen

Zunächst wurden die Zellen nach dem Aussäen noch am nächsten Tag in Kulturmedium belassen und am übernächsten Tag auf serumfreies Medium umgestellt. Nach einem weiteren Tag Wachsen wurden die Zellen dann am Tag 4 nach dem Aussäen für den jeweiligen Versuch verwendet. (s. Tabelle 3.8) Außer des Medienwechsels wurden die Zellen nicht zusätzlich gefüttert.

Tabelle 3.8 Schema der Medien bei Kultivierung der Kapillarendothelzellen

Tag 0 (Aussäen))	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
<i>Kulturmedium</i>	<i>Kulturmedium</i>	<i>Serumfreies Medium</i>	<i>Serumfreies Medium</i>	<i>Serumfreies Medium</i>

3.9.3.4 Aufnahmeexperimente mit der BHS in vitro

3.9.3.4.1 Aufnahmeexperimente in 96-Well Platten mit und ohne Polysorbat 80

Für die Untersuchung der Aufnahme von PBCA-NP in Kapillarendothelzellen unter dem Einfluss von P-80 wurden PBCEC in 96-Well Platten kultiviert. Für jede unterschiedliche Testreihe und Inkubationszeit wurde die gesamte Reihe einer 96-Well Platte eingesetzt.

Die verwendeten PBCA-NP waren mit Rhodamin 123 (1,5 %) markiert und wurden in einer Konzentration von 30 µg/ml Feststoffgehalt eingesetzt. Es wurden sowohl mit P-80 gecoatete Nanopartikel, (0,1 mg P-80 per mg NP-Feststoff) als auch Nanopartikel ohne Oberflächenmodifikation in diesem Versuch getestet. Die konfluenten Zellen wurden zweimal mit je 200 µl KRB pro Well gewaschen. Danach wurden jeweils 200 µl Nanopartikelzubereitung mit oder ohne Oberflächenmodifikation mit P-80 auf die Zellen gegeben. Blind-Werte (Zellen in reinem KRB, ohne NP) wurden ebenfalls vermessen.

Nach 30 min, 60 min, 120 min bzw. 180 min wurden die jeweiligen Wells zweimal mit KRB gewaschen und schließlich mit 1 %igem Triton X-100 versetzt (200 µl pro Well). Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die 96-Well-Platte 30 min lang bei 50 °C in den Trockenschrank gestellt. Nach Abkühlen der Platte auf RT erfolgte die Vermessung Zellysats im Fluoroskan Fluoreszenzplattenleser

3.9.3.4.2 Qualitative Untersuchungen in Chamberslides

Für die konfokal-mikroskopische Untersuchung der Interaktion zwischen PBCA-NP und kultivierten Kapillarendothelzellen wurden PBCEC auf 8-Well *Chamberslides* kultiviert. Der Einfluss von zwei NP-Konzentrationen (0,1 mg/ml und 1 mg/ml), sowie einer Oberflächenmodifikation durch P-80 (0,1 mg P-80 per mg NP-Feststoff) wurde

untersucht. Die PBCA-NP (Rhodamin-123 markiert) mit und ohne *Coating* wurden auf die Zellen gegeben (400 µl pro Well) und für zwei Stunden inkubiert (37 °C, 200 rpm). Danach wurden die Zellen einmal mit KRB gewaschen und mit PFA fixiert (200 µl pro Well, unter Lichtausschluss RT, ca. 10 min). Es wurde nochmals mit KRB gewaschen. Die Kapillarendothelzellen wurden schließlich mit dem Eindeckmedium Mowiol® benetzt, mit einem Deckglas bedeckt, welches mit farblosem Nagellack fixiert wurde und anschließend wurden die Proben am konfokalen Mikroskop analysiert.

3.9.3.4.3 Aufnahmeexperimente in 96-Well-Platten mit und ohne Serum

Für die Untersuchung der Aufnahme von PBCA-NP in Kapillarendothelzellen unter dem Einfluss von Serum wurde der Versuch im Prinzip wie unter 3.9.3.4.1 beschrieben durchgeführt.

Die verwendeten PBCA-NP waren ebenfalls mit Rhodamin 123 (1,5 %) markiert und wurden wiederum in einer Konzentration von 30 µg/ml Feststoffgehalt eingesetzt. Es wurden P-80 gecoatete Nanopartikel, (0,1 mg P-80 per mg NP-Feststoff) mit und ohne Serumzusatz (25 % NCS [V/V]) bei diesen Versuchen getestet. Nach 30 min, 60 min, 90 min bzw. 120 min wurden die jeweiligen Wells im Fluoreszenzplattenleser vermessen.

3.9.3.4.4 AlamarBlue™ Assay

Für jeden Inkubationszeitpunkt beim AlamarBlue™ Assay wurde eine 96-Well-Platte mit Kapillarendothelzellen verwendet. Diese wurde zunächst 1 Mal mit 37 °C warmem KRB gewaschen (200µl je Well) und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen an unbeladenen PBCA-NP inkubiert (200 µl je Well). Inkubiert wurde über den gewählten Zeitraum in einem Inkubator mit Schüttelfunktion bei 37 °C und Schütteln bei 200 rpm.

Für jeden unterschiedlichen Feststoffgehalt an PBCA-NP wurden auch verschiedene Vorinkubationszeiten gewählt, die von 30 min bis hin zu 240 min reichten. Nach der Inkubation mit den Partikeln wurden die Zellen wiederum 2 Mal mit KRB gewaschen und anschließend 200 µl pro Well AlamarBlue™-Lösung hinzupipettiert. Das AlamarBlue™ wurde 2,5 %ig (V/V) in KRB verwendet.

3. Material und Methoden

Jede der Platten enthielt eine Reihe unbehandelter Zellen als 100 %-Kontrolle und eine Reihe Zellen, die zuvor mit einer Lösung aus 0,1 % Triton x 100 in KRB behandelt wurden, welche als 0 %-Kontrolle fungierten.

Nach Zugabe der AlamarBlue™-Lösung wurden die Platten zu den Zeitpunkten 0 min, 60 min, 120 min und 180 min im Fluoreszenzplattenleser vermessen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 *Charakterisierung von beladenen PBCA-NP*

Alle verschiedenen PBCA-NP-Formulierungen waren bei 4 °C im Dunkeln für mindestens 60 Tage stabil (Angabe der Firma NanoDel Technologies GmbH).

4.1.1 **FITC-Dextran markierte PBCA-NP**

Die mittlere Größe der NP lag bei 120-130 nm mit einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,2 (s. Abbildung 4.1(a)). Das Zetapotential der Zubereitung betrug -10 mV (20 µl Suspension wurden mit 980 µl Wasser gemessen). Die aufgereinigten Partikel wiesen eine durchschnittliche Größe von 130 nm auf mit einem PDI von 0,25. Es waren 50 % vom ursprünglich eingesetzten FITC-Dextran inkorporiert.

4.1.2 **Rhodamin 123 markierte PBCA-NP**

Bei diesen Partikeln betrug die durchschnittliche Größe 140–160 nm mit einem PDI von 0,17 bei einem eingestellten Feststoffgehalt von 10 % [m/m] (s. Abbildung 4.1(b)). Das Zetapotential lag bei -43,8 mV, die Einschussrate des Rhodamin 123 bei 100 %.

4.1.3 **Doxorubicin beladene PBCA-NP (10 %)**

Die mittlere Größe der Partikel bewegte sich bei dieser Formulierung im Bereich von 140 bis 150 nm (s. Abbildung 4.1(c)) mit einem PDI von 0,16. Das Zetapotential war bei diesen Partikeln positiv und betrug +6,8 mV. Die Suspension enthielt 7,3 % [m/m] Doxorubicin HCl, nachdem die nicht inkorporierte Substanz abgetrennt war, was einer Einschussrate von 65 % entsprach.

4.1.4 **Doxorubicin beladene PBCA-NP (5 %)**

Auch bei dieser Formulierung lag die mittlere Größe zwischen 140 und 150 nm (s. Abbildung 4.1(d)), der PDI betrug 0,14. Das Zetapotential war leicht negativ und betrug -12,7 mV. Inkorporiert waren 2,7 % [m/m], was eine Einschussrate von 60 % bedeutete.

4. Ergebnisse und Diskussion

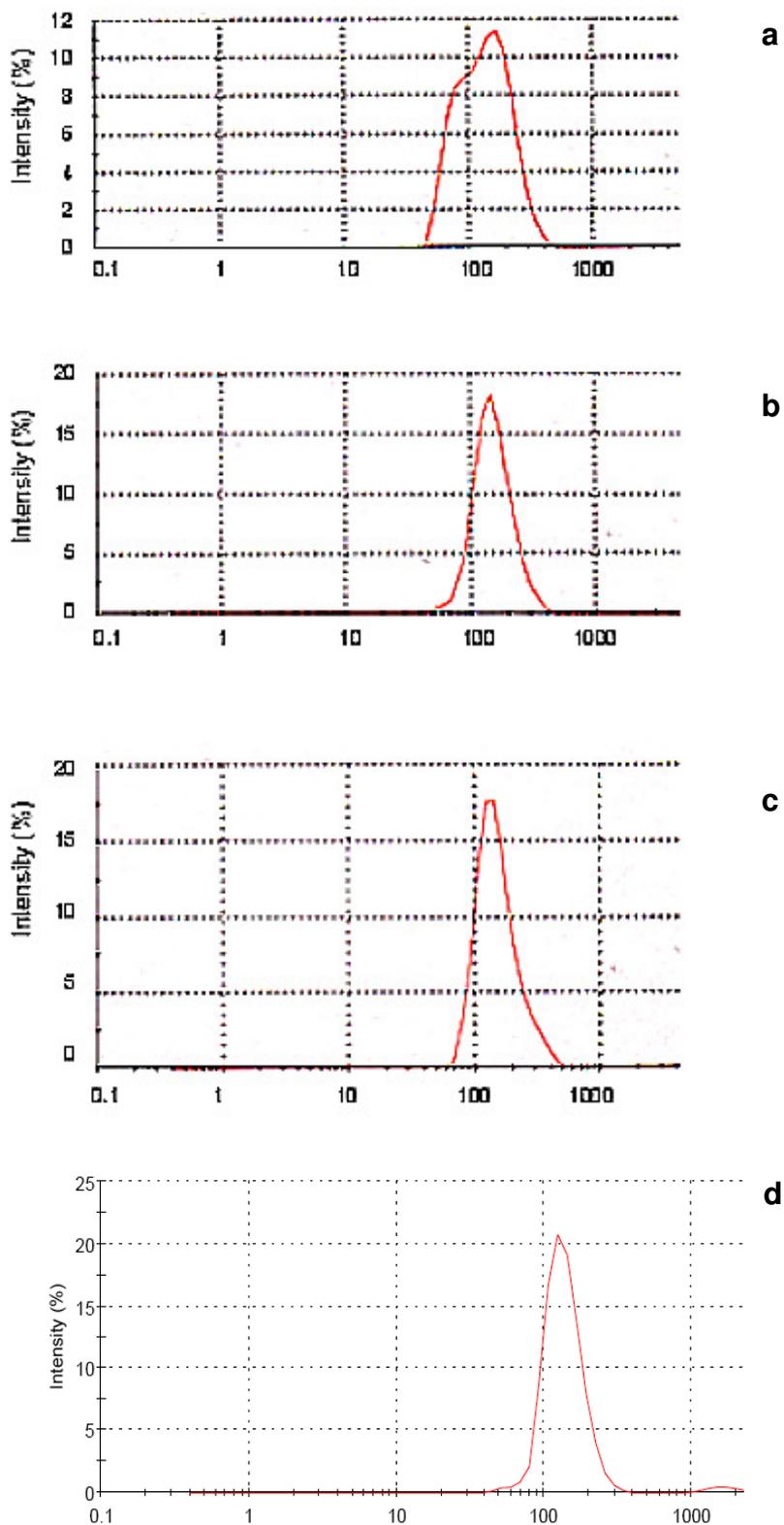


Abbildung 4.1

Größenverteilung verschiedener NP-Formulierungen: (a) FITC-Dextran markierte PBCA-NP, (b) Rhodamin 123 markierte PBCA-NP, (c) Doxorubicin beladene PBCA-NP(10 %), (d) Doxorubicin HCl beladene PBCA-NP(5 %)

4.2 *In vivo Experimente*

Bei den Tierexperimenten an Ratten wurden drei verschiedene PBCA-NP-Formulierungen, beladen mit unterschiedlichen Substanzen, getestet. Auf diese soll im jeweiligen Abschnitt getrennt eingegangen werden. Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Oberflächenmodifikation mit dem nichtionischen Tensid P-80 (P-80) essentiell für die Passage der BHS ist. Die Visualisierung der Passage von PBCA-NP durch die BHS sollte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie erarbeitet werden.

4.2.1 Intraarterielle Applikation von FITC-Dextran markierten PBCA-Nanopartikeln

Um eine schnelle Anflutung der NP-Zubereitungen im Gehirn zu erreichen, wurden diese anfangs in die *Arteria carotis* injiziert, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Menge NP die Gehirnkapillaren erreichte.

Für diese Experimente wurden ausschließlich die FITC-Dextran markierten PBCA-NP verwendet. Die Applikation erfolgte wie unter 3.8.1 beschrieben, das Sammeln und Betrachten der Proben wurde wie unter 3.8.2.5 und 3.8.2.6 erklärt durchgeführt. Es wurden bei jedem Versuch PBCA-NP mit und ohne P-80-Oberflächenmodifikation appliziert. Ohne *Coating* mit P-80 konnte zu allen Zeitpunkten keine Fluoreszenz im Gehirn festgestellt werden. (s. Abbildung 4.2, nur ein Zeitpunkt dargestellt). Diese Tatsache zeigt deutlich, dass ohne ein *Coating* mit P-80 bei FITC-Dextran markierten PBCA-NP keine Passage durch die BHS möglich ist.

4. Ergebnisse und Diskussion

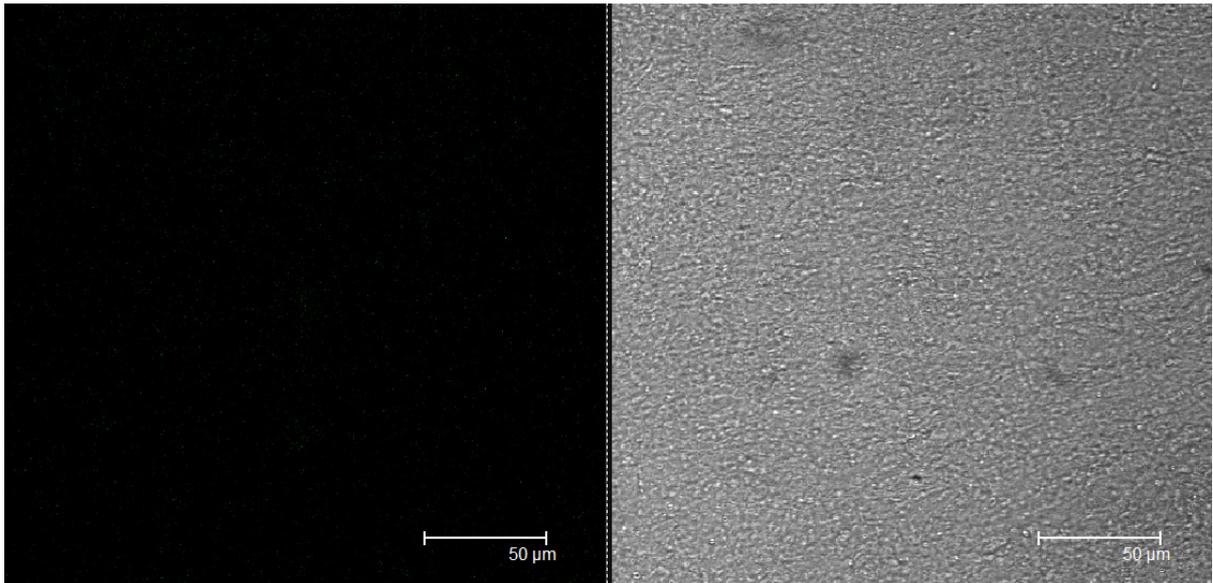


Abbildung 4.2

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 60 min nach i.a. Applikation von nicht mit P-80 modifizierten PBCA-NP. Es ist keine Fluoreszenz im Gehirngewebe zu beobachten.

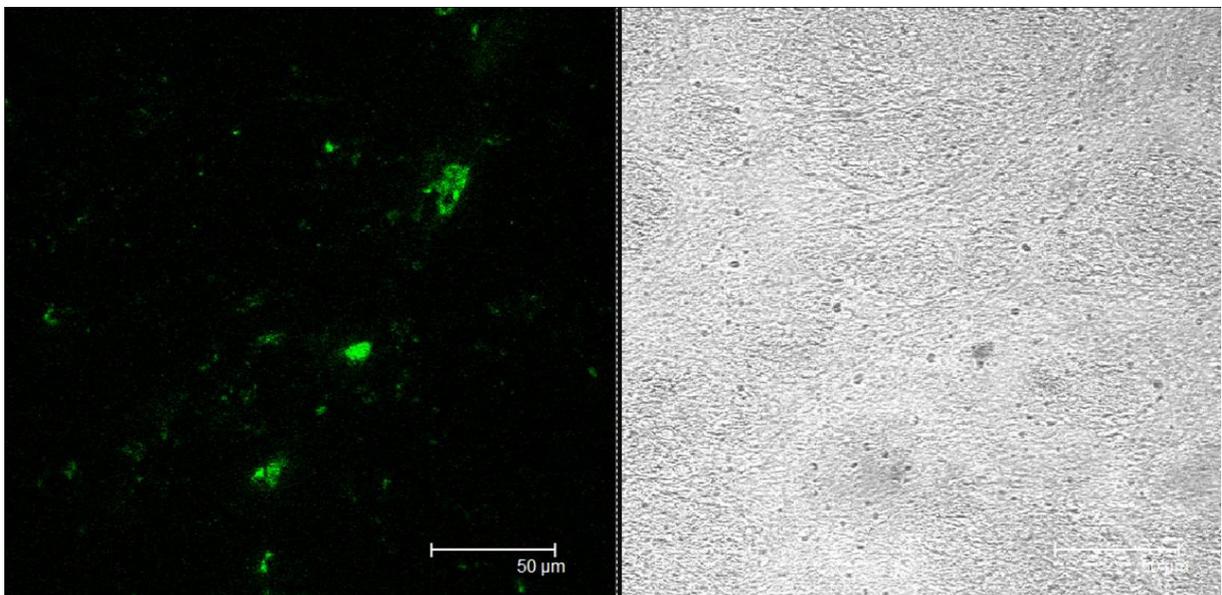


Abbildung 4.3

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 20 min nach i.a. Applikation von mit P-80 modifizierten PBCA-NP. Die Fluoreszenz ist hauptsächlich im Lumen der Gehirnkapillaren lokalisiert

4. Ergebnisse und Diskussion

Bei *Coating* mit 1 mg P-80 per mg PBCA-NP hingegen konnte man zu den unterschiedlichen Zeitpunkten deutlich Fluoreszenz im Gewebe erkennen. 20 min nach der Applikation war die grüne Fluoreszenz vor allem mit den Gehirnkapillaren assoziiert (s. Abbildung 4.3) und noch nicht sehr breit über das Gewebe verteilt, was an den eher größeren Fluoreszenzflecken zu erkennen war. Die Fluoreszenzintensität hat zu diesem Zeitpunkt noch nicht das Maximum erreicht, die Anflutung der NP im Gehirn ist noch nicht abgeschlossen.

Nach 30 min zeigt sich deutlich zahlreiche ringförmige Strukturen angeschnittener Gehirnkapillaren. Die grüne Fluoreszenz war hauptsächlich in den Kapillarendothelzellen lokalisiert und begann langsam, sich über das Gewebe zu verteilen (s. Abbildung 4.4). Diese Abbildung indiziert, dass die PBCA-NP zunächst in die Kapillarendothelzellen gelangen und von dort aus ins Gehirngewebe diffundieren und so die BHS passieren können.

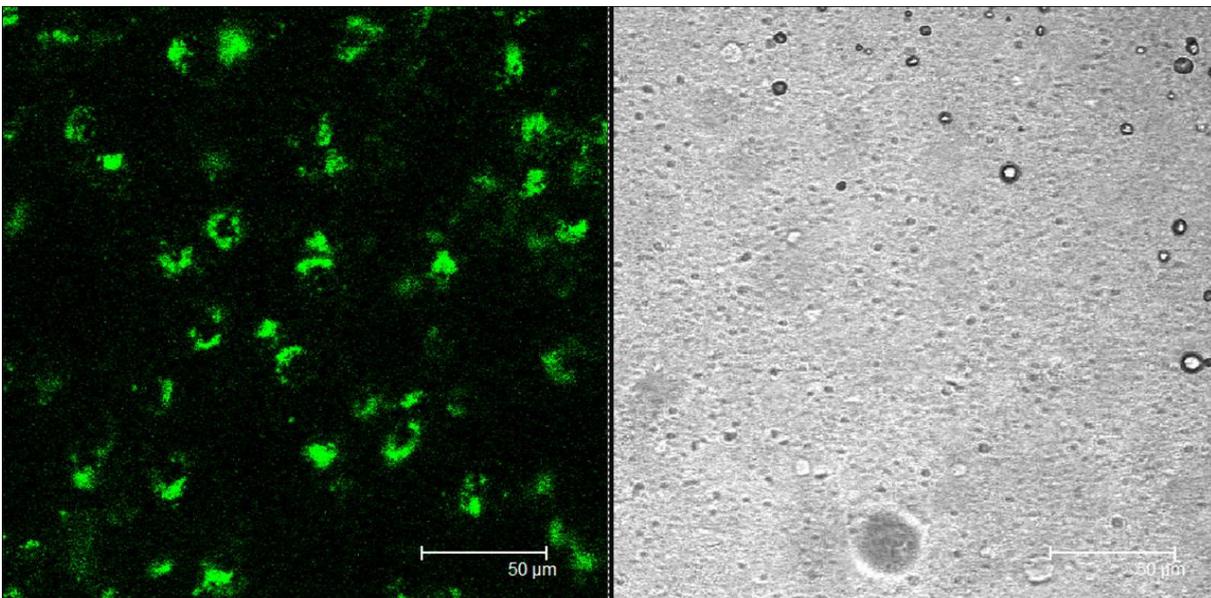


Abbildung 4.4

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 30 min nach i.a. Applikation von gecoateten PBCA-NP. Die grüne Fluoreszenz des FITC-Dextran ist fast ausschließlich mit den Kapillarendothelzellen der Gehirnkapillaren assoziiert, wie an den ringförmigen Strukturen zu erkennen ist.

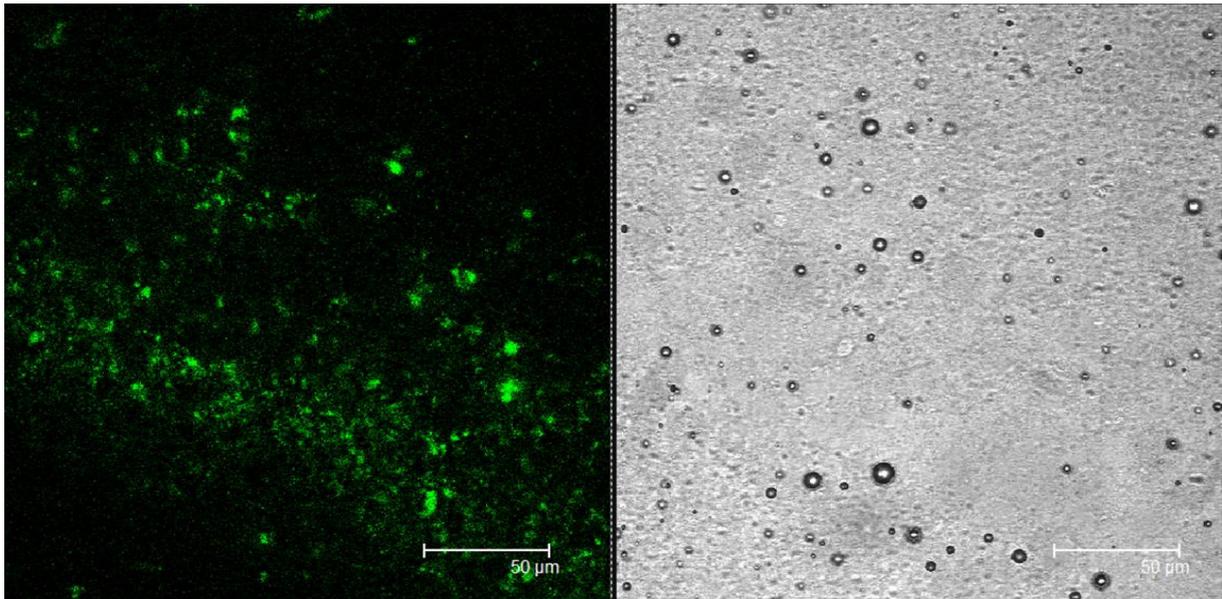


Abbildung 4.5

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 60 min nach i.a. Applikation von mit P-80 modifizierten PBCA-NP. Es zeigt sich eine breitere Verteilung der Fluoreszenz, die sich über das Gehirngewebe erstreckt.

60 min nach der Applikation sieht man kaum mehr Strukturen der Gehirnkapillaren, sondern vielmehr eine flächige Verteilung der grünen Fluoreszenz über das gesamte Gehirngewebe. Zusammen betrachtet mit dem Bild bei 30 min, wo die Fluoreszenz in den Kapillarendothelzellen lokalisiert war, lässt sich hier zeigen, dass die Fluoreszenz und somit die beladenen PBCA-NP eine breitere Verteilung über das Gehirngewebe aufweisen und folglich die Kapillarendothelzellen und damit die BHS passiert haben könnten (s. Abbildung 4.5). Außerdem sprechen bereits diese Ergebnisse dafür, dass die Umhüllung der NP mit P-80 essentiell für die Passage der BHS ist.

Beim Bearbeiten des Versuchsgewebes mit FITC-Dextran markierten PBCA-NP wurde festgestellt, dass das FITC als fluoreszierender Marker der Partikel sehr schnell verblasste und darüber hinaus keine optimale Photonenausbeute lieferte. Die Bilder mussten stets sofort nach dem Schneiden am konfokalen Mikroskop aufgenommen werden. Auch eine Färbung der Schnitte zur Orientierung im Gewebe war nicht möglich. Nach diversen Schritten bei den Färbeprozessen war keinerlei Fluoreszenz in den Schnitten mehr verblieben. Selbst eine Lagerung der Proben länger als 2 Monate bei -80 °C führte zu einer massiven Fluoreszenzabnahme (Daten dazu nicht gezeigt).

Aufgrund dieser kurzen Fluoreszenzzeiten wurde zunächst die intraarterielle Applikation in die *Arteria carotis* gewählt, um eine schnelle Anflutung der PBCA-NP zu gewährleisten. Wie die Ergebnisse in 4.2.1 zeigen, ist diese Applikationsroute geeignet, um die Aufnahme der NP in das Gehirn darzustellen. Da aber die Anwendung der NP am Menschen intravenös erfolgen wird, sollte nun im Folgenden gezeigt werden, ob auch mit einer i.v. Applikation die Aufnahme der PBCA-NP in das Gehirn untersucht werden kann.

Zunächst wurde die Anflutung der NP bei intravenöser Gabe zunächst mit FITC-Dextran markierten PBCA-NP untersucht.

Für die darauf folgenden Studien zur genaueren Lokalisation der NP im Gehirngewebe wurde Rhodamin 123 als Marker für die PBCA-NP eingesetzt, welches eine Photonenausbeute von 99 % besitzt. Rhodamin 123 ist ein Substrat des P-Glykoprotein und kann daher die BHS nicht passieren [195]. Dieser Stoff war also optimal geeignet, um zu überprüfen, ob beladene PBCA-NP auch nach intravenöser Applikation in der Lage sind die BHS mit dem inkorporierten Stoff zu überwinden.

4.2.2 Intravenöse Applikation von PBCA-Nanopartikeln

Um die Anflutung der NP bei intravenöser Applikation zu beobachten wurden die Versuche in einem Abstand von 0 min bis 90 min durchgeführt.

4.2.2.1 FITC-Dextran markierte PBCA-NP

Die Anflutung der NP wurde über einen Zeitraum von 90 min beobachtet. Bei jedem Versuch wurden PBCA-NP mit und ohne Oberflächenmodifikation mit P-80 appliziert. Ohne Oberflächenmodifikation mit P-80 konnte zu allen Zeitpunkten keine Fluoreszenz im Gehirn festgestellt werden. Auch die Gabe von reinem FITC-Dextran mit P-80 führte zu keiner Fluoreszenz im Gewebe (s. Abbildung 4.6, nur ein Zeitpunkt dargestellt).

Aufgrund der hoch eingestellten Signalverstärkung am Fluoreszenzmikroskop infolge des mäßig fluoreszierenden FITC-Dextran zeigen sich leicht grüne Pünktchen in den Aufnahmen. Diese stellen aber lediglich Hintergrundfluoreszenz dar. Die

Verstärkung wurde daher immer mit dem Gehirnschnitt einer völlig unbehandelten Ratte justiert.

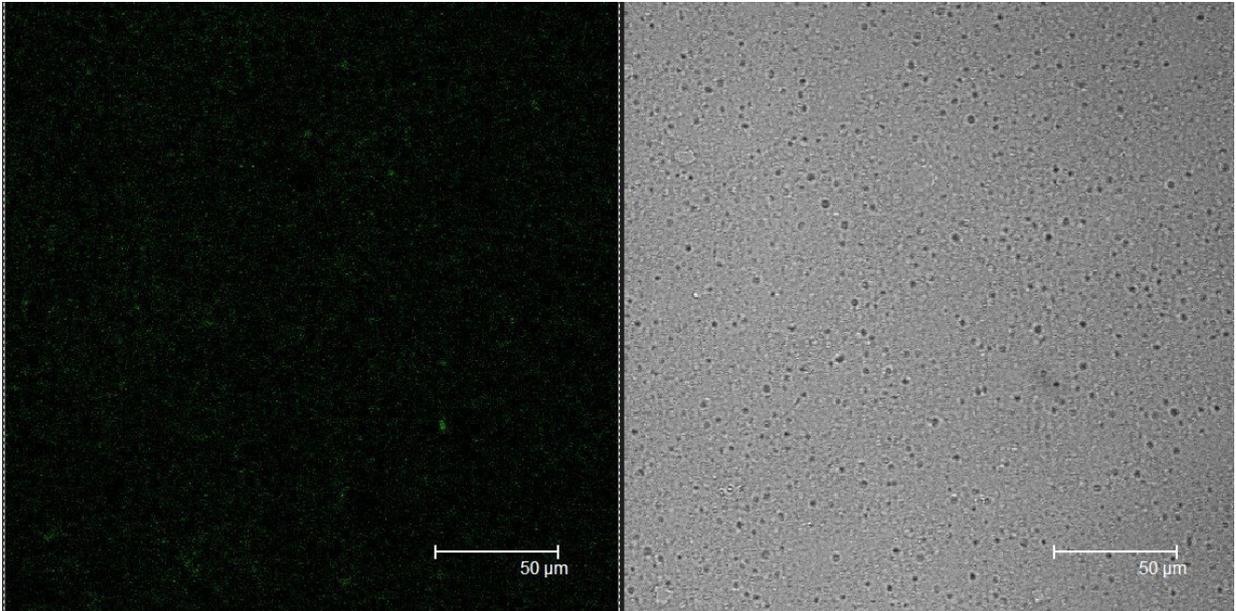


Abbildung 4.6

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit FITC Dextran beladenen und nicht P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 60 min nach intravenöser Applikation. Es ist keine Fluoreszenz im Gehirngewebe erkennbar, nur Hintergrund.

Die nachfolgenden Bilder zeigen die zeitabhängige Aufnahme/Verteilung P-80 beschichteter NP. Nach 30 min (Abbildung 4.7) kann man ganz leicht die Struktur einer Kapillare erkennen, die sich in der oberen Mitte des Bildes gabelt. Auch im Durchlichtbild zeichnet sich das Blutgefäß schön ab. Allerdings ist hier aufgrund des Hintergrundrauschens lediglich die leichte Fluoreszenz in der Kapillare zu sehen, nicht aber Fluoreszenz außerhalb. Das zweite Bild (Abbildung 4.8) zeigt eine eher punktuelle Verteilung. Es ist indes aufgrund der nicht vorhandenen Färbung nicht genau zu erkennen, wo sich die Fluoreszenz genau befindet. Oben mittig im Bild könnte eine angeschnittene Kapillare zu sehen sein, was sich durch das Lichtbild (rechts) allerdings nicht sicher bestätigen lässt.

4. Ergebnisse und Diskussion

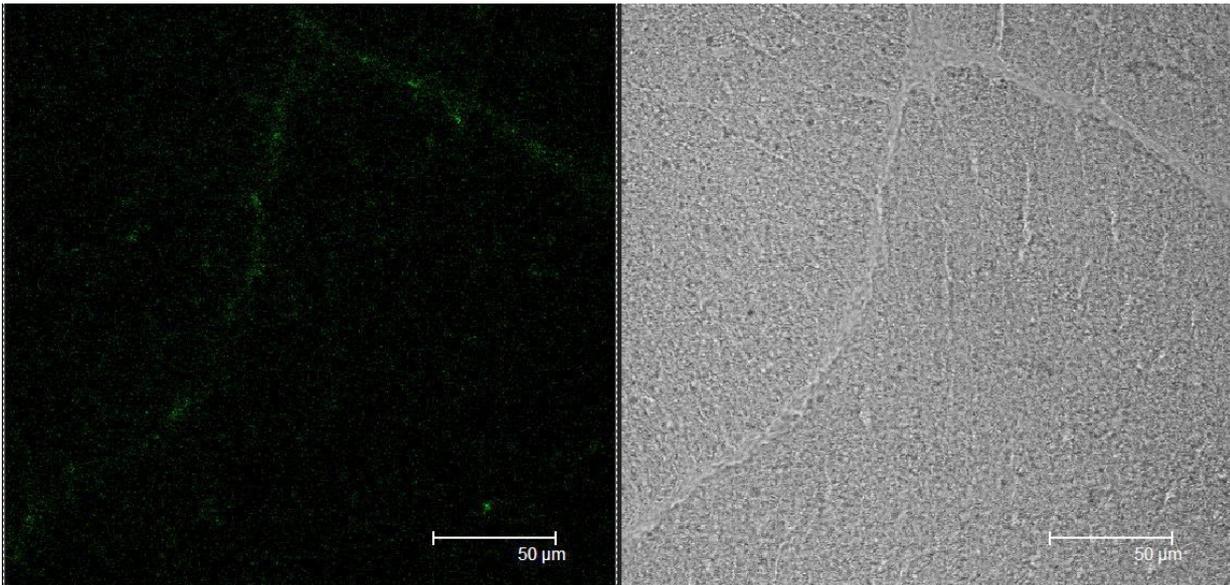


Abbildung 4.7

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit FITC Dextran beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 30 min nach intravenöser Applikation. Eine leicht fluoreszierende zerebrale Kapillare ist erkennbar.

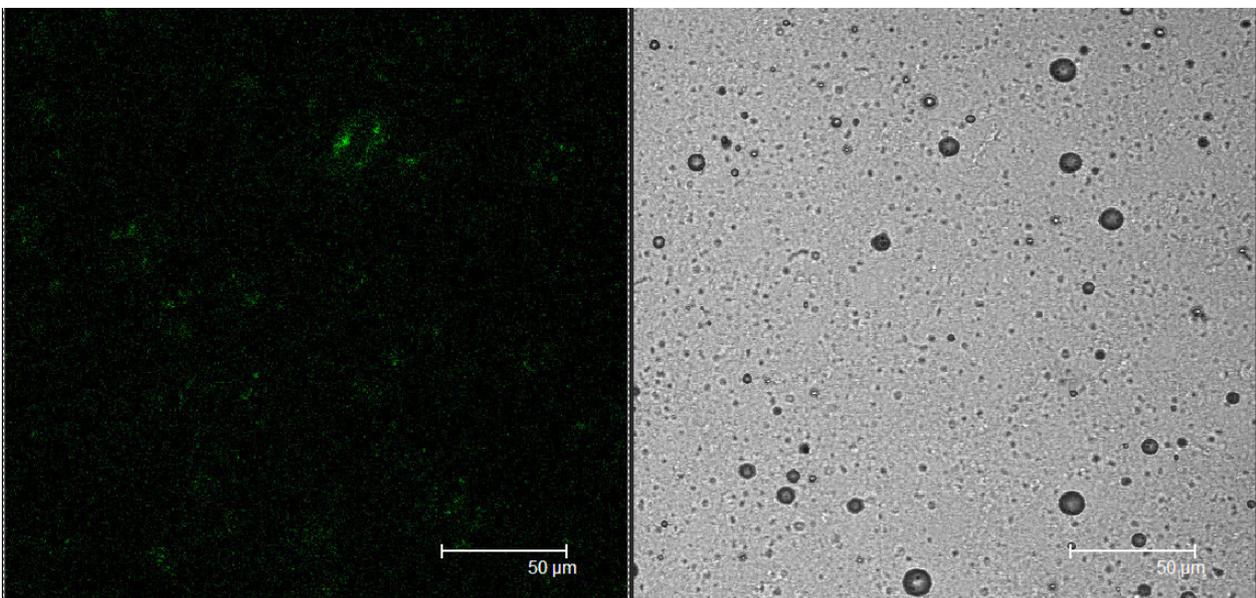


Abbildung 4.8

Konfokal-mikroskopische Aufnahmen der Verteilung von mit FITC Dextran beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 30 min nach intravenöser Applikation. Punktuell ist grüne Fluoreszenz vorhanden.

4. Ergebnisse und Diskussion

45 min (Abbildung 4.9) nach der Applikation ist schon weit mehr Fluoreszenz auszumachen. Es entsteht der Eindruck, als könnte man eine Verzweigung zweier Blutgefäße sehen (Mitte oben). Die Fluoreszenz ist noch mit ihnen assoziiert, scheint allerdings daraus auszutreten, was sich wiederum aufgrund der recht starken Hintergrundfluoreszenz nicht eindeutig beweisen lässt.

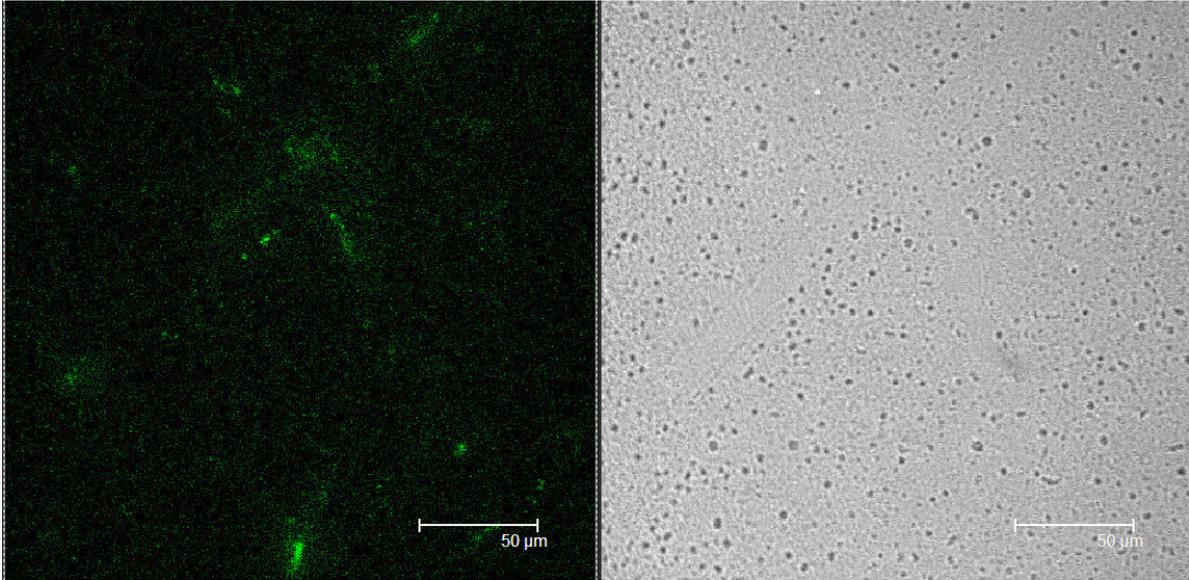


Abbildung 4.9

Konfokal-mikroskopische Aufnahmen der Verteilung von mit FITC Dextran beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 45 min nach intravenöser Applikation. Es ist deutlich grüne Fluoreszenz zu erkennen.

60 min nach Applikation ist eine weitere Zunahme der Fluoreszenz zu verzeichnen - man kann nun ein Blutgefäß erkennen (oben Mitte). Aus dem Blutgefäß tritt Fluoreszenz ins umliegende Gewebe aus, während das Lumen etwas dunkler erscheint. Das Gefäß selbst, also die Kapillarendothelzellen, schimmern als leicht fluoreszierender Ring. Auch im Lichtbild ist das Blutgefäß deutlich zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

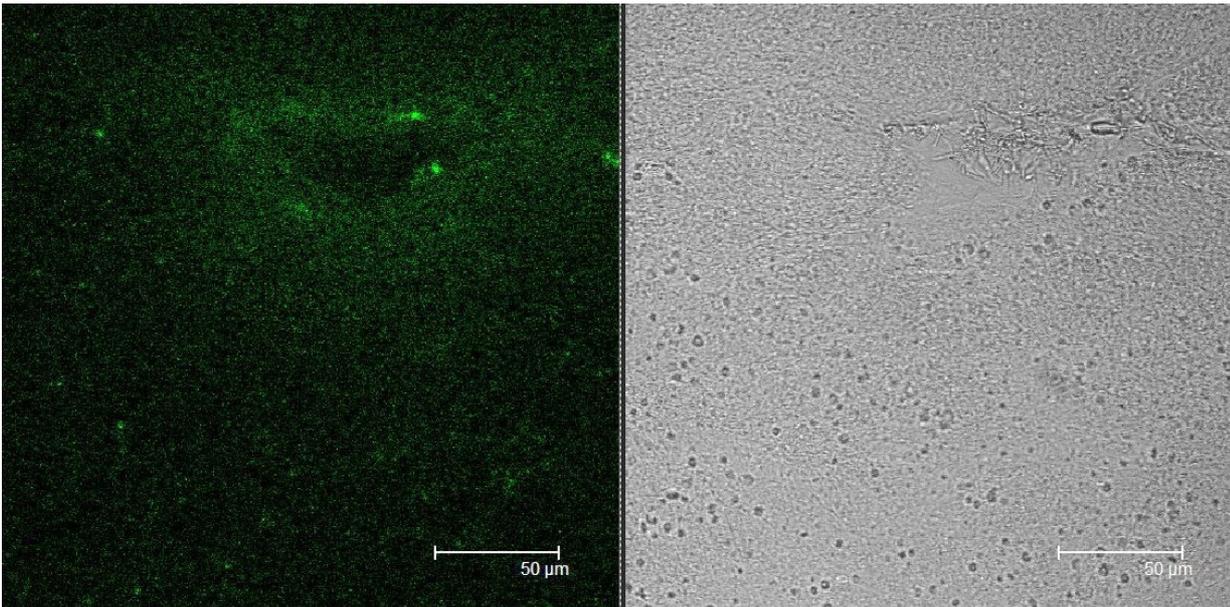


Abbildung 4.10

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit FITC Dextran beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 60 min nach intravenöser Applikation. Es tritt grüne Fluoreszenz aus einem Blutgefäß aus.

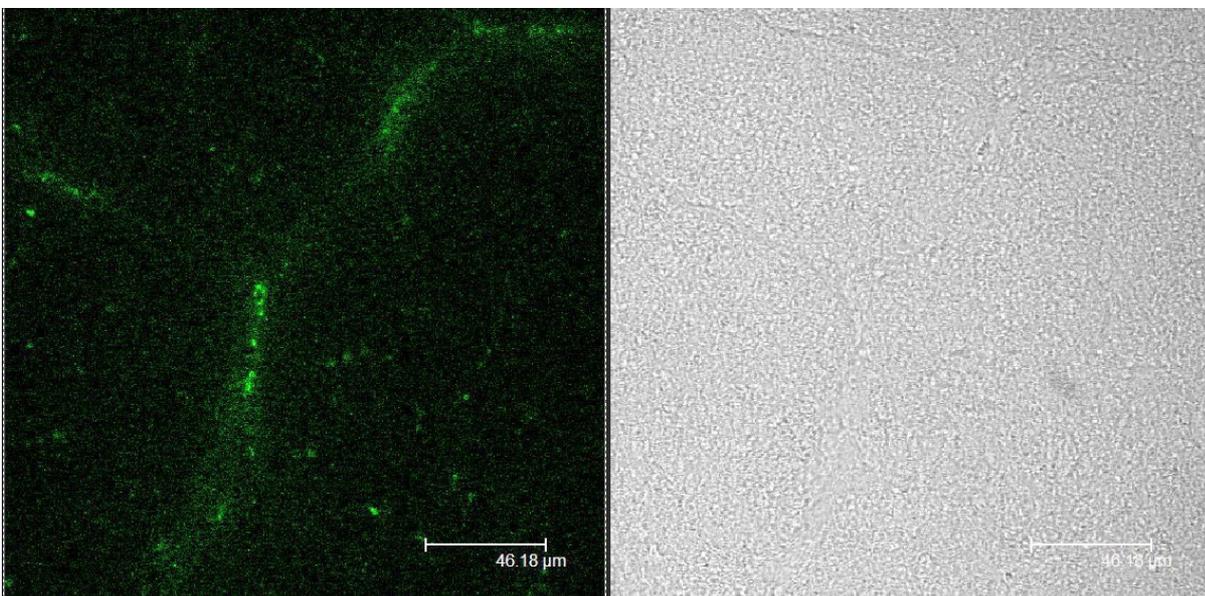


Abbildung 4.11

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit FITC Dextran beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 60 min nach intravenöser Applikation. Helle Fluoreszenz ist mit der Kapillare assoziiert, sowie einige helle Punkte außerhalb.

4. Ergebnisse und Diskussion

Auch die zweite Aufnahme bei 60 min (s. Abbildung 4.11) zeigt eine sich gabelnde Kapillare, die im Gegensatz zur vorherigen Aufnahme bei 30 min viel heller fluoresziert. Die meiste Fluoreszenz ist im Blutgefäß zu detektieren, doch lassen sich auch im Gehirngewebe einzelne helle Punkte ausmachen, welche sich vom Hintergrund abheben. Dies könnte NP darstellen, die die BHS passiert haben.

90 min nach Applikation der NP (s. Abbildung 4.12) ist eine breitere Verteilung der Fluoreszenz zu erkennen. Es scheint, dass sich die NP im Gehirngewebe verteilt haben. Indes sind im Durchlichtbild keinerlei Gewebestrukturen auszumachen, sodass eine genaue Lokalisation der NP nicht möglich ist.

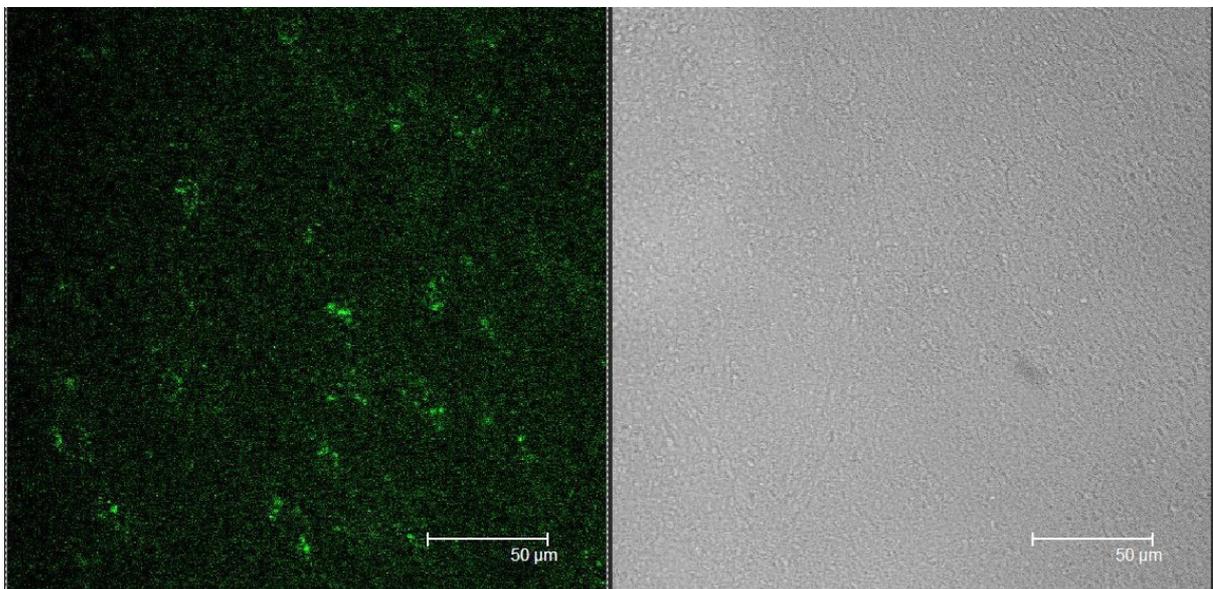


Abbildung 4.12

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit FITC Dextran beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 90 min nach intravenöser Applikation. Es ist eine homogene Verteilung der Fluoreszenz erkennbar.

Die Ergebnisse des Zeitverlaufs nach i.v. Injektion von FITC-Dextran markierten PBCA-NP lieferten starke Anhaltspunkte dafür, dass NP die BHS passiert haben. Dies konnte aber nicht abschließend bewiesen werden, da aufgrund des empfindlichen Fluoreszenzmarkers Gewebefärbungen nicht möglich waren. Somit wurde in den folgenden Experimenten versucht, die genaue Lokalisation der NP im Gehirngewebe zu ermitteln. Dies wurde mit Rhodamin 123 markierten NP durchgeführt.

4.2.2.2 *Rhodamin 123* markierte *PBCA-Nanopartikel*

Die konfokal-mikroskopische Analyse der zeitabhängigen Aufnahme von Rhodamin 123 markierten NP in das Gehirngewebe erfolgte 60 und 90 min nach intravenöser Applikation der NP. Es wurden dazu aus den präparierten Gehirnen jeweils gefärbte und ungefärbte Schnitte angefertigt und am konfokalen Mikroskop betrachtet. Zur Kontrolle erhielt ein Tier jeweils nur Rhodamin 123-Lösung mit P-80-Zusatz ohne NP. Im Gehirngewebe dieses Tieres war bei den hier verwendeten Einstellungen keinerlei Fluoreszenz auszumachen. (Bild nicht gezeigt). Die Einstellung des Mikroskops erfolgte mit einem Gehirnschnitt eines völlig unbehandelten Tieres, um keine Artefakte durch mögliche Autofluoreszenz des Gewebes zu erhalten. Auch bei den NP-Formulierungen ohne P-80-Coating war keine Fluoreszenz im Gehirngewebe der Versuchstiere detektierbar (nicht gezeigt). Mit dieser Formulierung ist nach 60 min (s. Abbildung 4.13) die Fluoreszenz bedeutend kräftiger als bei der bisher verwendeten NP-Formulierung mit FITC-Dextran. Man kann hier deutlich eine Assoziation der Fluoreszenz mit dem Inneren des Blutgefäßes erkennen und darüber hinaus einen leichten Schein außerhalb. Ob indes die NP wirklich die BHS passiert haben, muss eine histologische Färbung zeigen.

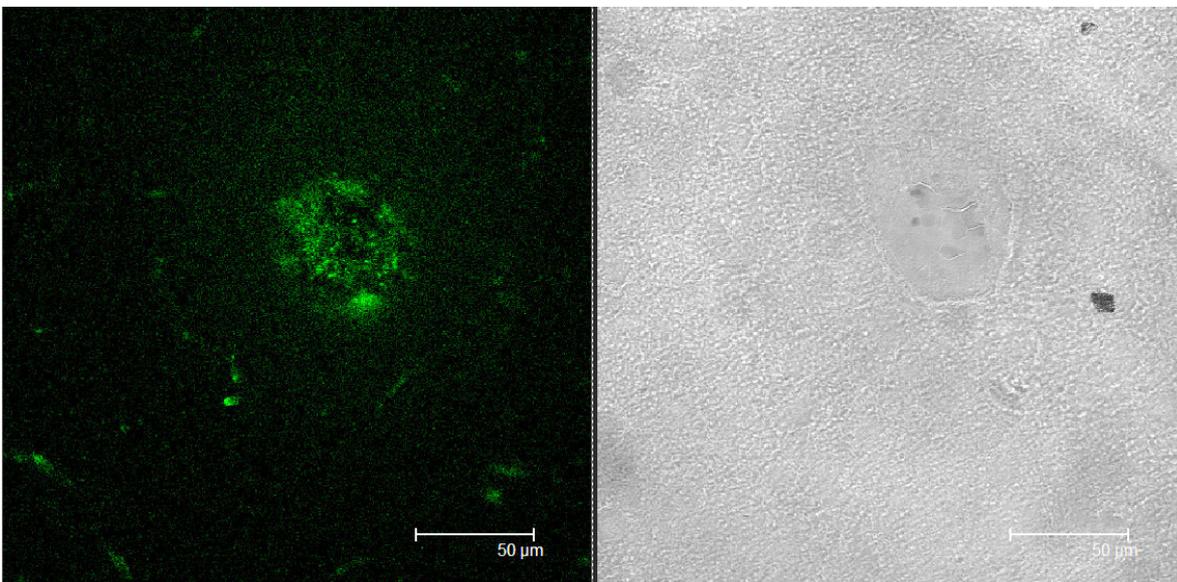


Abbildung 4.13

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit Rhodamin 123 beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 60 min nach intravenöser Applikation. Das Gewebe war ungefärbt.

4. Ergebnisse und Diskussion

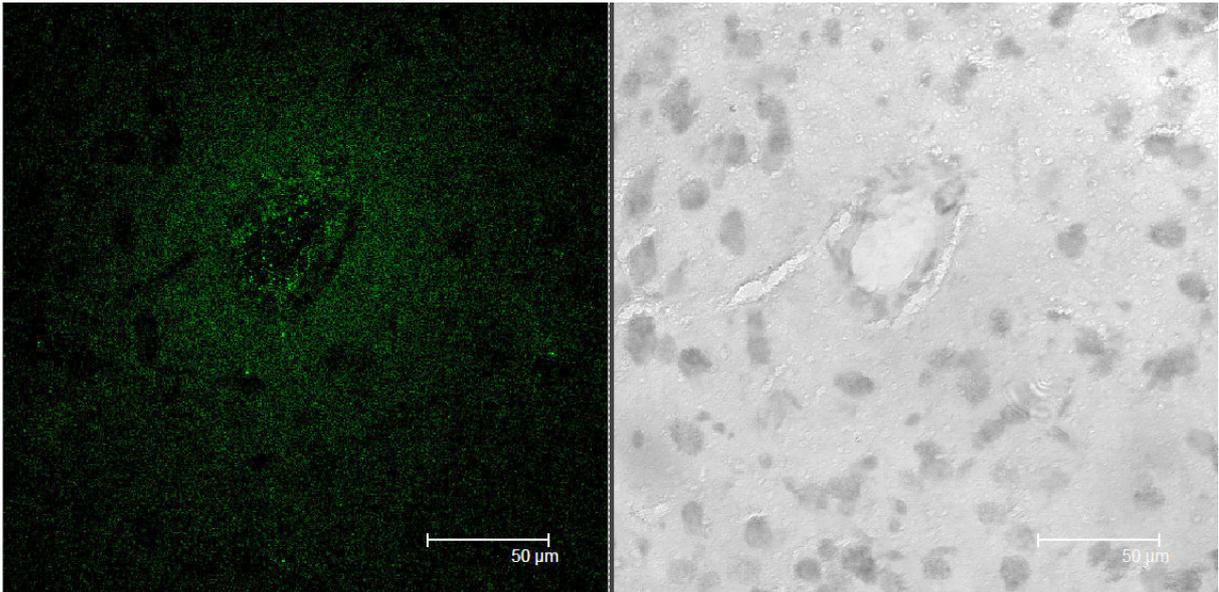
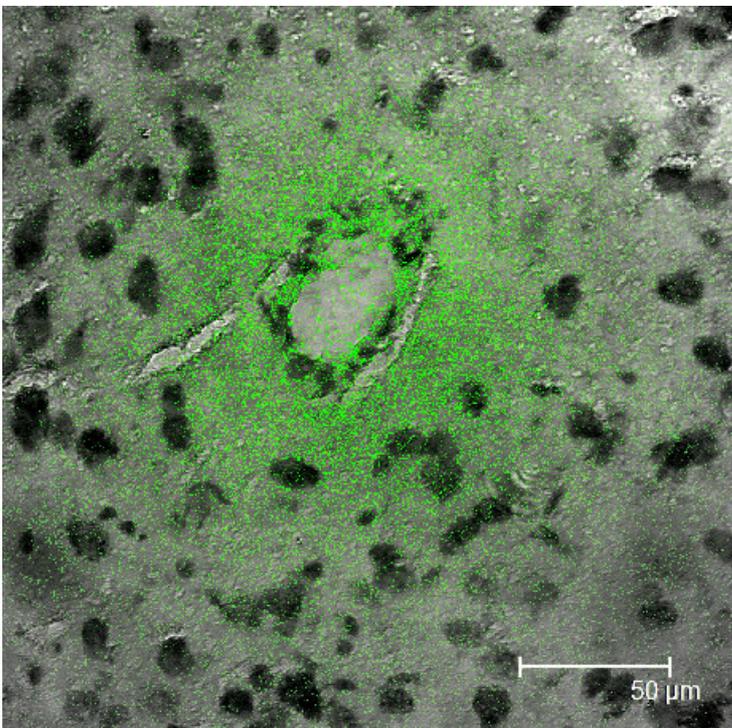


Abbildung 4.14

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit Rhodamin 123 beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 60 min nach intravenöser Applikation. Es ist im hier Nissl-gefärbten Gewebe erkennbar, dass sich die Fluoreszenz aus dem Lumen des Gefäßes über das Gewebe verteilt.

Eine Überlagerung der beiden Kanäle verdeutlicht nochmals die Tatsache, dass sich Nanopartikel aus einem Blutgefäß heraus ins umliegende Gehirngewebe zu verteilen



beginnen. Auch die Fluoreszenz in den Endothelzellen ist gut zu erkennen (s. Abbildung 4.15).

Abbildung 4.15

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit Rhodamin 123 beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 60 min nach intravenöser Applikation, Overlay beider Kanäle des vorherigen Bildes.

4. Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe der Färbung (Nissl-Färbung) kann man im Lichtbild das hier abgebildete Blutgefäß deutlich erkennen. Im Fluoreszenzkanal befindet sich ein Teil der Fluoreszenz im Gefäßlumen. (Abbildung 4.14) Es ist aber auch sehr deutlich zu sehen, dass die Fluoreszenz mit den zerebralen Kapillarendothelzellen assoziiert ist und sich davon ausgehend in das perivaskuläre Gewebe ausbreitet. Mit Hilfe dieser Färbung lässt sich damit eindeutig der Übertritt der PBCA-NP durch die BHS beweisen.

Bei dem Nissl-gefärbten Gewebe verhält es sich auch nach 120 min ähnlich wie nach 60 min. Ein Teil der Fluoreszenz befindet sich noch im Inneren des dargestellten Blutgefäßes, aber es findet ebenfalls eine Verteilung hieraus in das Gehirngewebe statt. Auch hier zeigt sich eindeutig, dass die Rhodamin 123 beladenen PBCA-NP mit P-80-Coating in der Lage sind, die zerebralen Kapillarendothelzellen zu passieren. Zudem ist zu beobachten, dass auch 120 min nach Applikation noch ein Übertritt der NP ins perivaskuläre Gehirngewebe stattfindet.

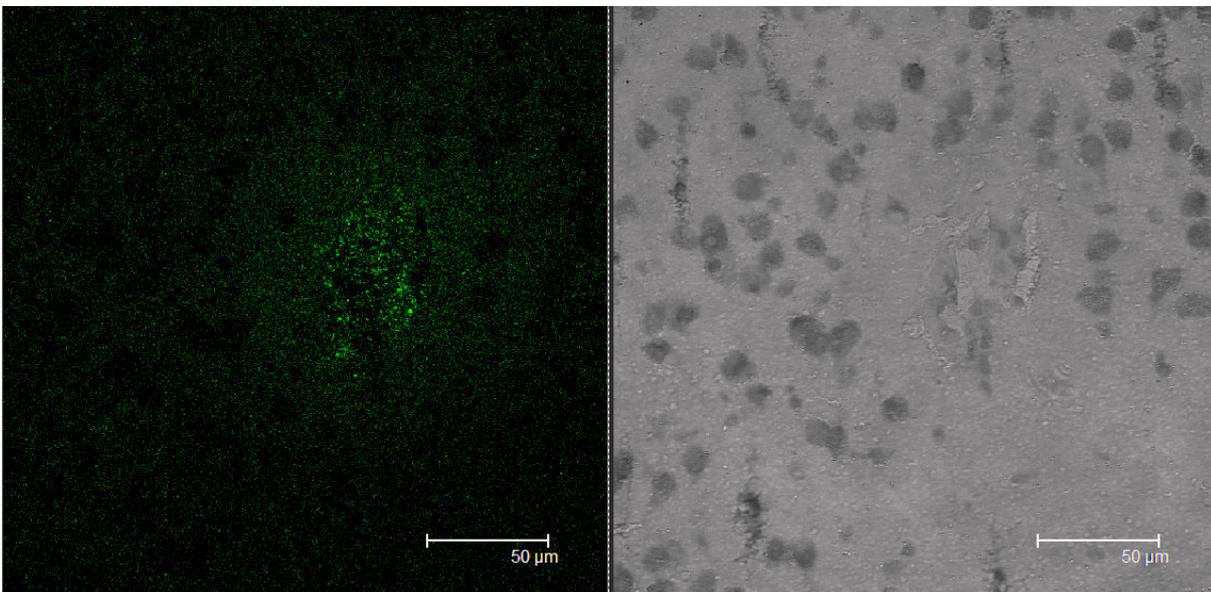
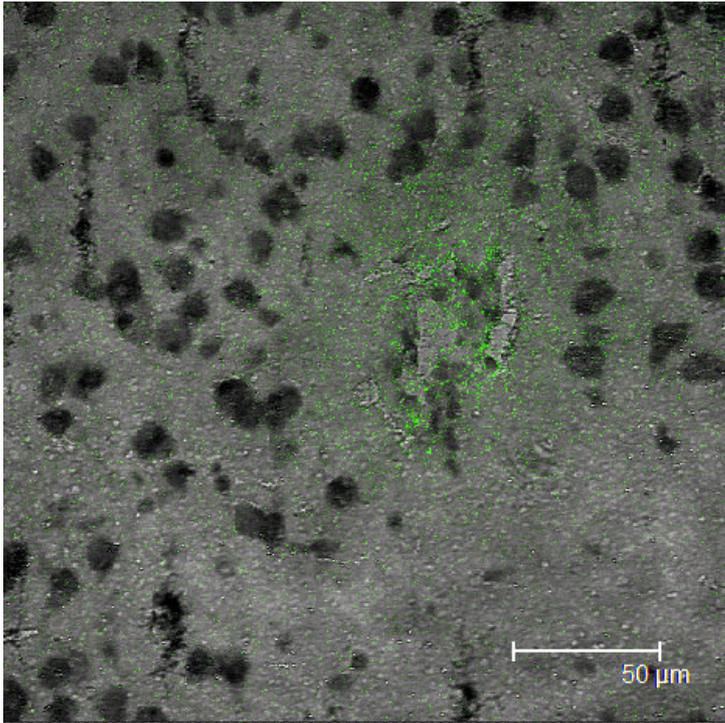


Abbildung 4.16

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit Rhodamin 123 beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 120 min nach intravenöser Applikation. Es findet noch immer eine Verteilung aus dem Blutgefäß in die Umgebung statt, Nissl Färbung.



Wiederum zeigt der Overlay sehr deutlich, dass sich der fluoreszierende Schein der NP vor allem in den Endothelzellen und um das Blutgefäß herum befindet: Die NP haben die BHS passiert und diffundieren in das umliegende Gehirngewebe.

Abbildung 4.17

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Verteilung von mit Rhodamin 123 beladenen und P-80 modifizierten NP im Gehirngewebe von Ratten 120 min nach intra-venöser Applikation, Overlay beider aufgenommenen Kanäle von Abbildung 4.16 im konfokalen Mikroskop.

4.2.2.3 Doxorubicin beladene PBCA-Nanopartikel

Die vorherigen Versuche haben gezeigt, dass mit dem Modellfarbstoff Rhodamin 123 beladene PBCA-NP die BHS von gesunden Ratten passieren können. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob mit dem Zytostatikum Doxorubicin beladene NP ebenfalls die BHS überwinden können. Doxorubicin wird zur Behandlung vielerlei Tumoren, vor allem solider Tumoren (Mamma-, Bronchialkarzinome, Lymphome, Weichteilsarkome) eingesetzt [196]. Es könnte eventuell auch zur Behandlung von Gehirntumoren, beispielsweise dem Glioblastom eingesetzt werden [197]. An verschiedenen Tiermodellen konnte mit Doxorubicin beladenen, P-80 modifizierten PBCA-NP, eine deutliche Regression des Tumors und eine Verringerung der toxischen Nebenwirkungen der Substanz auf Herz und Hoden erreicht werden [198]. Ein liposomales System mit verminderten Nebenwirkungen ist bereits im Handel [199]. Da bei einem Gehirntumor die Barriereigenschaften der BHS beeinträchtigt sind und sie darüber hinaus permeabler wird [200;201], sollte nun auch der Übertritt von Doxorubicin beladenen NP an gesunden Tieren visualisiert

4. Ergebnisse und Diskussion

werden. Da Doxorubicin selbst rot fluoresziert, war es möglich, es direkt im Gehirngewebe zu detektieren.

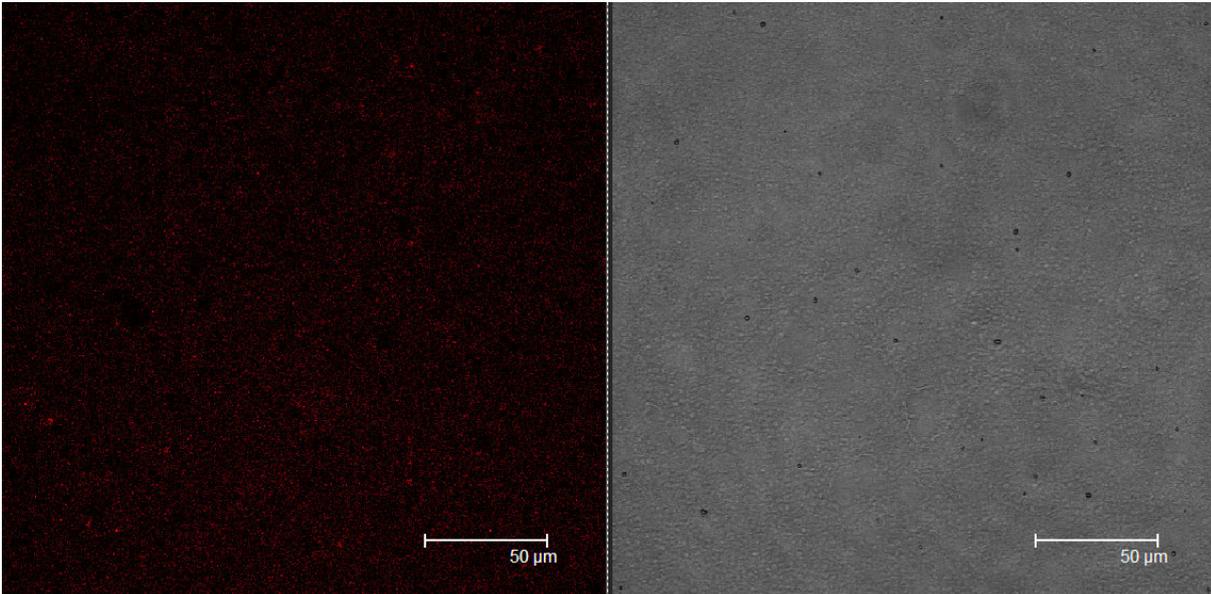


Abbildung 4.18

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 60 min nach i.v. Injektion reiner Doxorubicin-Lösung mit P-80-Zusatz. Es ist nur Hintergrundfluoreszenz zu erkennen.

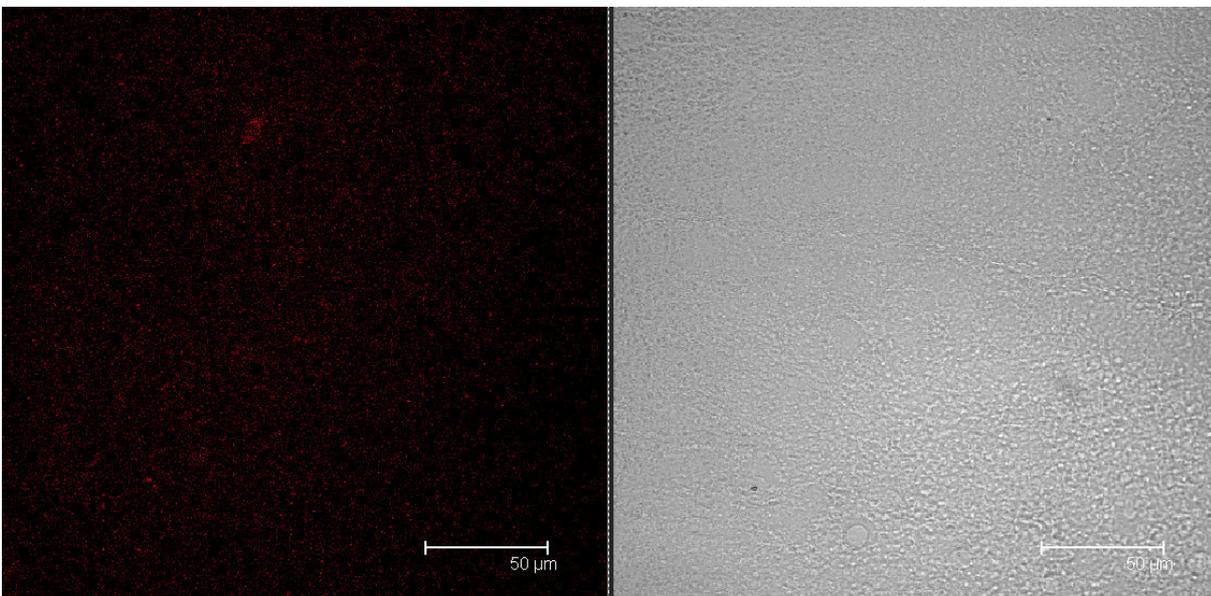


Abbildung 4.19

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 60 min nach i.v Applikation von Doxorubicin beladenen NP ohne P-80 Modifikation. Es ist keine Fluoreszenz im Gehirngewebe festzustellen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Da das Doxorubicin ein ähnlich schwaches Fluorophor wie das FITC-Dextran darstellt, musste auch hier die Fluoreszenzverstärkung des Mikroskops sehr hoch eingestellt werden, was sich in dem ganz leicht rot gepunkteten Hintergrund zeigt (Abbildung 4.18). Wie die Ergebnisse zeigen war weder bei der Injektion reinen Doxorubicins noch im Hirnschnitt eines unbehandelten Tieres (Bild nicht gezeigt) Fluoreszenz im Gehirngewebe zu detektieren.

Nach Injektion einer Nanopartikelzubereitung ohne Oberflächenmodifikation mit P-80 war ebenfalls keine Fluoreszenz im Gehirngewebe messbar (s. Abbildung 4.19). Die roten Punkte stellten lediglich Hintergrundrauschen dar

Wurden die NP hingegen mit P-80 gecoatet und dann injiziert, konnten nach 60 min einige rot fluoreszierende Flecken festgestellt werden (s. Abbildung 4.20). Allerdings war es auch bei dem schwachen Fluorophor Doxorubicin nicht möglich, histologische Färbungen durchzuführen, da diese die Fluoreszenz aus dem Gewebe herausgewaschen hätten (Daten nicht gezeigt).

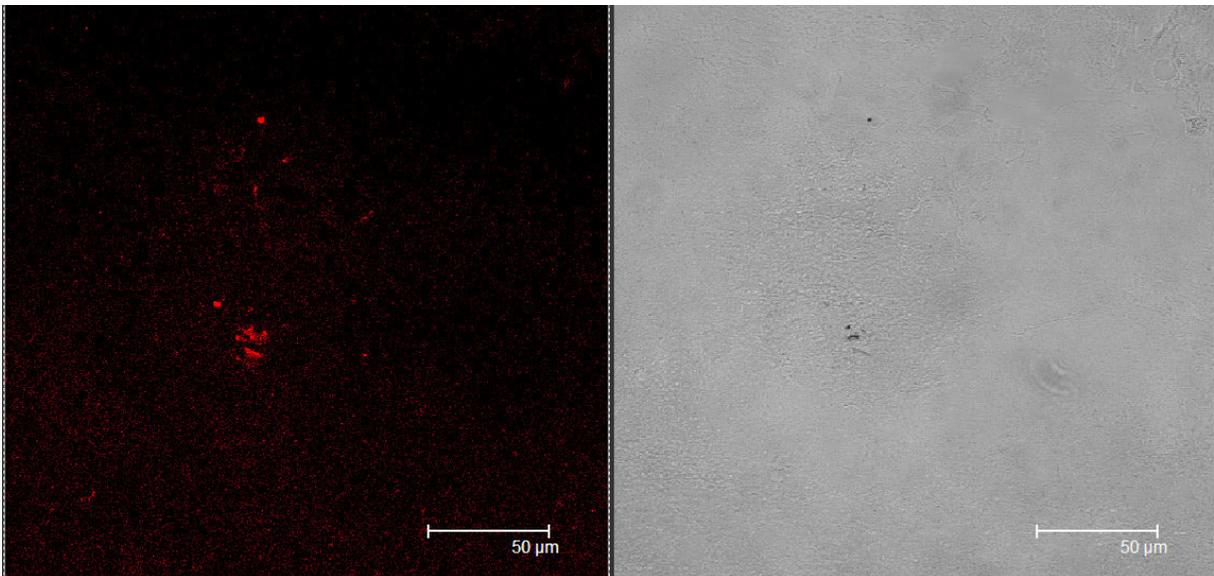


Abbildung 4.20

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 60 min nach Applikation von P-80 oberflächenmodifizierten NP. Es sind einige rot fluoreszierende Flecken im Gewebe zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Da aber in 4.2.2.2 gezeigt werden konnte, dass mit Rhodamin 123 beladene Partikel die BHS passieren, kann angenommen werden, dass die Doxorubicin beladenen NP ebenfalls die BHS überwunden haben. Ohne eine eindeutige Lokalisation im Gewebe war dies aber lediglich als starke Vermutung zu betrachten.

Zum Zeitpunkt $t = 120$ min war in der Mitte des Bildes ein zerebrales Blutgefäß sichtbar, welches von einem Schein aus roter Fluoreszenz umgeben war (s. Abbildung 4.21). Auch im Lichtbild war das Gefäß gut zu erkennen. Im Lumen befanden sich kaum noch NP, die Fluoreszenz verteilte sich gänzlich im perivaskulären Raum. Diese Aufnahme lässt deutlich darauf schließen, dass auch die oberflächenmodifizierten und Doxorubicin beladenen PBCA-NP in der Lage sind, die BHS zu überwinden. um diese Vermutung zu bestätigen, sollte für weitere Experimente eine Färbemethode entwickelt werden, die es möglich machte, auch die Lokalisation Doxorubicin beladener NP eindeutig festzustellen.

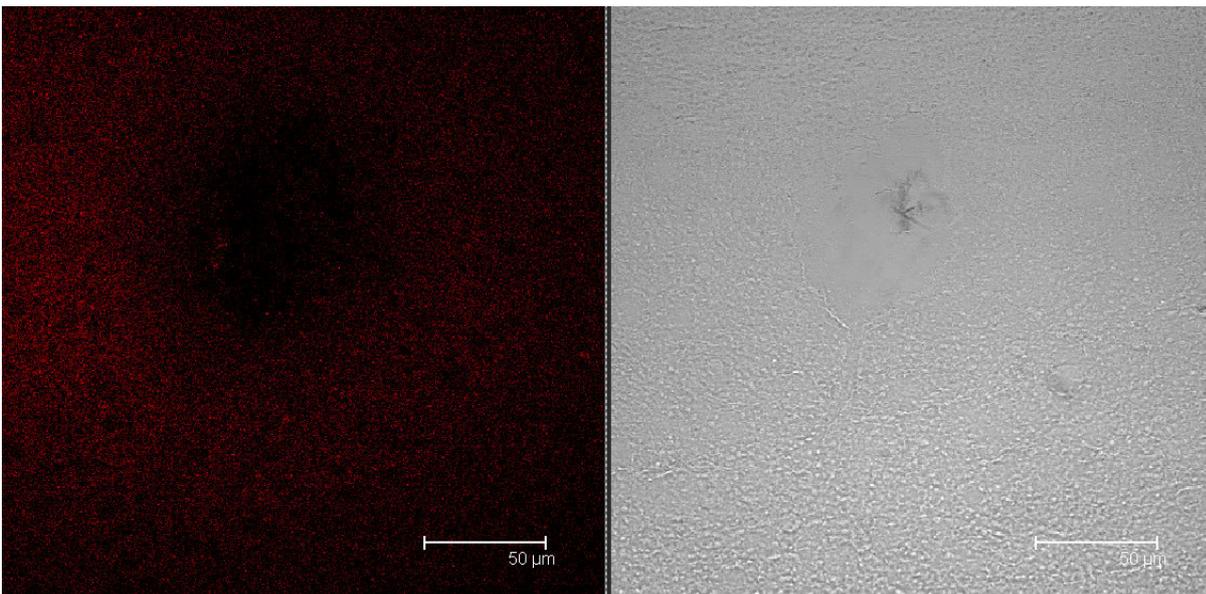


Abbildung 4.21

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 120 min nach i.v. Applikation. Ein deutlich rot fluoreszierender Schein um ein Blutgefäß ist zu erkennen, der indiziert, dass auch Doxorubicin beladene NP die BHS passiert haben.

4.2.2.3.1 Qualitative Untersuchung des Herzgewebes

Eine schwerwiegende Nebenwirkung des Doxorubicins ist seine Kardiotoxizität. Ein Wirkaspekt des Doxorubicins ist auch die Bildung von Radikalen, die durch ein intermediäres Semichinonradikal nach Reduktion durch Zytochrom-P₄₅₀-Enzyme in Gegenwart von NADPH erfolgen kann oder aber die Bildung kann durch einen Anthracyclin-Eisen-Komplexes katalysiert werden. Man vermutet, dass diese Kardiotoxizität durch die Radikalbildung zustande kommt [196]. Diese Kardiotoxizität wie auch die Hauttoxizität (schmerzhaftes Erythem) stellen meist den limitierenden Faktor bei den verabreichten Dosen an Doxorubicin dar [202]. Daher wurde bei den Versuchen zur Penetration der BHS durch mit Doxorubicin beladenen NP auch das Herzgewebe der Versuchstiere entnommen und daraus Gewebeschnitte angefertigt. Eventuelle Veränderungen des Gewebes, sowie Unterschiede in der Anreicherung im Herzgewebe zwischen Doxorubicin-Lösung und Doxorubicin-NP-Zubereitungen sollten ermittelt werden.

Wie auch bei den Gehirnproben wurden die Zeitpunkte 60 min und 120 min nach Injektion der NP untersucht. Dabei wurden jeweils 3 Tiere pro Zeitpunkt eingesetzt. Das erste Tier erhielt reine Doxorubicin-Lösung mit P-80-Zusatz, das zweite Tier erhielt die beladenen NP ohne Oberflächenmodifikation mit P-80, das dritte Tier erhielt die NP mit P-80-*Coating*. Der Hintergrund des Mikroskops wurde mit einem Gefrierschnitt des Herzens eines unbehandelten Tieres so eingestellt, dass keine Fluoreszenz zu sehen war.

60 min nach Applikation der reinen Doxorubicin-Lösung kann ist erkennbar, dass viele Zellen des Herzgewebes rot gefärbt sind und dass generell das gesamte Gewebe rot gefärbt ist (Abbildung 4.22). Die punktuellen Färbungen sind vermutlich die Kerne der Herzzellen, da Doxorubicin durch Interkalation mit der DNA, sowie Topoisomerase II Hemmung seine zytostatische Wirkung entfaltet. Sich schnell teilende Gewebe sind am stärksten betroffen [196]. Die freie Lösung verteilt sich gut im Herzen.

4. Ergebnisse und Diskussion

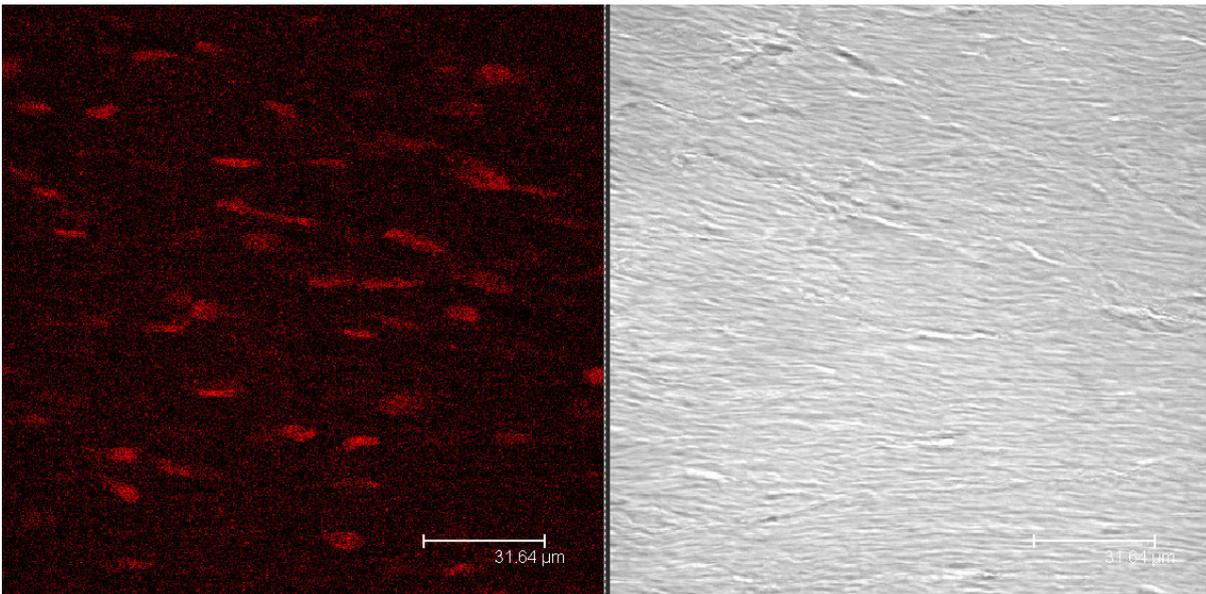


Abbildung 4.22

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Herzgewebes einer Ratte 60 min nach i.v. Applikation einer Doxorubicin-Lösung mit P-80. Rote Fluoreszenz ist in den Zellkernen, aber auch im gesamten Gewebe zu sehen

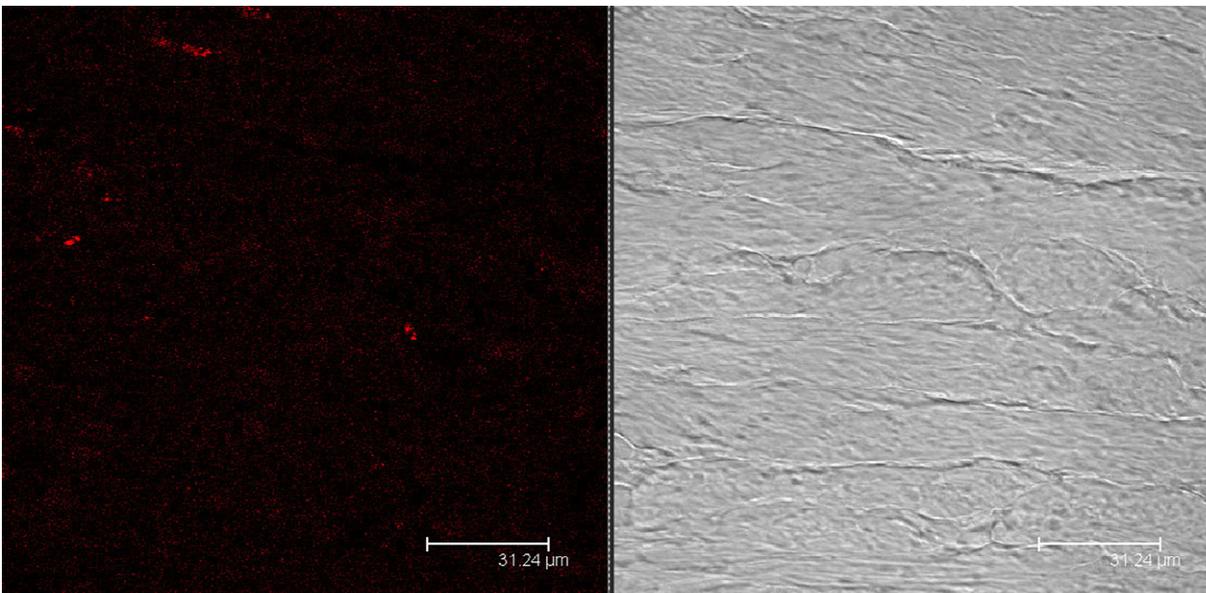


Abbildung 4.23

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Herzgewebes einer Ratte 60 min nach i.v. Applikation von NP ohne P-80 Modifikation. Es ist kaum Fluoreszenz im Herzgewebe zu sehen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Dagegen sind bei Applikation der ungecoateten NP nur einige wenige rote Flecken im Herzgewebe auszumachen (s. Abbildung 4.23). Das lässt darauf schließen, dass die unbehandelten NP verhältnismäßig schnell vom RES erkannt und in die einzelnen Organe des RES abtransportiert werden. Somit wäre die NP-Formulierung zwar weniger toxisch, aber vermutlich würde von dieser Formulierung auch in möglichen Zielorganen nicht genug ankommen, da sie schnell aus der Blutbahn abtransportiert wird.

Bei den NP mit P-80-Coating war nach 60 min eine weniger starke Fluoreszenz im Gewebe zu sehen als bei der reinen Doxorubicin-Lösung (Abbildung 4.24). Die Fluoreszenz ist weniger flächig verteilt, sondern erscheint mehr punktuell. Auch sind die Zellkerne nicht so deutlich zu erkennen. Dies liegt möglicherweise daran, dass die NP nicht in gleichem Maße vom RES entdeckt und abtransportiert wurden wie die nicht gecoatete Formulierung. Somit lässt sich vermuten, dass zwar Doxorubicin mit dieser P-80 modifizierten Formulierung ins Herzgewebe gelangt, aber da die Intensität geringer ist als bei der freien Doxorubicin-Lösung und die Zellkerne weniger deutlich zu sehen sind, die Toxizität verringert sein könnte, wie auch in der Literatur beschrieben wurde [198].

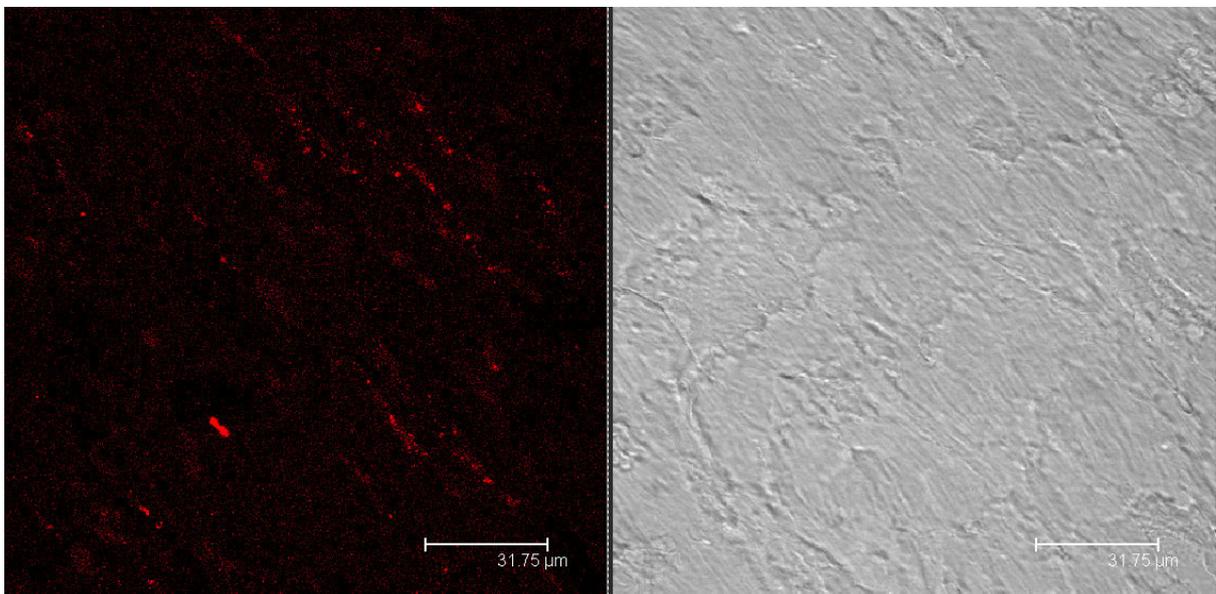


Abbildung 4.24

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Herzgewebes einer Ratte 60 min nach i.v. Applikation von NP mit P-80 Modifikation. Die Fluoreszenz ist eher punktuell verteilt und weniger intensiv als beim freien Doxorubicin.

4. Ergebnisse und Diskussion

Betrachtet man nun die Aufnahmen 120 min nach Applikation, so stellt man fest, dass die Fluoreszenzintensität des freien Doxorubicins im Gewebe bereits wieder abnimmt (s. Abbildung 4.25), die Fluoreszenz der NP-Formulierungen indes zugenommen hat (Abbildung 4.26, Abbildung 4.27). Gleichwohl zeigt die NP-Formulierung ohne Oberflächenmodifikation mit P-80 eine deutlich schwächere Fluoreszenz als die Formulierung mit *Coating*, was sich durch eine schnellere Erkennung dieser durch das RES erklären lassen könnte. Dass die Anflutung noch nicht abgeschlossen ist, liegt sicherlich daran, dass die Aufnahme ins Gewebe bei partikulären Trägern länger dauert als bei einem freien Wirkstoff.

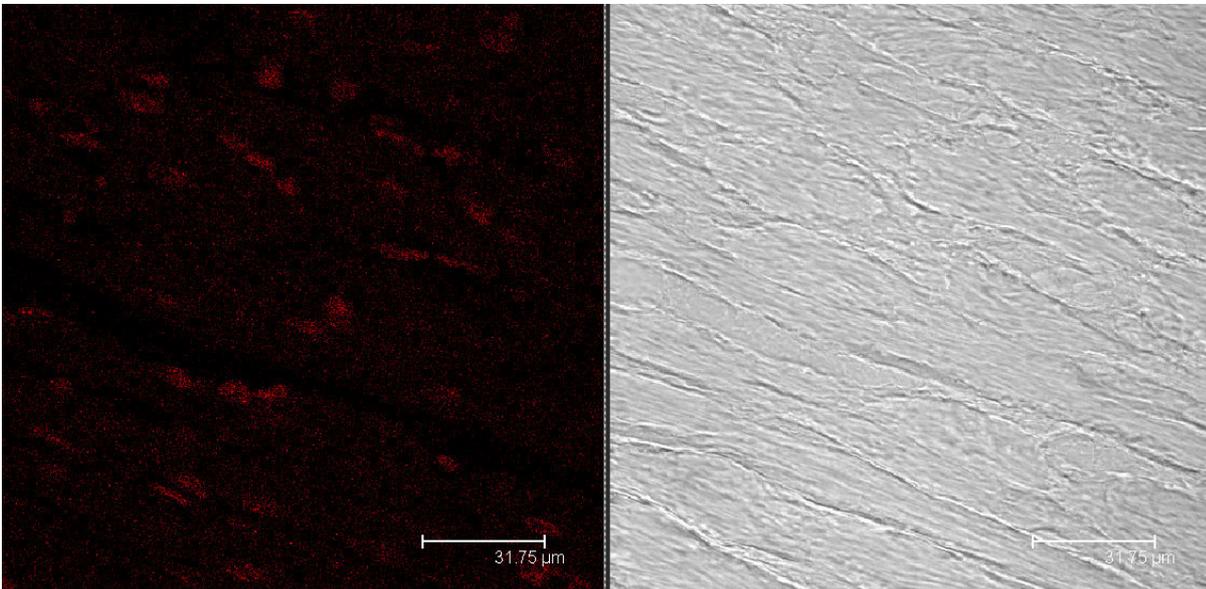


Abbildung 4.25

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Herzgewebes einer Ratte 120 min nach i.v. Applikation einer Doxorubicin-Lösung mit P-80. Die Fluoreszenz nimmt bereits wieder ab

Die NP-Formulierung ohne P-80 reichert sich demnach weniger stark im Herzgewebe an als die Formulierung mit P-80-Zusatz (Abbildung 4.26). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Toxizität dieser Formulierung im Vergleich zur anderen geringer ist. Indes wird –wie bereits erwähnt– das Hauptproblem dieser Formulierung ohne P-80 in der kurzen Zirkulationsdauer im Blut bestehen und der damit verbundenen geringen Anreicherung in jeglichen Geweben. Auch war eine Passage der BHS mit dieser Formulierung nicht möglich.

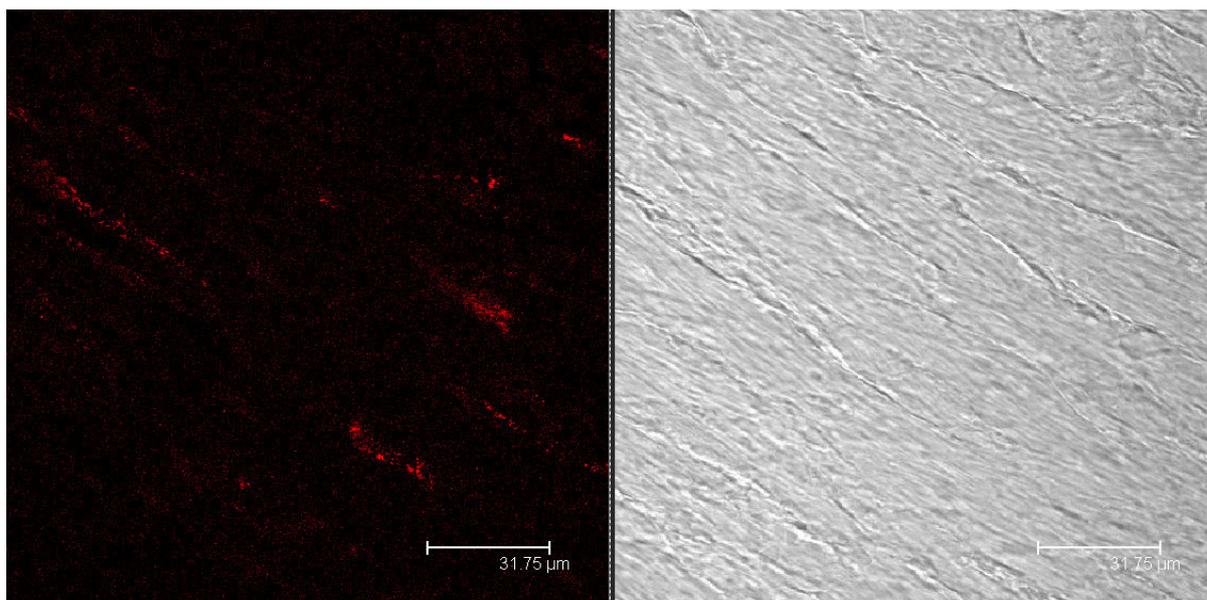


Abbildung 4.26

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Herzgewebes einer Ratte 120 min nach i.v. Applikation von NP ohne P-80 Modifikation. Die Fluoreszenz nimmt zwar 120 min nach Applikation noch etwas zu, ist aber schwächer ausgeprägt als die der P-80 modifizierten Zubereitung

Auf den ersten Blick sieht man die starke rote Fluoreszenz 120 min nach Applikation bei den NP mit P-80-Zusatz, was für eine starke Toxizität der Formulierung zu sprechen scheint (s. Abbildung 4.27). Das freie Doxorubicin nimmt bereits wieder ab im Gewebe (s. Abbildung 4.25). Jedoch besteht ein Unterschied, ob eine Substanz sich direkt im Gewebe befindet, oder ob sie –wie im Falle der NP- noch freigesetzt werden muss. Da die Freisetzung aus den NP eine gewisse Zeit dauert, sind die lokalen Konzentrationen an Doxorubicin vermutlich bei der partikulären Zubereitung geringer als beim freien Wirkstoff. Außerdem müsste im Falle einer Behandlung das freie Doxorubicin sicherlich häufiger verabreicht werden als eine partikuläre Arzneiform, die kontrolliert freisetzt. Schließlich können etwa beim liposomalen Doxorubicin höhere Dosen gegeben werden als beim freien [199].

4. Ergebnisse und Diskussion

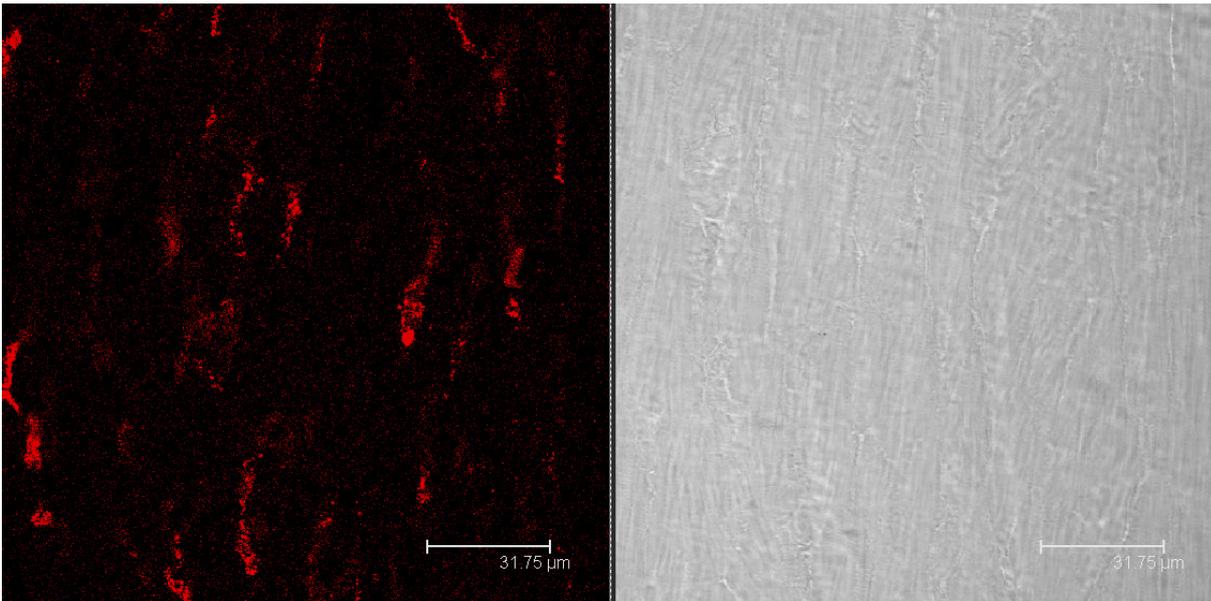


Abbildung 4.27

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Herzgewebes einer Ratte 120 min nach i.v. Applikation von NP mit P-80 Modifikation. Diese Formulierung zeigt eine stärkere Anreicherung im Herzgewebe als die NP-Zubereitung ohne P-80. Die Zellkerne sind deutlich zu erkennen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zwar qualitativ bei den P-80 gecoateten NP nicht weniger rote Fluoreszenz im Gewebe zu sehen war als beim freien Doxorubicin. Dennoch ist davon auszugehen, dass die partikuläre Form aufgrund einer geringeren lokalen Konzentration des freien Doxorubicins weniger kardiotoxisch ist als die freie Substanz. Dies zeigt sich auch darin, dass die Schnitte der Proben mit freiem Doxorubicin eine viel flächigere Fluoreszenz zeigen, während die Fluoreszenz der partikulären Zubereitungen einen eher punktuellen Charakter aufweist. Die Verteilung im Gewebe ist also nicht so flächig wie beim freiem Doxorubicin. Die NP-Formulierung ohne Oberflächenmodifikation mit P-80 reichert sich am wenigsten im Herzgewebe an, wird also vermutlich durch das RES schnell erkannt und abtransportiert. Die Oberflächenmodifikation mit P-80 ist daher sowohl für eine längere Verweildauer im Körper als auch für die Passage durch die BHS essentiell.

4.2.2.4 Co-Administration von FITC-BSA und Rhodamin123 bzw. Doxorubicin beladenen PBCA-Nanopartikeln

Aufgrund der Tatsache, dass das Gehirngewebe bei Verwendung von mit Doxorubicin beladenen NP keine konventionelle histologische Färbung zuließ, musste eine geeignete andere Färbemethode entwickelt werden. Diese ergab sich in der Verwendung von FITC-BSA, das dazu verwendet wird, die Integrität bzw. Permeabilität der BHS *in vivo* zu untersuchen [203]. Auch eine Kombination von Evans Blue mit Albumin ist beschrieben [204]. BSA aufgrund seiner Molekülgröße die (gesunde) BHS nicht passieren und verbleibt in den zerebralen Blutgefäßen. Um die Gehirnkapillaren abzubilden, wurde dem Versuchstier 15 min vor Tötung eine FITC-BSA-Lösung i.v. gespritzt. Man findet daraufhin bei Betrachtung eines Gehirnschnittes die Kapillaren grün fluoreszierend angefärbt bei vor (s Abbildung 4.28). Wären die Kapillaren nicht mehr intakt, würde an solch einer Stelle ein massiver Übertritt des FITC-BSA in das umliegende Gewebe stattfinden. Es wurde in diesem Fall mit gesunden Tieren gearbeitet, deshalb konnte das FITC-BSA als Färbung der BHS *in vivo* fungieren.

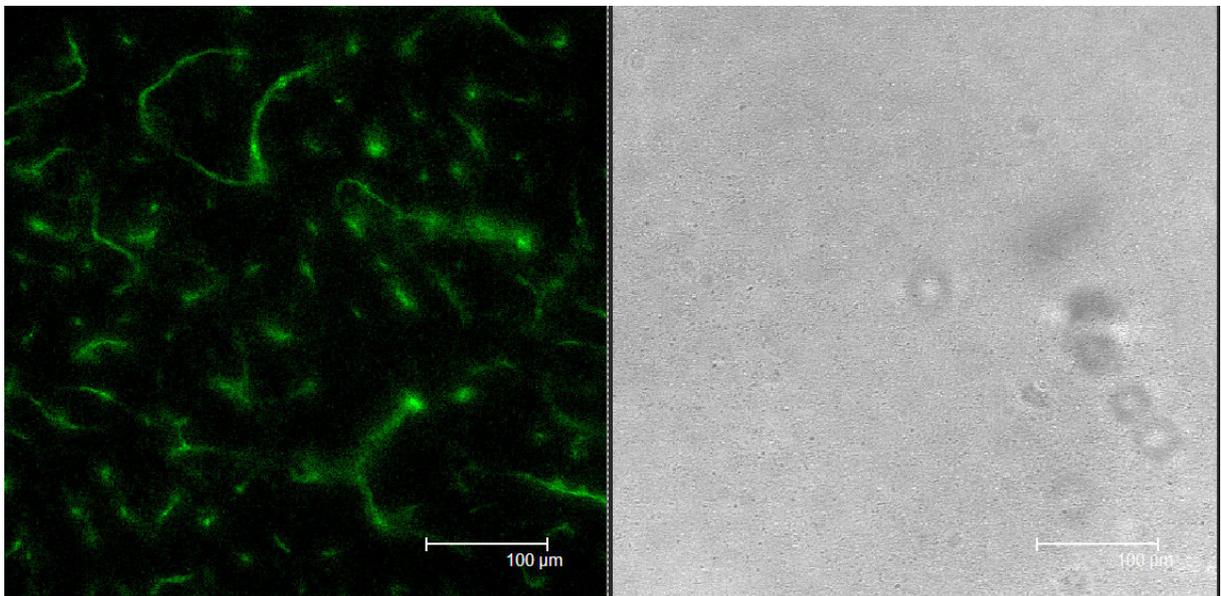


Abbildung 4.28

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der *In vivo* Färbung zerebraler Kapillaren einer Ratte mit FITC-BSA

4. Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Versuchen wurden nunmehr PBCA-NP-Formulierungen, sowohl mit Rhodamin 123 als auch mit Doxorubicin beladen, zusammen mit FITC-BSA appliziert.

Abbildung 4.29 zeigt zum Vergleich eine Aufnahme nach Applikation des reinen FITC-BSA im selben Maßstab wie die folgenden Aufnahmen. Die grüne Fluoreszenz ist ausschließlich in den Blutgefäßen lokalisiert, das umliegende Gewebe ist schwarz.

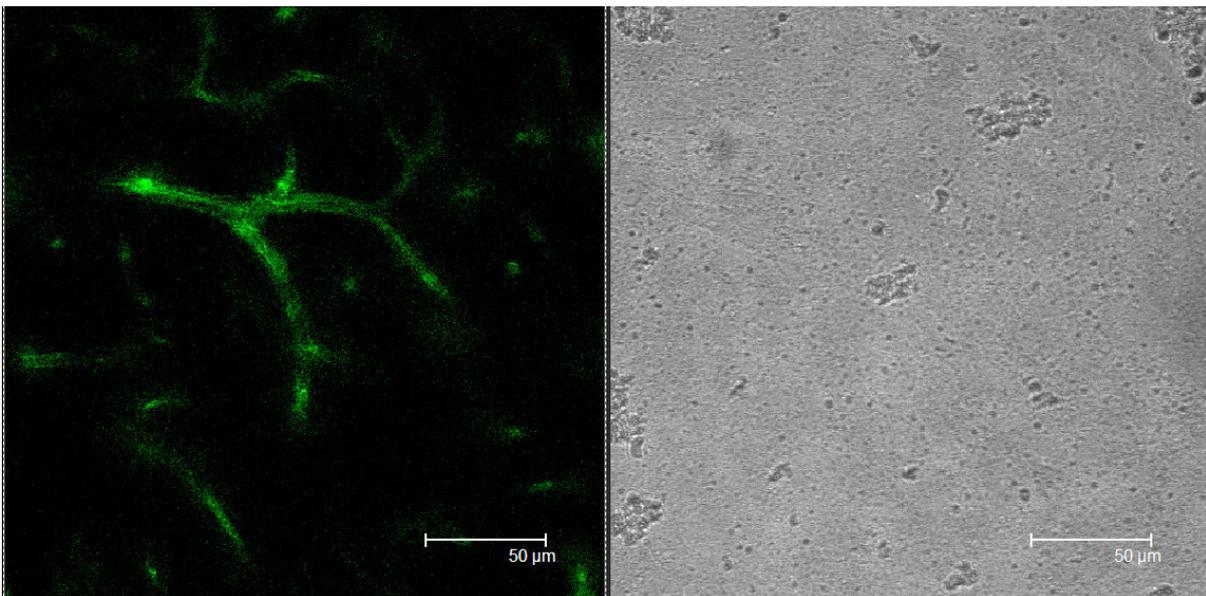


Abbildung 4.29

Konfokal-mikroskopische Aufnahme von reinem FITC-BSA im Gehirngewebe einer Ratte 15 min nach i.v. Applikation. Nur die Kapillaren sind gefärbt, nicht aber das umliegende Gehirngewebe.

Die Applikation von reinem Rhodamin 123 mit P-80 und unbehandelten Rhodamin 123 NP in Kombination mit FITC-BSA zeigte keine grüne Fluoreszenz im Gewebereich (Bilder nicht gezeigt).

4. Ergebnisse und Diskussion

Verwendete man P-80 gecoatete PBCA-NP und betrachtete einen Gehirnschnitt 75 min nach Applikation (s. Abbildung 4.30), wurde in der Kapillare das grüne FITC-BSA sichtbar, sowie einige hellere Punkte darin, die vermutlich von der grünen Fluoreszenz der Rhodamin-NP stammten. Außerhalb des Gefäßes, also im Gehirngewebe, waren indes ebenfalls deutlich fluoreszierende Punkte auszumachen, die indizierten, dass NP die Kapillarendothelzellen der BHS tatsächlich passiert haben. In Abbildung 4.31 ist eine andere Aufnahme der gleichen Probe dargestellt. Wiederum sind die punktuell hellen Flecke in der Kapillare, sowie die fluoreszierenden Punkte außerhalb des Blutgefäßes zu sehen. Es konnte hiermit eindeutig gezeigt werden, dass P-80 oberflächenmodifizierte, mit Rhodamin 123 beladene PBCA-NP die BHS passieren können.

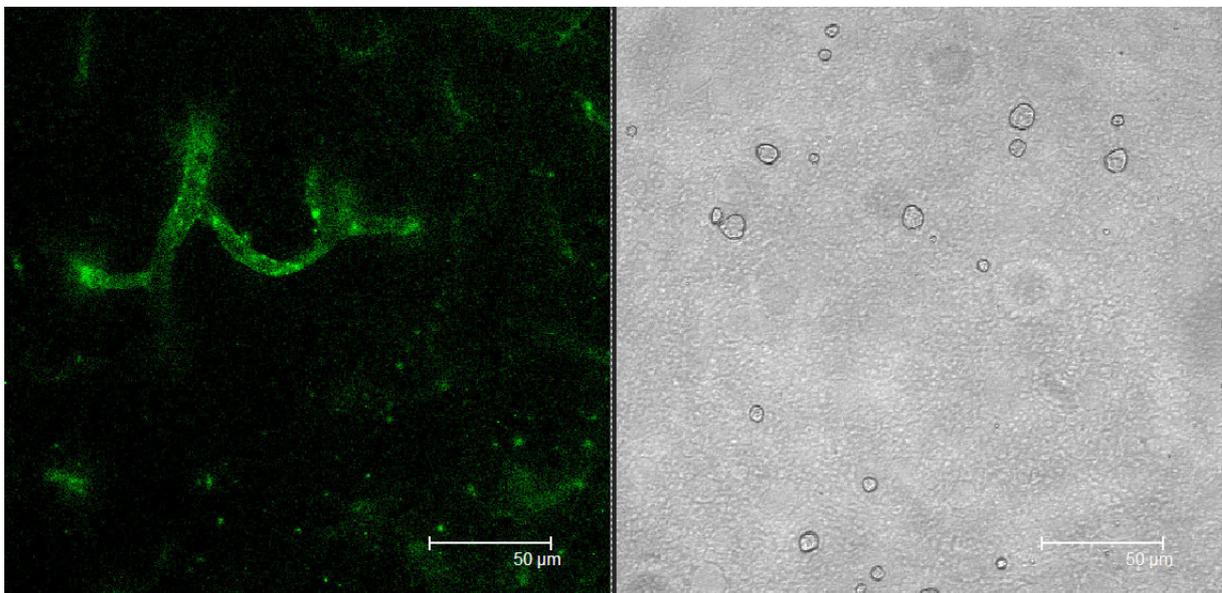


Abbildung 4.30

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 75 min nach i.v. Applikation von Rhodamin 123 markierten NP mit P-80 Modifikation und Kombination mit FITC-BSA. Es ist Fluoreszenz jenseits der Kapillaren sichtbar: NP haben ganz sicher die BHS passiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

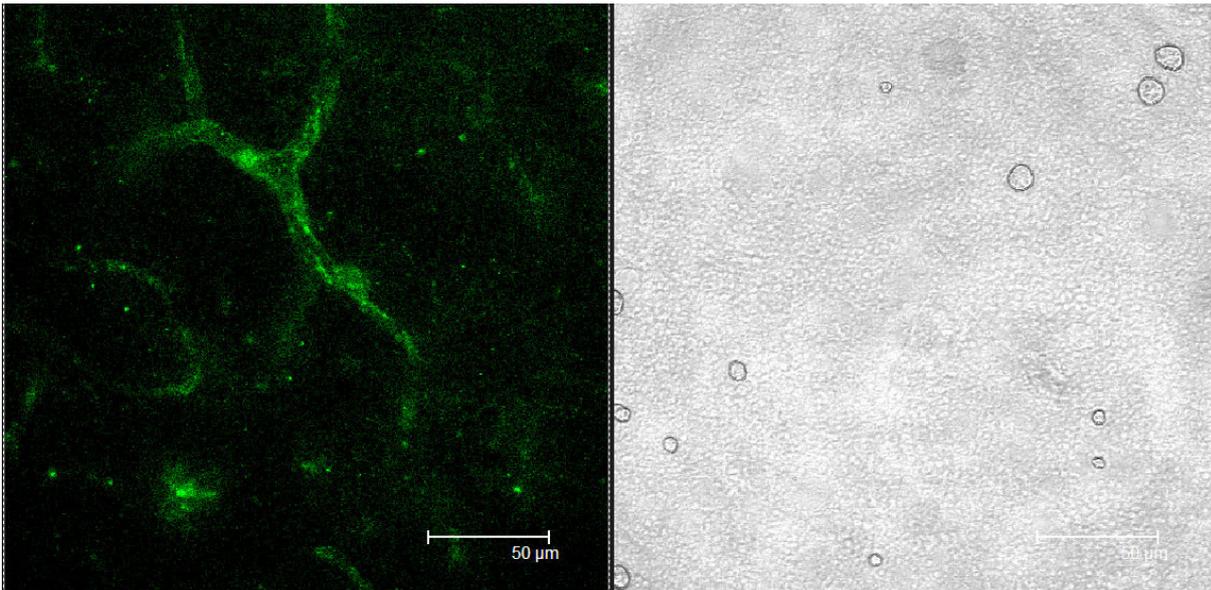


Abbildung 4.31

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 75 min nach i.v Applikation von Rhodamin 123 markierten NP mit P-80 Modifikation und Kombination mit FITC-BSA. Die Fluoreszenz des Rhodamins ist punktuell in den Kapillaren erkennbar und auch außerhalb. Die Überwindung der BHS hat funktioniert

In den folgenden Versuchen sollte die für mit Rhodamin beladene NP etablierte *in vivo* Färbemethode auf mit Doxorubicin beladene NP übertragen werden. Die Versuche zeigen, dass das freie Doxorubicin sowie die nicht P-80 behandelten NP keine rote Fluoreszenz im Gehirngewebe zeigten (Bilder nicht gezeigt). Die P-80 behandelte Doxorubicin beladene NP-Suspension zeigte hingegen nach 60 min einen eindeutigen Übertritt der NP aus den zerebralen Gefäßen hinaus ins Gehirngewebe (s. Abbildung 4.32).

Abbildung 4.32 zeigt links den grünen Kanal des FITC-BSA und rechts den roten Kanal des Doxorubicin. Da beide Substanzen bei 488 nm angeregt werden und das FITC ein sehr breites Emissionsmaximum aufweist, kann man das FITC-BSA auch im roten Kanal gut erkennen. Somit müssen die beiden Fluoreszenzkanäle übereinander gelegt werden, um die Stellen der reinen roten Fluoreszenz des Doxorubicins sichtbar zu machen. Indes lässt sich bereits diesem Bild des roten Kanals entnehmen, dass sich außerhalb der Kapillaren rote Fluoreszenz im Gehirngewebe verteilt hat.

4. Ergebnisse und Diskussion

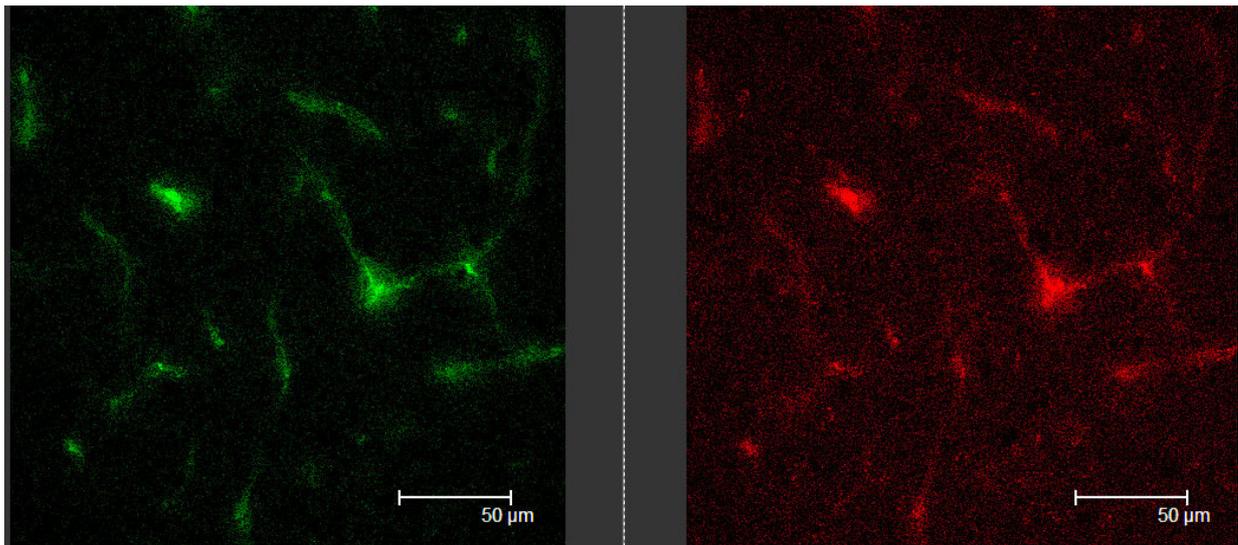
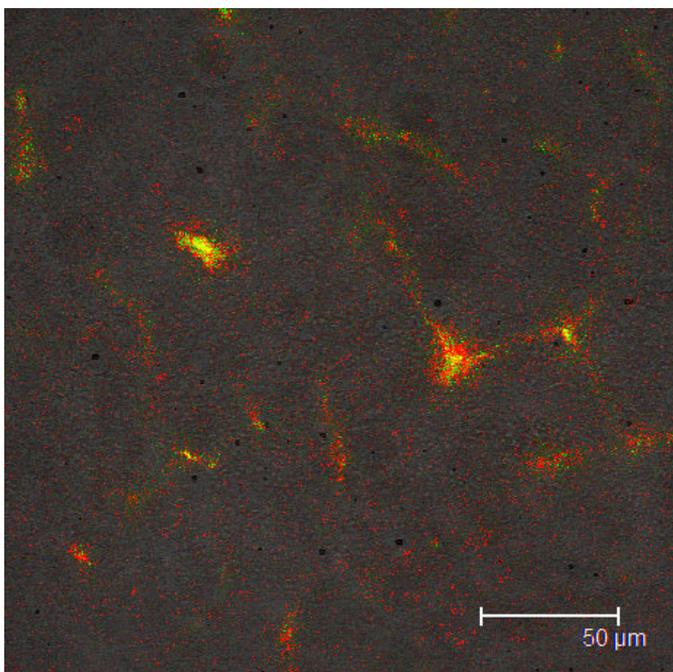


Abbildung 4.32

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 60 min nach i.v. Verabreichung Doxorubicin beladener, P-80 gecoateter PBCA-NP kombiniert mit FITC-BSA-Lösung. Der grüne Kanal stellt FITC-BSA dar, der rote FITC-BSA und Doxorubicin.

Der Overlay dieser beiden Kanäle zeigt die Blutgefäße, die vom FITC-BSA angefärbt



sind in gelber Farbe. Am Rande der Blutgefäße lässt sich deutlich rote Fluoreszenz verzeichnen, die ins Gewebe übertritt. Jedoch sind auch im Gewebe einige rote Punkte sichtbar, die eindeutig beweisen, dass auch gecoatete, Doxorubicin beladene NP in der Lage sind, die BHS nach i.v. Applikation zu überwinden (s. Abbildung 4.33).

Abbildung 4.33

Überlagerung des grünen und des roten Fluoreszenzkanals von Abbildung 4.32 60 min nach i.v. Verabreichung Doxorubicin beladener, P-80 gecoateter PBCA-NP kombiniert mit FITC-BSA. Rote Fluoreszenz am Rand der Blutgefäße und im Gewebe indiziert NP, die die BHS gerade passieren oder bereits passiert haben

4. Ergebnisse und Diskussion

Ein weiteres Beispiel dafür, dass gecoatete, Doxorubicin beladene NP die BHS überwunden haben, zeigt das angeschnittene Gefäß in Abbildung 4.34. Hier ist wiederum der grüne Kanal für das FITC-BSA, sowie der rote Kanal für FITC-BSA und Doxorubicin zu erkennen. Auch hier lässt sich rote Fluoreszenz ausmachen, die über die rote Fluoreszenz des FITC-BSA hinausgeht. Die NP befinden sich noch im Blutgefäß und beginnen, sich über das Gehirngewebe zu verteilen. Die weißen Kreise zeigen solche roten Bereiche von NP, die die BHS passiert haben. Abbildung 4.35 stellt die Überlagerung aller Kanäle dar. Weiße Kreise indizieren auch hier einige Bereiche des Gehirngewebes, in das NP vorgedrungen sind.

Interessanterweise ist das FITC-BSA vor allem in den Kapillarendothelzellen des Blutgefäßes lokalisiert. Das ist insoweit verwunderlich, als man nicht erwarten würde, dass das FITC-BSA in diese Zellen aufgenommen wird. Möglicherweise vermitteln die NP eine unspezifische zelluläre Aufnahme des FITC-BSA und möglicherweise könnten dann auch andere Substanzen mit den NP als „Türöffner“ in die Kapillarendothelzellen aufgenommen werden und weiter ins Gehirn gelangen. Dies wäre indessen genauer zu untersuchen, wie auch der genaue Mechanismus, über den die NP ins Gehirn aufgenommen werden.

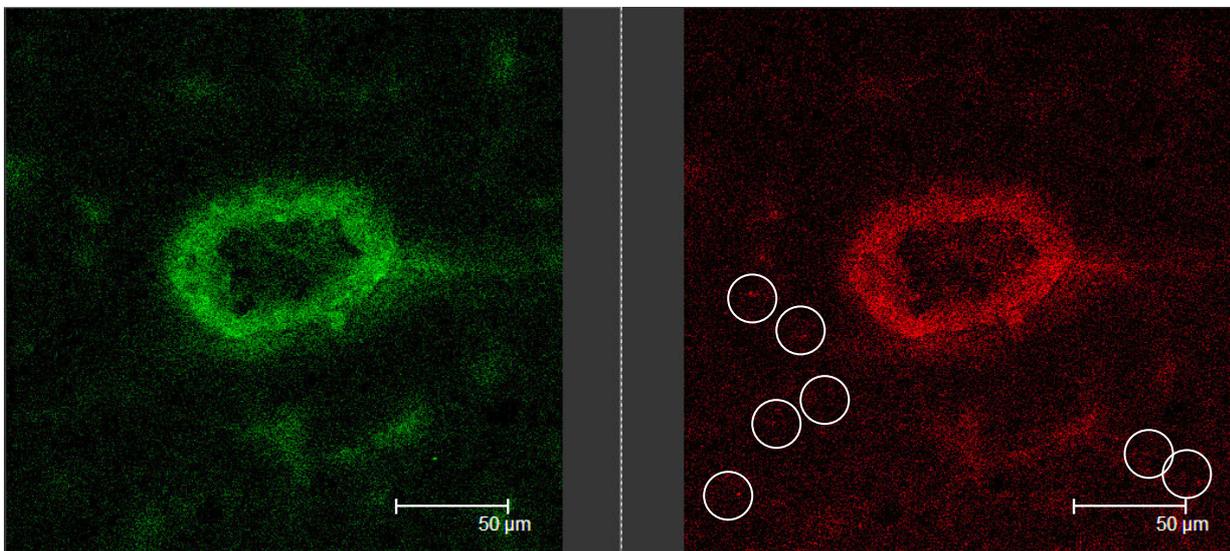


Abbildung 4.34

Konfokal-mikroskopische Aufnahme des Gehirngewebes einer Ratte 60 min nach i.v. Verabreichung Doxorubicin beladener, P-80 gecoateter PBCA-NP kombiniert mit FITC-BSA-Lösung. Der grüne Kanal stellt FITC-BSA dar, der rote FITC-BSA und Doxorubicin. Ein angeschnittenes zerebrales Blutgefäß ist deutlich zu erkennen.

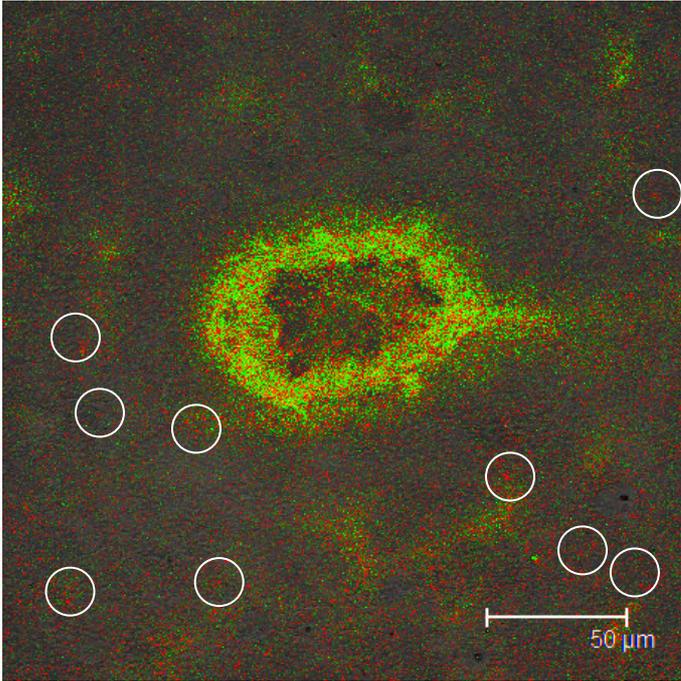


Abbildung 4.35

**Überlagerung aller Kanäle aus
Abbildung 4.34 60 min nach i.v.
Verabreichung Doxorubicin beladener,
P-80 gecoateter PBCA-NP
kombiniert mit FITC-BSA.**

**Weiß Kreise indizieren ins Gehirn
aufgenommene Doxorubicin-NP.**

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit diesen *in vivo* Studien an Ratten eine *in vivo*-Färbemethode etabliert werden konnte mit der sich sowohl Rhodamin 123 als auch Doxorubicin beladene NP im Gehirngewebe nachweisen lassen. Die Ergebnisse zeigen zudem eindeutig, dass PBCA-NP in der Lage sind, die BHS zu passieren.

Bei den Rhodamin 123 markierten NP wurde die Aufnahme der gecoateten NP bis 8 h untersucht, aber es konnte nur bis etwa 4h nach Applikation überhaupt Fluoreszenz in den Gehirnschnitten nachgewiesen werden [Daten nicht gezeigt]. Somit erfolgt der Hauptteil der Anflutung bis etwa 3 h nach Administration, das Maximum liegt bei etwa 90 Minuten.

In der Literatur wurde die Passage der BHS dieser NP meist mit pharmakologischen Experimenten gezeigt. Nanopartikel, die mit dem Enkephalin-analogen Peptid Dalargin beladen waren, führten nach einer P-80-Beschichtung zu einer Analgesie in Mäusen [112]. Dieser Effekt konnte ebenso mit dem Opioid-Rezeptor-Antagonisten Loperamid erreicht werden, der durch seine Impermeabilität an der BHS bei normaler Applikation keine zentral verursachte analgetische Wirkung zeigt [113]. Die Administration von P-80 gecoateten NP mit Tubocurarin führte zu epileptischen Anfällen, die mittels EEG gemessen wurden [205].

4. Ergebnisse und Diskussion

Bisher geht man davon aus, dass die gecoateten NP Lipoproteine wie z.B. Apo E aus dem Blutstrom an ihre Oberfläche adsorbieren und dann über den LDL-Rezeptor via Endozytose ins Gehirn gelangen [198;206]. Es wurde bisher in keiner verfügbaren Arbeit gezeigt, ob die NP tatsächlich die BHS passieren und wie es sich optisch darstellt, wenn die NP ins Gehirn aufgenommen werden. Bisher war nicht sicher erwiesen, ob die NP möglicherweise ausschließlich in der luminalen Membran der zerebralen Blutgefäße verbleiben, ob sie überhaupt in die Kapillarendothelzellen aufgenommen werden oder ob sie tatsächlich in der Lage sind, die BHS zu passieren. Mittels sorgfältiger Untersuchung am konfokalen Lasermikroskop konnte in der vorliegenden die Aufnahme ins Gehirn von mit drei verschiedenen Stoffen beladenen PBCA-NP zweifelsfrei gezeigt werden. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass eine Oberflächenmodifikation der NP-Oberfläche mit P-80 essentiell für eine Aufnahme ins Gehirn ist -eine schon lange bestehende Vermutung, die zahlreiche pharmakologische Arbeiten bereits indizierten [112;113] [205].

4.3 *In vitro Experimente*

4.3.1 Freisetzungsuntersuchungen

Nachdem nun qualitativ mittels konfokaler Mikroskopie gezeigt werden konnte, dass beladene PBCA-NP die BHS passieren können, sollte nachfolgend ermittelt werden, welche Menge des inkorporierten Doxorubicins in einem bestimmten Zeitraum unter verschiedenen Bedingungen freigesetzt wird. Dies sollte zunächst in verschiedenen Medien *in vitro* erfolgen.

Aufgrund des Herstellungsprozesses der NP ist der zu inkorporierende Stoff nicht vollständig inkorporiert, sondern ein Teil befindet sich innerhalb der NP, ein Teil ist an die Oberfläche adsorbiert und ein Teil befindet sich in der umgebenden Lösung der Suspension. (Information der Firma NanoDel Technologies GmbH).

Um sehen zu können, was vom tatsächlich inkorporierten Anteil des eingeschlossenen Wirkstoffs freigesetzt wird, musste zunächst eine Methode etabliert werden, die hergestellten NP aufzureinigen. Diverse Tests mit Filtermembranen aus Celluloseacetat und Polyethersulfon ergaben, dass eine Filtration der Doxorubicin-NP nicht möglich war, da zu viel Doxorubicin an den Membranen adsorbierte und im Filtrat nicht mehr auffindbar war. (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Problematik wurde als Aufreinigungsmethode die Größenausschlusschromatographie angewendet. Mehrere Arbeiten haben bereits die Eignung dieses Verfahrens zur Aufreinigung von Proteinen und partikulären Zubereitungen gezeigt [207-210]. Für Cyanoacrylat-NP wurde diese Methode bereits im präparativen Sinne angewendet [211]. Auch können mit Hilfe dieser Methode die Molekülgrößen der Abbauprodukte des Polymers bestimmt werden [212;213]. Zur Bestimmung der geeigneten Trennbedingungen wurden im Folgenden verschiedene Trenngele und Elutionsmittel getestet.

4.3.1.1 Aufreinigung der Nanopartikel

4.3.1.1.1 Präparative Aufreinigung mit Sephadex G50 fine

Das Sephadex® G50 fine stellt ein im Handel erhältliches Pulver dar, welches man nach Quellung im Becherglas selbst in Säulen packen muss. Die NP sind mit ca. 100-150 nm so groß, dass sie nicht in die Poren eindringen können. Das freie Doxorubicin kann in den Poren verweilen und wird deshalb verzögert eluiert.

Es sollten nunmehr eine Reihe verschiedener Elutionsmittel für die Aufreinigung der Doxorubicin beladenen NP getestet werden. Zur Bestimmung der Beladungskapazität wurden in den Versuchen verschiedene Mengen an Doxorubicin eingesetzt. Die angegebene Menge bezieht sich dabei auf das insgesamt in der Probe vorhandene Doxorubicin, die sowohl freies als auch inkorporiertes und adsorbiertes Doxorubicin beinhaltet. Auch das Verhältnis von freiem und nanopartikulär gebundenem Doxorubicin wurde verändert. Somit entstanden folgende verschiedene Proben, die zum Testen auf die Säulen aufgegeben wurden:

1. 200 µg reines Doxorubicin als Kontrolle
2. 200 µg Doxorubicin als Mischung aus NP und freiem Doxorubicin, wie aus der Herstellung der NP erhalten
3. 200 µg Doxorubicin, davon 100 µg aus der ursprünglichen NP-Suspension und 100 µg reines Doxorubicin zugesetzt
4. 200 µg davon 200 µg aus der ursprünglichen NP-Suspension und 200 µg reines Doxorubicin zugesetzt

Mit dem reinen Doxorubicin sollte dessen Elutionsvolumen ermittelt werden, mit den anderen Proben der Einfluss von Aufgabemenge und Probenzusammensetzung auf das Elutionsverhalten.

Besonderer Bedeutung bei der präparativen Aufreinigung einer NP-Suspension kommt bei der Größenausschlusschromatographie dem Parameter Auflösung zu. Unter Auflösung versteht man ein Maß dafür, wie gut zwei Komponenten voneinander getrennt sind. Unaufgelöste *Peaks* können durch das Vergrößern der

4. Ergebnisse und Diskussion

Effizienz des Trennsystems oder aber durch das Vergrößern der Selektivität besser getrennt werden. Die Selektivität stellt ein Maß für den Retentionsunterschied zweier Komponenten dar. Je größer also der Unterschied im Retentionsvolumen zweier Systeme, desto selektiver das System. Die Effizienz hingegen ist ein Maß für die *Peak*-Verbreiterung einer Komponente. Je schmaler die *Peaks*, desto effizienter das System. Die Auflösung sollte daher ausreichend groß sein ($R \approx 1,5-4$), aber nicht unbedingt so groß wie möglich, um ein optimales Verhältnis zwischen Auflösung und Zeit bzw. Verbrauch des Elutionsmittels zu erhalten.

Die Auflösung ist wie folgt definiert [214], wobei alle Einheiten Volumeneinheiten sind:

$$R_s = 2(V_{R2} - V_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

R_s = Auflösung

V_{R1} = Retentionsvolumen Peak 1

V_{R2} = Retentionsvolumen Peak 2

W_1 = Peakbreite Peak 1

W_2 = Peakbreite Peak 2

Abbildung 4.36 zeigt die Aufreinigung verschiedener NP-Zubereitungen, eluiert mit isotoner Kochsalzlösung. Freies Doxorubicin wurde als Kontrolle ebenfalls eluiert. Zu sehen ist, dass die NP bei Fraktion 4 bereits eluiert werden und das freie Doxorubicin gleich im Anschluss daran folgt. Die Trennung zwischen NP und freiem Doxorubicin war für alle Zubereitungen nicht zufriedenstellend, da die Auflösung R bei etwa 0,9 lag. Außerdem senkte sich die Basislinie nicht wieder auf den Nullwert zwischen den beiden *Maxima* ab. Mit isotoner Kochsalzlösung alleine konnte also keine der Zubereitungen in ausreichendem Maße aufgereinigt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

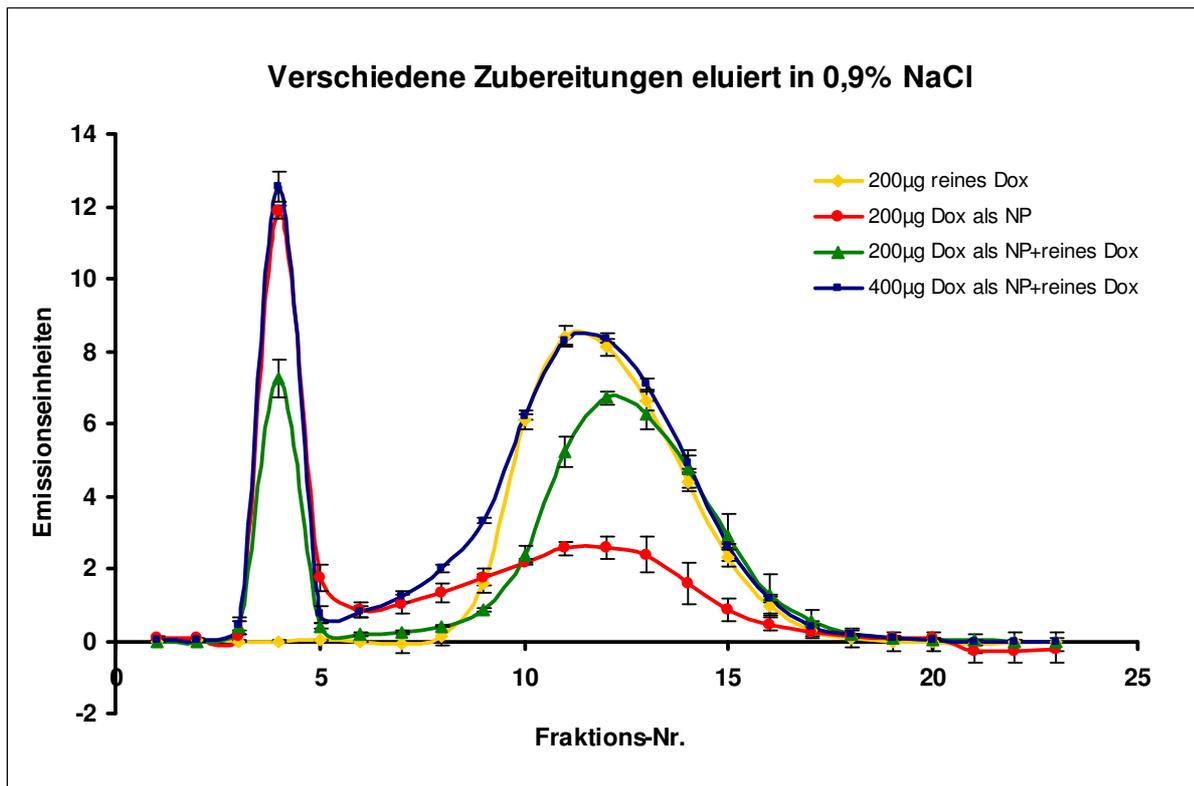


Abbildung 4.36

Größenausschlusschromatogramm erstellt mit Sephadex G50 fine Gel, Elution in 0,9 % NaCl-Lösung

Bei der Elution in isotoner Kochsalzlösung mit 1 % P-80 ergab sich ein sehr ähnliches Bild (Abbildung 4.37). Die Trennung der Zubereitungen mit jeweils 200 µg Gesamtdoxorubicin wies eine mäßig gute Auflösung von etwa $R = 0,9$ auf. Die größere Menge von 400 µg Gesamtdoxorubicin wurde mit einer etwas geringeren Auflösung von 0,85 aufgetrennt. Auch bei dieser Kombination ist die Schärfe der Auftrennung nicht ausreichend. Die Doxorubicin-Peaks sind allerdings etwas schmaler als bei der reinen isotonen Kochsalzlösung und auch die Fluoreszenzintensität ist bei diesem Eluenten im Allgemeinen gegenüber dem vorherigen erhöht.

4. Ergebnisse und Diskussion

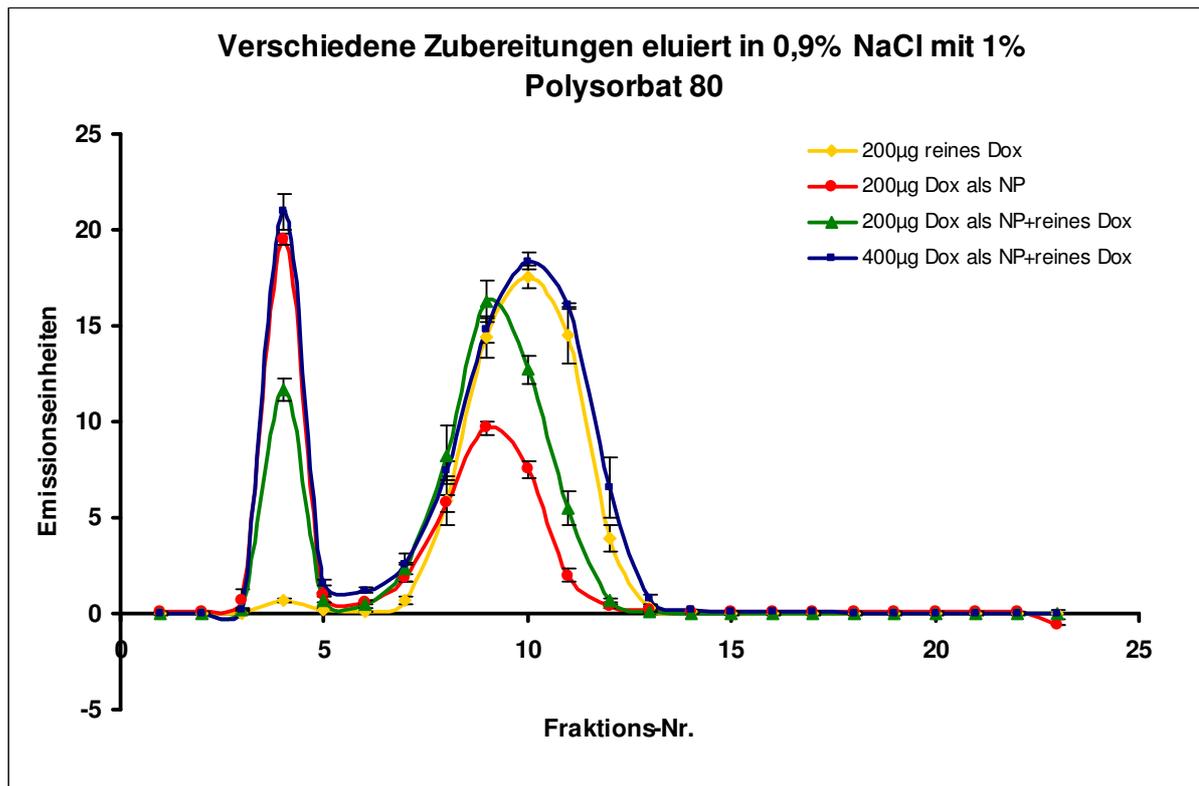


Abbildung 4.37

Größenausschlusschromatogramm erstellt mit Sephadex G50 fine Gel, Elution in 0,9 % NaCl-Lösung mit 1 % Polysorbat-80-Zusatz

Wird reines Wasser als Eluent verwendet (s. Abbildung 4.38), erhält man zwar einen sehr scharfen NP-Peak, allerdings ist der Doxorubicin-Peak stark verändert. Wird ausschließlich reines Doxorubicin eluiert, so erhält man keinen Peak, da das Doxorubicin in reinem Wasser quantitativ am Säulenmaterial adsorbiert. Sobald sich aber etwas Salz in der Lösung befindet, wie es bei den NP-Zubereitungen aufgrund des Herstellungsprozesses der Fall ist, wird zumindest ein kleiner Teil des freien Doxorubicins eluiert. Die Auflösung bewegt sich mit $R = 1,5$ für alle NP-Zubereitungen zwar im mittleren Bereich, doch auch bei diesem Eluenten sinkt die Basislinie zwischen den Peaks nicht zurück auf null. Das freie Doxorubicin wird nur in sehr geringem Maße eluiert. Dies stellt ein Problem dar, denn es wird für spätere Messungen benötigt. Somit ist auch diese Methode alleine nicht geeignet.

4. Ergebnisse und Diskussion

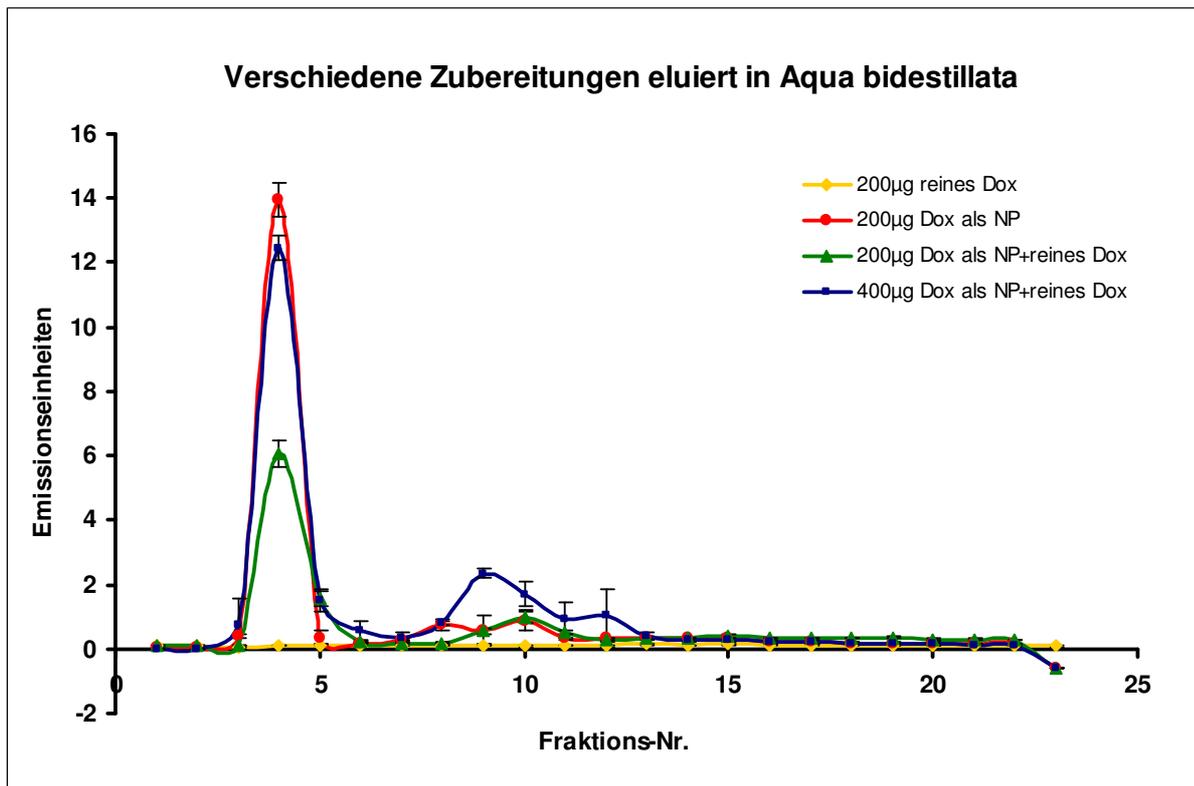


Abbildung 4.38

Größenausschlusschromatogramm erstellt mit Sephadex G50 fine Gel, Elution in Aqua bidestillata

Der folgende Aufreinigungsversuch wurde mit 1 % P-in Wasser durchgeführt (s. Abbildung 4.39). Hierbei ist zunächst sehr auffällig, dass der Doxorubicin-*Peak* ein Doppel-*Peak* ist. Es scheint, als würde durch das P-80 ein Teil des Doxorubicins dahingehend verändert, dass ein zweites, sich mit dem ersten Doxorubicin-*Peak* überschneidendes *Maximum* entsteht. Möglicherweise bilden die beiden Substanzen einen Komplex und werden daher zu unterschiedlichen Zeiten eluiert. Das erste Maximum bei Fraktion 10 entspricht dem „normalen“ Doxorubicin-*Maximum*, welches auch die bisher verwendeten Eluenten zeigen, das zweite folgt später. Dennoch liegt die Auflösung nur bei etwa 0,85 für das erste Doxorubicin-*Maximum*. Die Nanopartikel eluieren konstant in allen Eluenten mit *Maximum* in Fraktion 4. Da auch das eluierte Doxorubicin für die Freisetzungsversuche verwendet werden soll, ist diese Methode auch nicht optimal, da unklar ist, welche Doxorubicin-Produkte von der Säule kommen. Wiederum zu erkennen ist, dass die Fluoreszenzintensität durch den Zusatz von P-80 zum Eluenten deutlich ansteigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

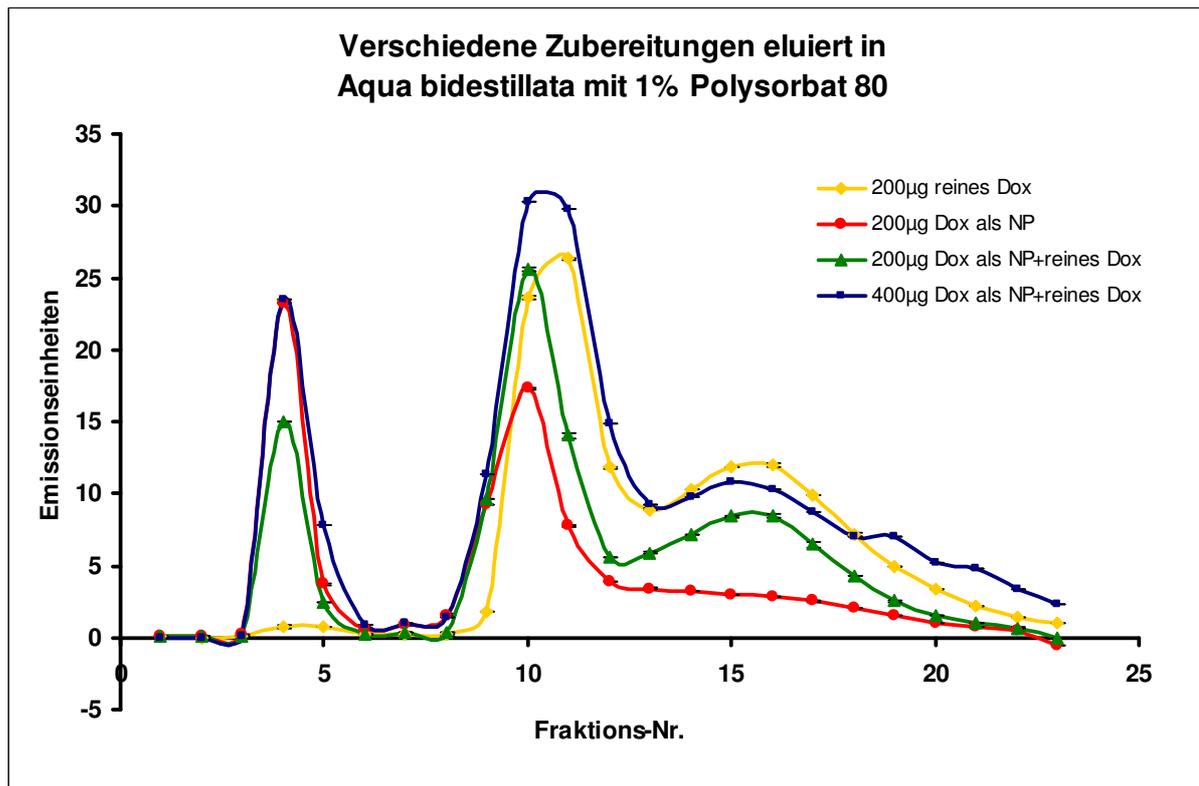


Abbildung 4.39

Größenausschlusschromatogramm erstellt mit Sephadex G50 fine Gel, Elution in Aqua bidestillata mit 1 % P-80

Ein weiterer Eluent, der getestet wurde, war PBS (s. Abbildung 4.40). Dieser Puffer hat einen pH von 7,4, was dem des Blutes entspricht. Die Salzkonzentration entspricht in etwa jener der isotonen Kochsalzlösung. Gegenüber dem reinen Doxorubicin sind alle Doxorubicin-*Peaks* der NP-Zubereitungen stark verbreitert. Die Basislinie sinkt nicht auf den Nullpunkt ab. Auch liegt die Auflösung aller NP-Zubereitungen nur bei etwa 0,75 und ist somit nicht akzeptabel. Die Formen der *Peaks* sind ebenfalls nicht ideal. Insbesondere bei einer Menge von 400 µg Gesamtdoxorubicin fällt der NP-*Peak* kleiner aus als erwartet, müsste er doch etwa so hoch sein wie bei der Zubereitung aus NP-Rohprodukt ohne zugesetztes Doxorubicin. Des Weiteren ist festzustellen, dass die *Peaks* aller NP-Zubereitungen direkt ineinander übergehen. Sämtliche Zubereitungen, denen noch freies Doxorubicin zugesetzt wurde, weisen kaum eine Trennung der *Peaks* auf.

4. Ergebnisse und Diskussion

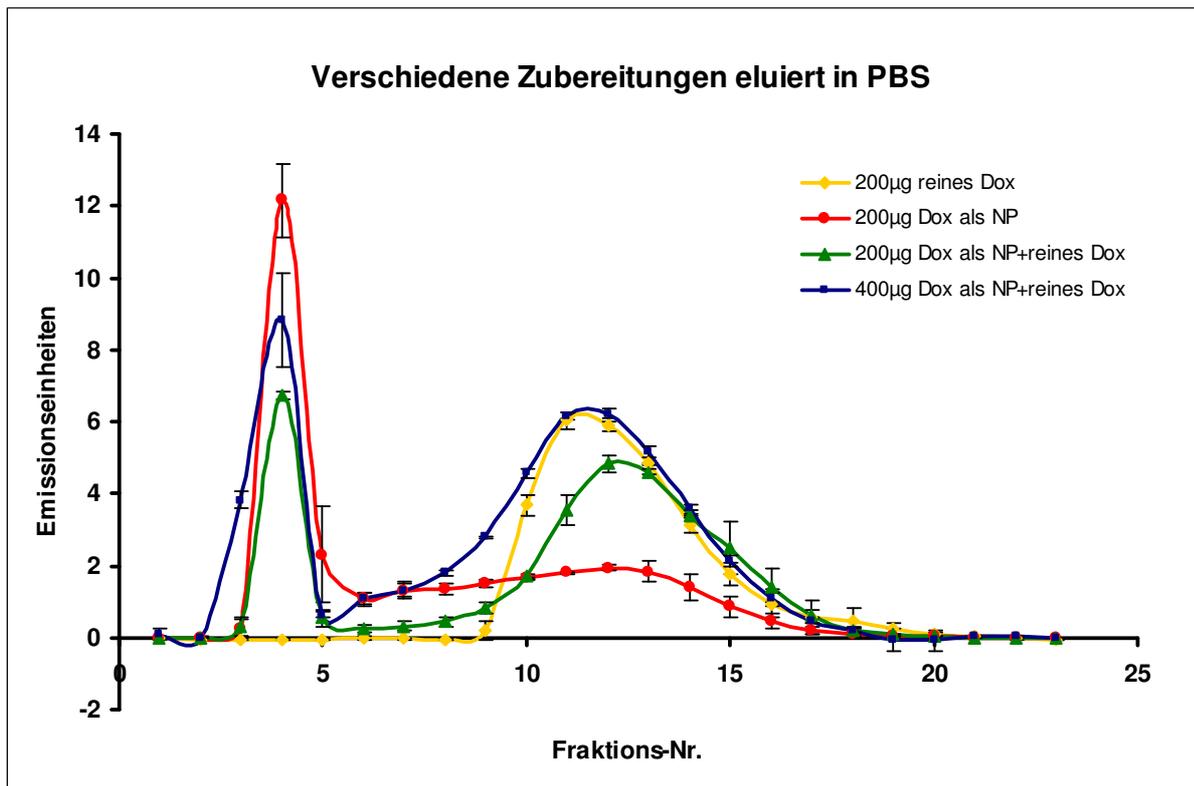


Abbildung 4.40

Größenausschlusschromatogramm erstellt mit Sephadex G50 fine Gel, Elution in PBS

In einem letzten Versuch wurde der Puffer PBS mit dem Zusatz von 1 % P-80 versehen (s. Abbildung 4.41). Zu erkennen ist, dass die *Peaks* eine schöne symmetrische Form aufweisen und dass die Doxorubicin-*Peaks* im Vergleich zu den anderen Eluenten eher schmal sind. Das Phänomen des Doxorubicin-Doppel-*Peaks* trat nur bei der Kombination P-80 und bidestilliertem Wasser auf. Auffällig ist hier, dass bei der Zubereitung mit 400 µg Gesamtdoxorubicin der Peak später kommt als bei den anderen Zubereitungen und dass er breiter ist. Dies liegt vermutlich in der hohen aufgetragenen Menge begründet. Auch hier liegt die Fluoreszenzintensität wieder so hoch wie bei den anderen Eluenten mit P-80-Zusatz.

Die Auflösung liegt für die NP-Proben mit 200 µg Gesamtdoxorubicin bei etwa 1 und bei der Probe mit 400 µg bei etwa 1,1. Die Auflösung liegt daher auch hier nicht in einem idealen Bereich, sodass sich auch dieser Eluent alleine nicht zur Aufreinigung eignet.

4. Ergebnisse und Diskussion

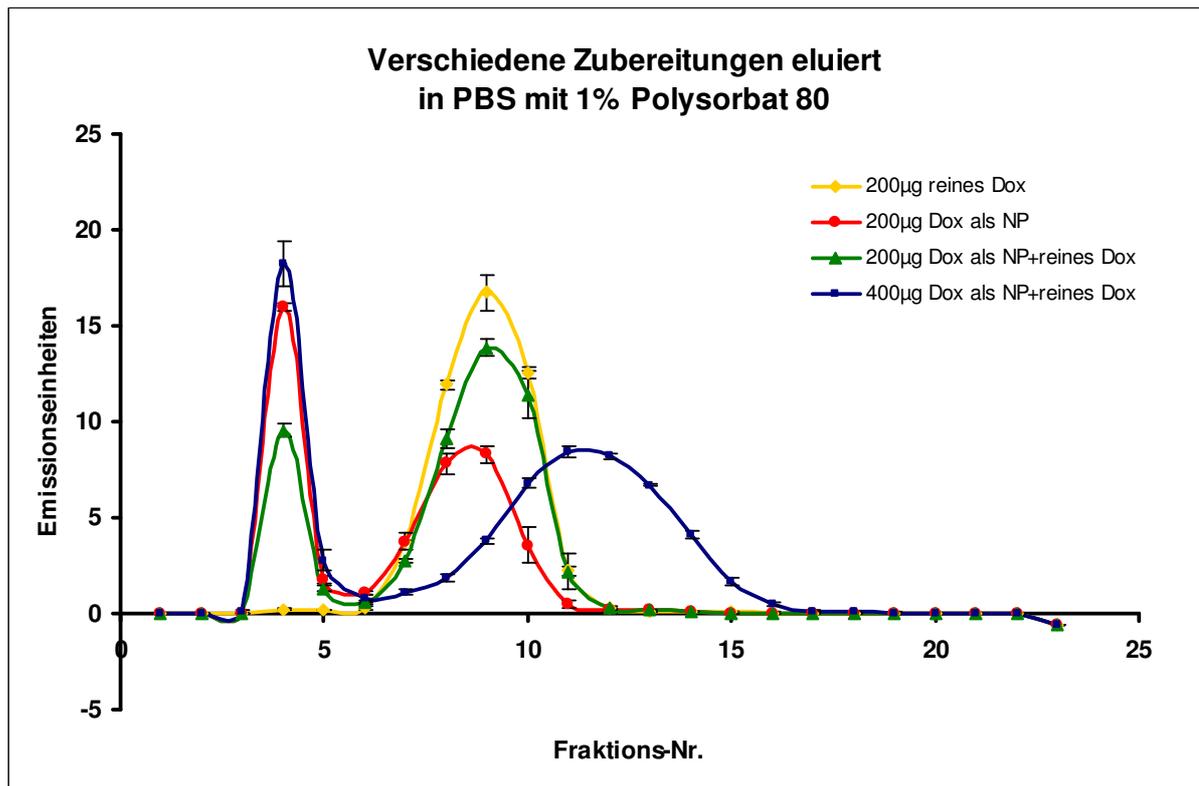


Abbildung 4.41

Größenausschlusschromatogramm erstellt mit Sephadex G50 fine Gel, Elution in 0,9 % PBS mit 1 % P-80

Die mit unterschiedlichen Eluenten durchgeführten Tests ergaben aufgrund der schlechten Auflösungen, dass keiner der erprobten Eluenten alleine verwendet werden kann, um die NP aufzureinigen. Aus dieser Erkenntnis heraus entstand die Idee, eine Kombination zweier Eluenten zu wählen. Der Umstand, dass freies Doxorubicin nicht mit reinem Wasser von der Säule eluiert werden kann, legte nahe, die Auflösung selbst zu bestimmen. Hierzu wurden zuerst die NP mit Wasser eluiert und anschließend das freie Doxorubicin mit einem salzhaltigen Eluenten. Der Zusatz von P-80 führte insgesamt zu einer Verschmälerung des Peaks und zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Dennoch fiel die Wahl auf 0,9 % NaCl-Lsg als Eluenten für das reine Doxorubicin, da es wünschenswert ist, möglichst wenig verschiedene Komponenten in die Aufreinigung mit einzubeziehen. Außerdem war nicht hinreichend geklärt, welchen Einfluss das P-80 auf den Aufreinigungsprozess hat und ob es sich an die einzelnen Komponenten anlagert.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die endgültige Aufreinigungsmethode für die NP bestand nun in einer Kombination aus bidestilliertem Wasser und isotoner Kochsalzlösung (s. Abbildung 4.42). Es wurde eine Gesamtmenge von 400 µg Gesamtdoxorubicin als NP-Rohprodukt ohne Doxorubicin-Zusatz auf die Säule aufgegeben. Im Anschluss daran wurde mit 44 ml bidestilliertem Wasser und dann mit 44 ml 0,9 % Kochsalzlösung eluiert. Der kleine *Peak* direkt neben dem NP-*Peak* in Fraktion 4 entspricht einer geringen Menge an freiem Doxorubicin, welches aufgrund der in der NP-Zubereitung vorhandenen Salze eluiert wurde. Ab Fraktion 28 begann die Elution des freien Doxorubicins. Die Auflösung zwischen den beiden Haupt-*Peaks* ist in diesem Fall mit einem Wert von 3,86 mehr als ausreichend. Diese Trennmethode wurde von da an standardmäßig zur den Freisetzungsexperimenten vorgeschalteten Aufreinigung der Doxorubicin-NP verwendet.

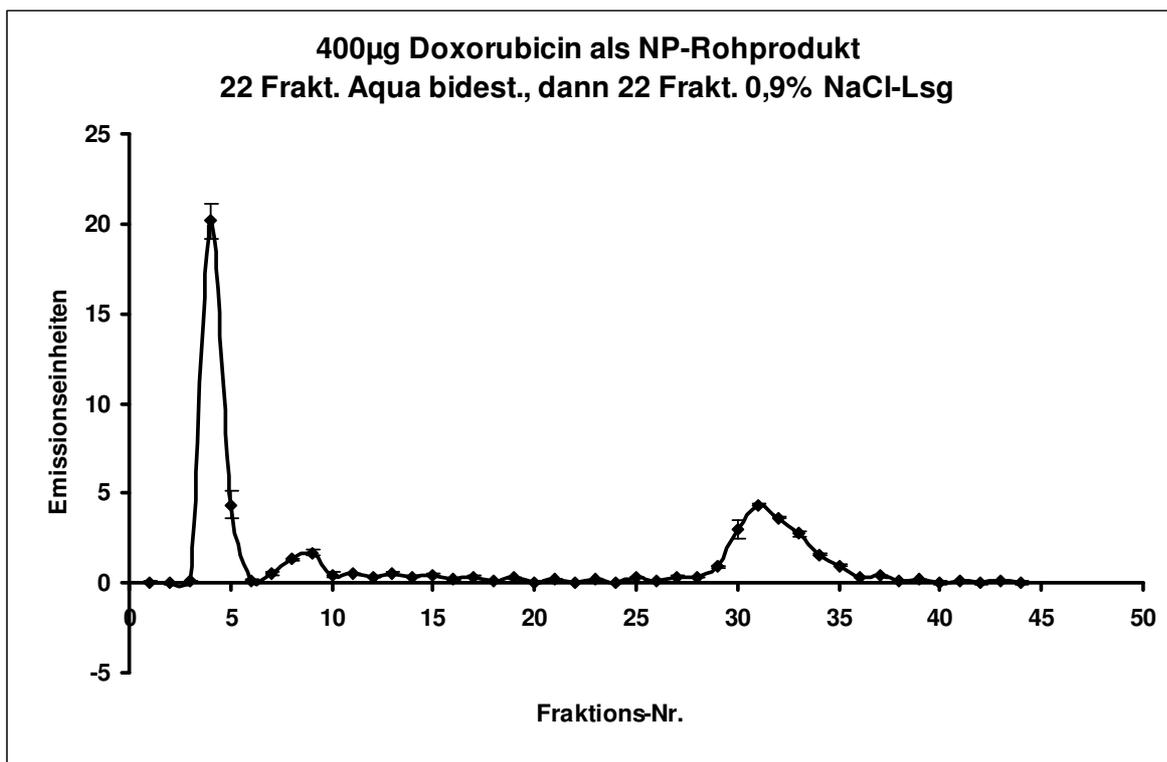


Abbildung 4.42

Größenausschlusschromatogramm erstellt mit der endgültigen Aufreinigungsmethode mit Sephadex® G50 fine: Zunächst Elution mit Aqua bidestillata, anschließend mit 0,9 % NaCl-Lösung

4. Ergebnisse und Diskussion

Um zu überprüfen, ob alles mit den NP assoziierte Doxorubicin abgetrennt war, wurden die NP Fraktionen nochmals auf die gleiche Weise rechromatographiert (s. Abbildung 4.43). Es ist deutlich zu erkennen, dass noch immer eine gewisse Menge an freiem Doxorubicin eluiert wird. Somit sind Rechromatographien unerlässlich, um gänzlich aufgereinigte NP zu erhalten. Da bei der ersten Rechromatographie noch freies Doxorubicin von der Säule eluierte, wurde noch eine zweite Rechromatographie nachgeschaltet. Hierbei wurden die NP-Fraktionen der ersten Rechromatographie auf eine Säule aufgegeben (s. Abbildung 4.44). Nun ist deutlich zu erkennen, dass kein freies Doxorubicin mehr im Eluat vorhanden war. Die NP sind nach der ersten Rechromatographie vollständig aufgereinigt. Somit wurden die NP zur Aufreinigung immer einmal rechromatographiert.

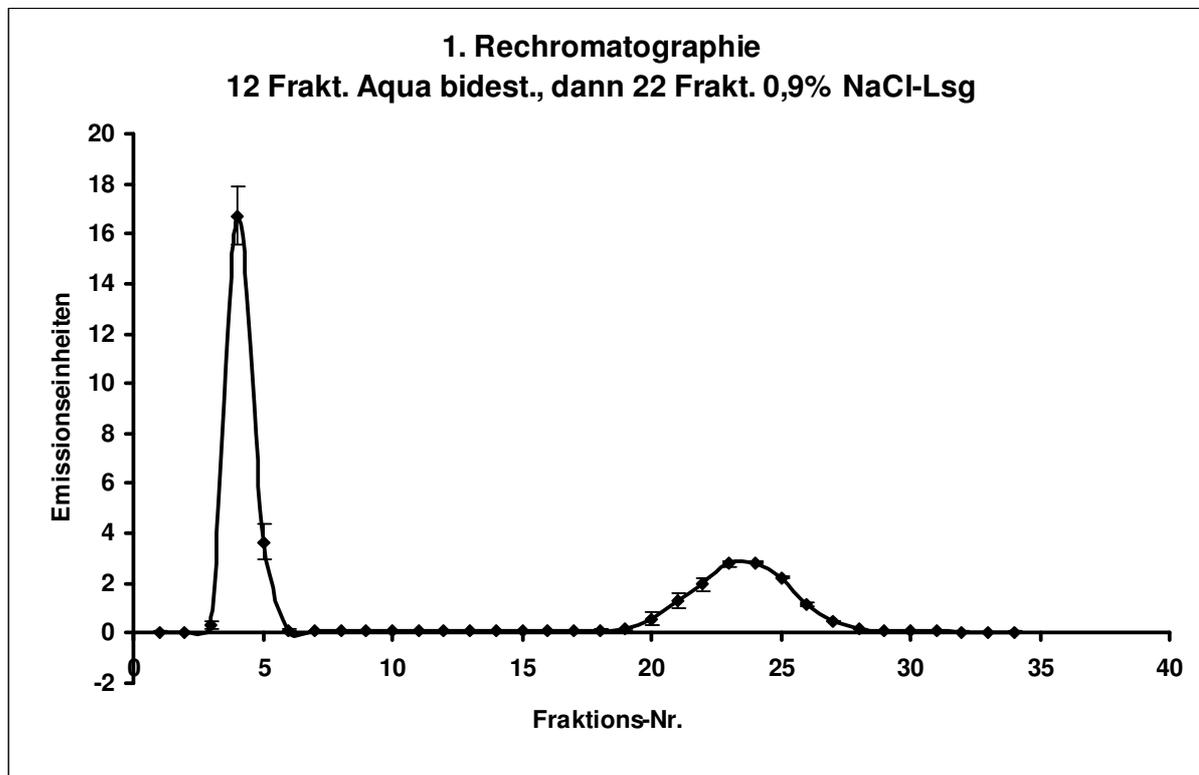


Abbildung 4.43

Größenausschlusschromatogramm der ersten Rechromatographie der NP-Fraktionen von Abbildung 4.42

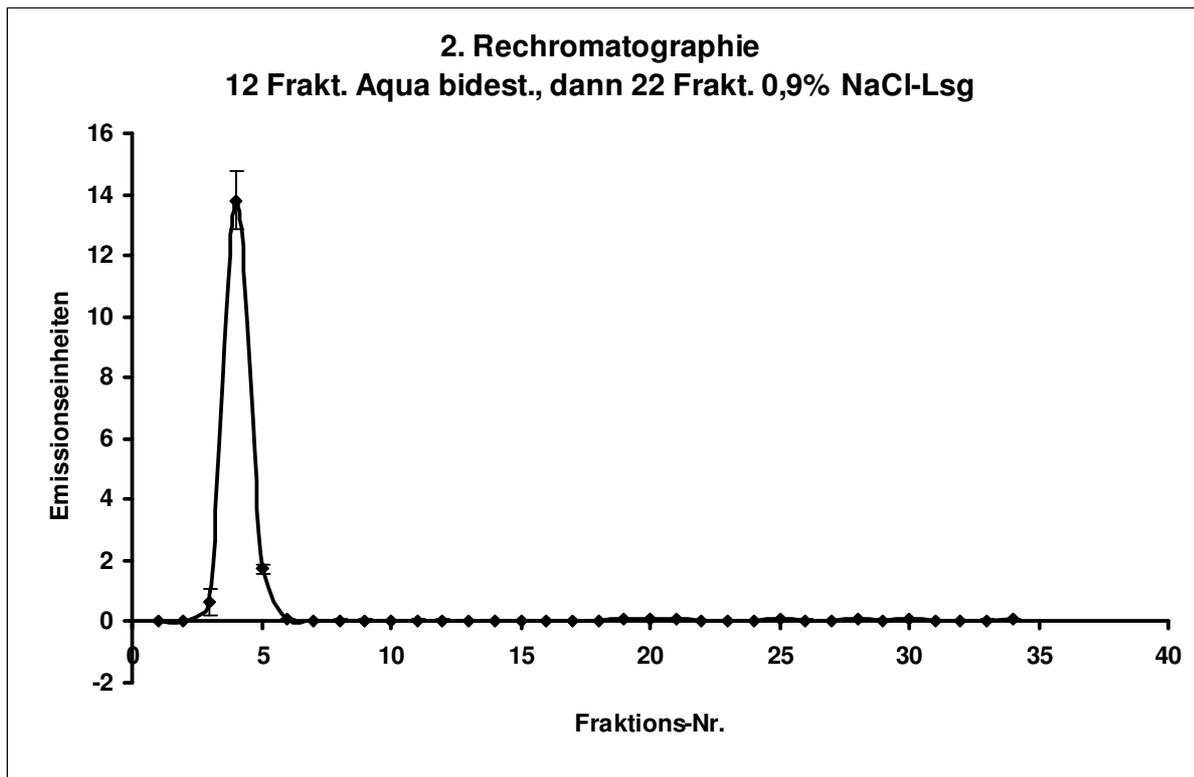


Abbildung 4.44

Größenausschlusschromatogramm der 2. Rechromatographie der NP-Fractionen von
Abbildung 4.43

4.3.1.1.2 PD Midi Trap G10 Fertigsäulen

Da bei den Freisetzungsversuchen das reine freigesetzte Doxorubicin aus den aufgereinigten NP untersucht werden sollte, war noch eine weitere Methode zu entwickeln, um die NP zu bestimmten Zeitpunkten des Freisetzungsversuches aufzureinigen. Mit dem Ziel, das freigesetzte Doxorubicin quantitativ bestimmen zu können, sollten aufgrund der analytischen Anwendung kleinere Säulen verwendet werden. Dazu wurden PD Midi Trap G10 Fertigsäulen verwendet, die kleinere Dimensionen besitzen und ein anderes Trenngel (Sephadex[®] G10 medium) enthalten, welches eine Ausschlussgröße von $M_r = 700$ besitzt. Doxorubicin sollte mit einer molaren Masse von $M_r = 543,5$ in der Lage sein, in die Poren des Gels einzudringen und auf diese Weise von den NP separiert zu werden. Eluiert man aber reines Doxorubicin mit isotoner Kochsalzlösung in einer solchen Fertigsäule, zeigt sich, dass Doxorubicin bereits ab der ersten Fraktion eluiert wird (s. Abbildung 4.46). Vermutlich liegt die molekulare Masse des Doxorubicins zu nahe an der Ausschlussgröße des Gels und möglicherweise führt auch die Stäbchenform des

4. Ergebnisse und Diskussion

Moleküls dazu (s. Abbildung 4.45), dass es nicht in die Poren des Gels eindringen kann. Die Elution wurde bei diesen Bedingungen auch mit geringeren Doxorubicinmengen getestet, um eine Überlastung der Kapazität der Säule auszuschließen. Jedoch änderte die Reduktion der aufgegebenen Masse nichts am Elutionsverhalten.

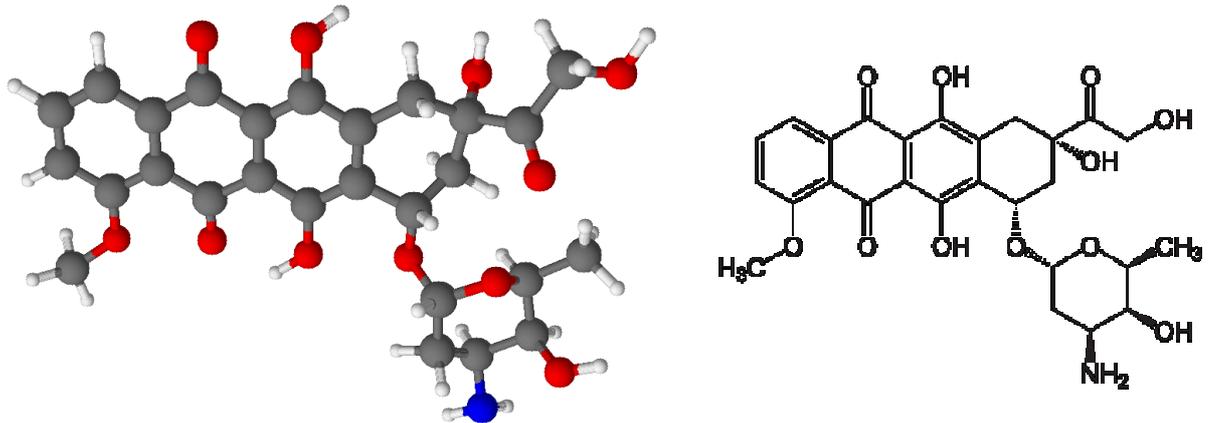


Abbildung 4.45

Links: 3D-Darstellung von Doxorubicin aus [215], rechts: Strukturformel des Doxorubicin

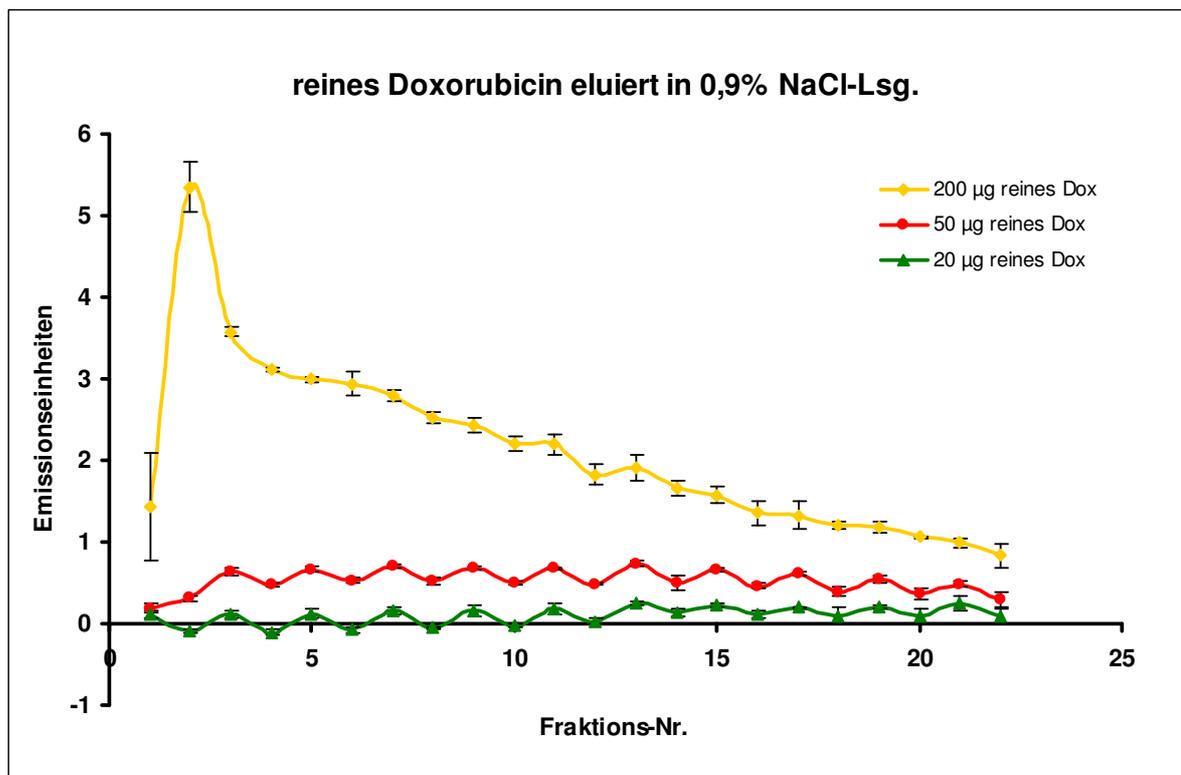


Abbildung 4.46

Größenausschlusschromatogramm der Elution verschiedener Doxorubicin-Konzentrationen in 0,9 % NaCl-Lösung unter Verwendung von PD-Midi Trap G10 Fertigsäulen

4. Ergebnisse und Diskussion

Bei der Elution von verschiedenen NP-Proben in isotoner Kochsalzlösung mit 1 % P-80-Zusatz bestätigten sich wiederum die Beobachtungen, die mit reinem Doxorubicin gemacht wurden: Es kann nicht zwischen NP-*Peak* und Doxorubicin-*Peak* unterschieden werden, da das freie Doxorubicin ebenfalls sofort von der Säule eluiert wird. Auch eine Reduktion der Gesamtmenge an aufgetragenem Doxorubicin führt nicht zu einer Verbesserung des Elutionsprofils (s. Abbildung 4.47). Auch durch Zusatz von P-80 lässt sich keine Verbesserung erzielen. Die peakverkleinernde Eigenschaft, die im Kapitel zuvor festgestellt wurde, kommt hier nicht zum Tragen.

Eluiert man hingegen mit reinem bidestilliertem Wasser (s. Abbildung 4.48), so verhält sich das Material wie das Sephadex[®] G50 fine. Das gesamte Doxorubicin verbleibt auf der Säule (optisch deutlich sichtbar) und nur die NP werden eluiert. Somit findet in diesem Fall eine Trennung der beiden Komponenten aufgrund der massiven Adsorption des freien Doxorubicins an das Säulenmaterial statt. Wendet man nunmehr die in Kapitel 4.3.1.1 beschriebene und zur präparativen Aufreinigung verwendete Methode bei diesen Fertigsäulen an, so erfolgt eine Trennung von NP und freiem Doxorubicin mit ausreichend hoher Auflösung. Aufgrund der schleichenden Elution des freien Doxorubicins kann dieses jedoch nur schlecht quantifiziert werden. Schon bei einer Menge von etwa 20 µg, was in einem Freisetzungsexperiment bereits einer höheren freigesetzten Menge entspräche, befindet man sich aufgrund des Elutionsverhaltens und der damit verbundenen Verdünnung an der Erfassungsgrenze des Fluoreszenzplattenlesers (Detektionsgrenze = 200 ng/ml). Auch die Dauer der Chromatographie würde sich verlängern, da in diesem Experiment selbst nach Beendigung des Versuchs der Nullwert noch nicht erreicht ist.

Als Fazit lässt sich sagen, dass diese Säulen aufgrund der Eigenschaften ihres Trenngels nicht für die hier benötigte Anwendung geeignet waren. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Säulentyp getestet.

4. Ergebnisse und Diskussion

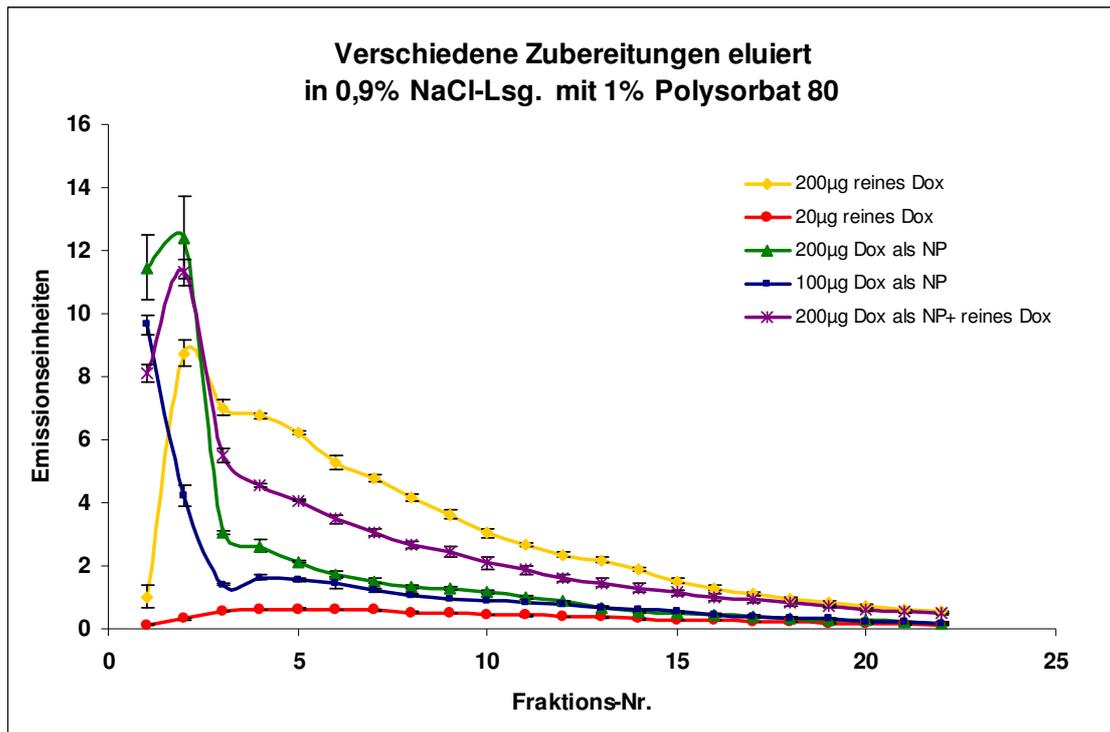


Abbildung 4.47

Größenausschlusschromatogramm der Elution verschiedener Proben in 0,9 % NaCl-Lösung mit 1 % P-80 unter Verwendung von PD-Midi Trap G10 Fertigsäulen

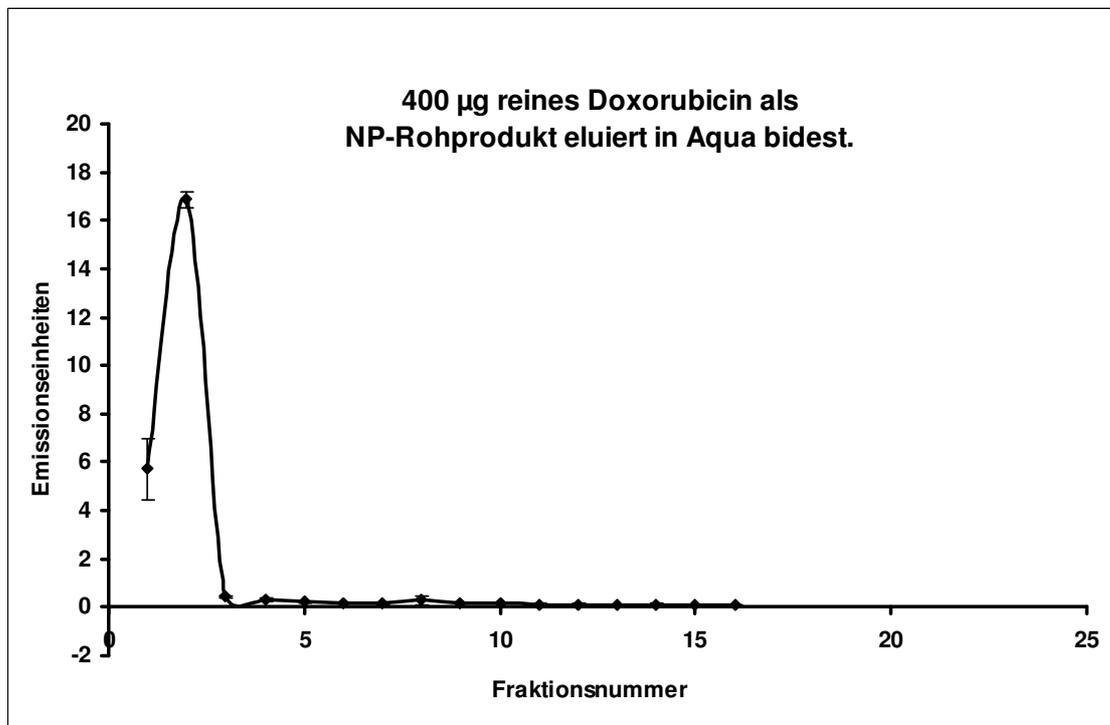


Abbildung 4.48

Größenausschlusschromatogramm der Elution von 400 µg Gesamtdoxorubicin als NP-Zubereitung in bidestilliertem Wasser

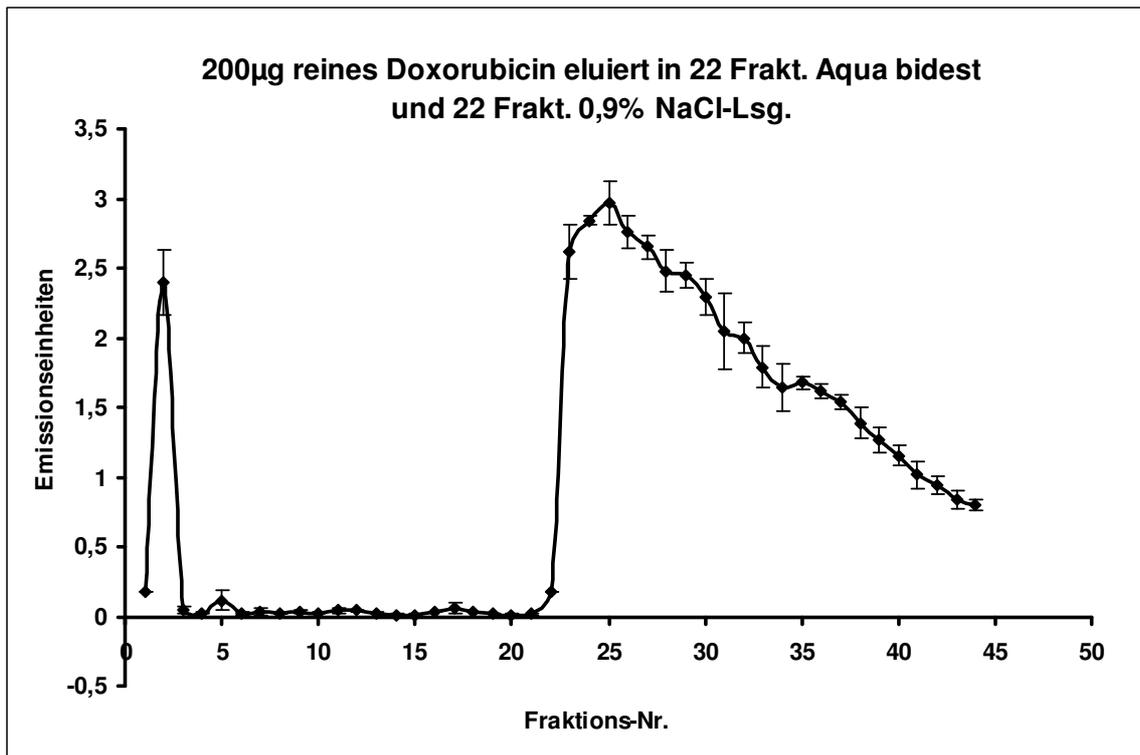


Abbildung 4.49

Größenausschlusschromatogramm der Elution von 200 µg Doxorubicin als NP-Rohprodukt mit der für Sephadex G50 festgelegten Aufreinigungsmethode

4.3.1.1.3 PD 10 Desalting Fertigsäulen

Die nunmehr verwendeten Fertigsäulen waren mit dem Material Sephadex[®] G25 Medium gepackt. Die Ausschlussgröße betrug hierbei $M_r = 5000$. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass das freie Doxorubicin mit einer M_r von 543,5 in die Poren des Gels eindringen kann. Um die Experimente zu vereinfachen, wurden stets 200 µg Gesamtdoxorubicin aufgetragen, entweder als reines Doxorubicin oder in Form von NP-Rohprodukt.

Die ersten Untersuchungen mit diesen Fertigsäulen wurden mit Aqua bidestillata als Eluenten durchgeführt, da dieser Eluent Bestandteil der bisher entwickelten Aufreinigungsmethoden war. Wiederum zeigt sich, dass das freie Doxorubicin quantitativ am Säulenmaterial adsorbiert und nicht eluiert wird (s. Abbildung 4.50), wie bereits bei anderen Säulenmaterialien festgestellt wurde. Aufgrund der Tatsache, dass alle Säulenmaterialien quervernetzte Dextrane darstellen [Produktinformation der Firma GE Healthcare], war dieses Verhalten zu erwarten. Die NP werden

aufgrund der kleineren Säule bereits in Fraktion 2 mit einem leichten *Tailing* des *Peaks* eluiert.

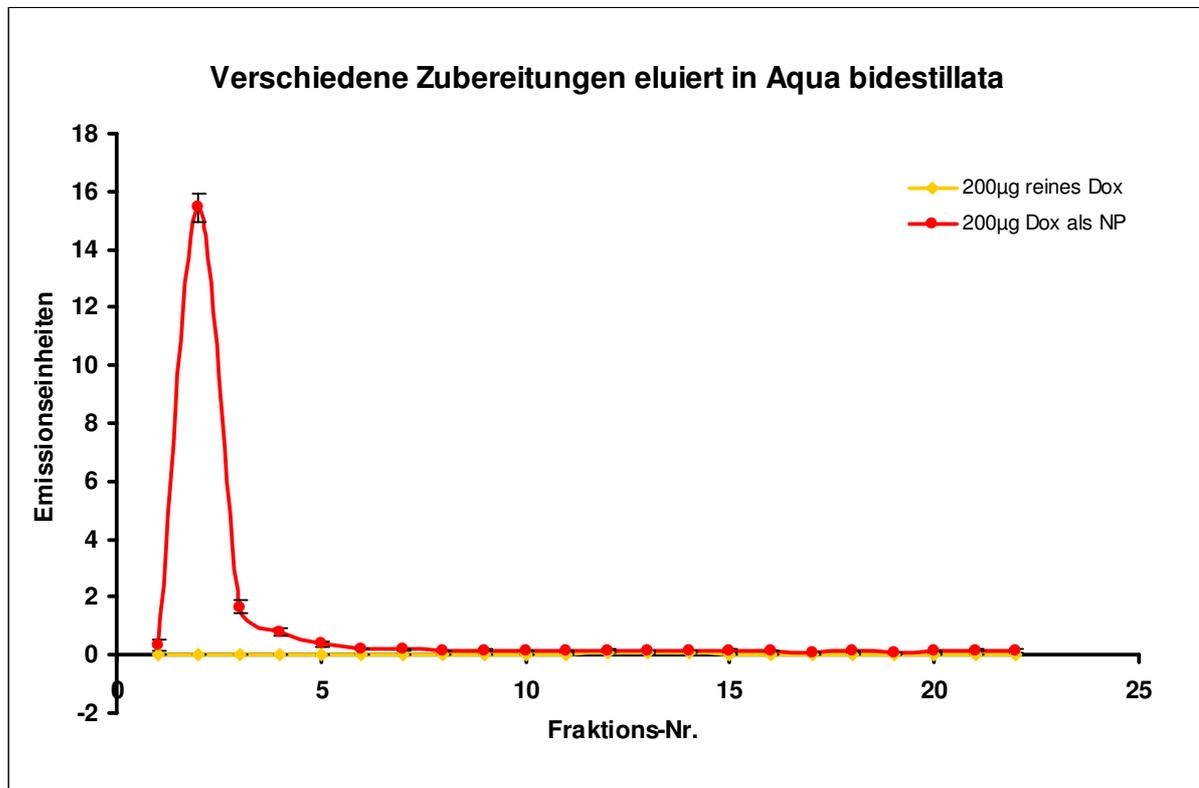


Abbildung 4.50

Größenausschlusschromatogramm erstellt unter Verwendung von PD-10 Desalting Säulen, Elution von reinem Doxorubicin und NP-Rohprodukt in bidestilliertem Wasser

Eluiert man die beiden Zubereitungen in Kochsalzlösung, so bestätigen sich frühere Ergebnisse mit Sephadex G50 fine. Es findet bei der NP-Formulierung keine ausreichende Trennung zwischen NP und freiem Doxorubicin statt, das freie Doxorubicin wird jedoch als Peak eluiert, wenn auch mit *Tailing*. Am Ende der Elution ist der Nullwert erreicht. Es wird kein weiteres freies Doxorubicin mehr eluiert (s. Abbildung 4.51).

4. Ergebnisse und Diskussion

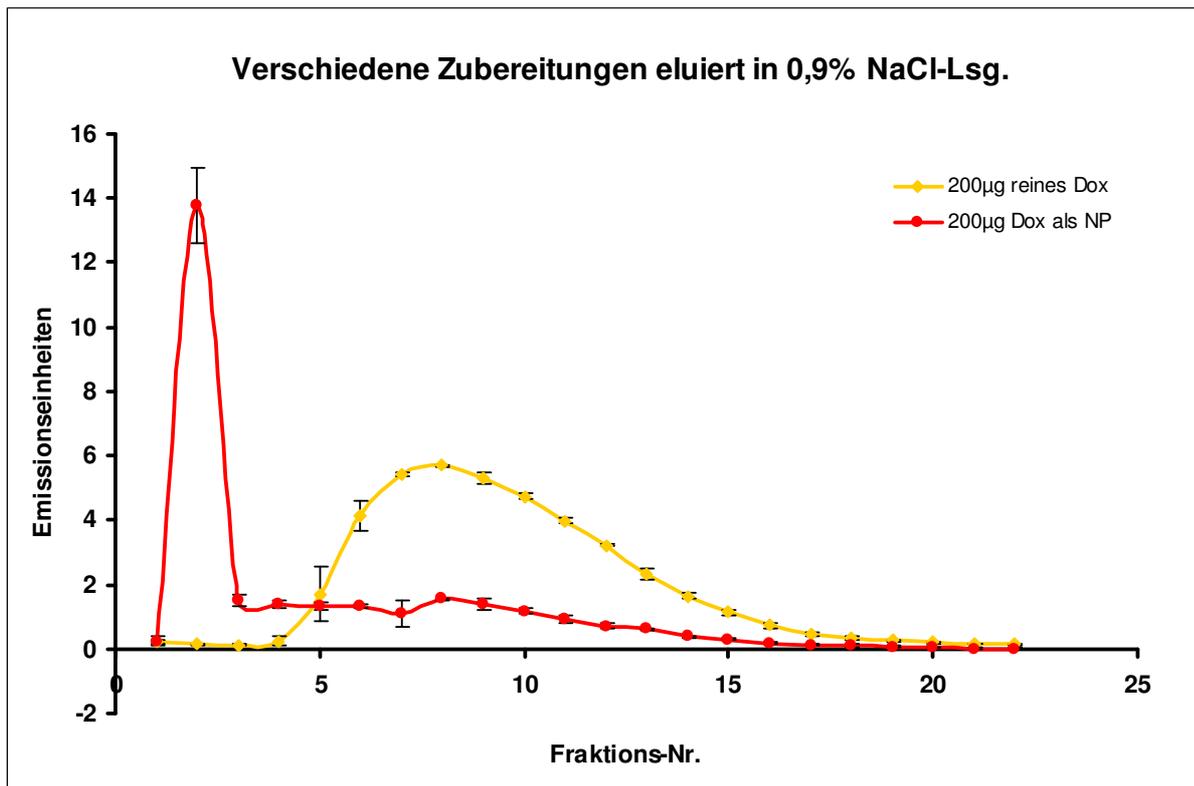


Abbildung 4.51

Größenausschusschromatogramm erstellt unter Verwendung von PD-10 Desalting Säulen, Elution von reinem Doxorubicin und NP-Rohprodukt in isotoner Kochsalzlösung

Der Peak des reinen Doxorubicins war sehr breit und zeigte ein deutliches *Tailing*. Daher wurde versucht, die Effizienz des Systems mit einer höheren Salzkonzentration zu steigern. Zu diesem Zweck wurde eine 3 %ige Kochsalzlösung verwendet. Die Überlegung dabei war, dass möglicherweise aufgrund der höheren Salzkonzentration die Moleküle des freien Doxorubicins kompetitiv durch die Salzionen aus den Poren des Gels verdrängt werden und es dadurch zu einer schnelleren und homogeneren *Peak*-Form kommt. Es zeigte sich aber, dass sich die Form des *Peaks* veränderte sich nur unmerklich veränderte und auch die Auflösung konnte nicht positiv beeinflusst werden (s. Abbildung 4.52) Ein Versuch mit PBS als Eluent führte ebenfalls zu keinem anderen Ergebnis (s. Abbildung 4.53).

4. Ergebnisse und Diskussion

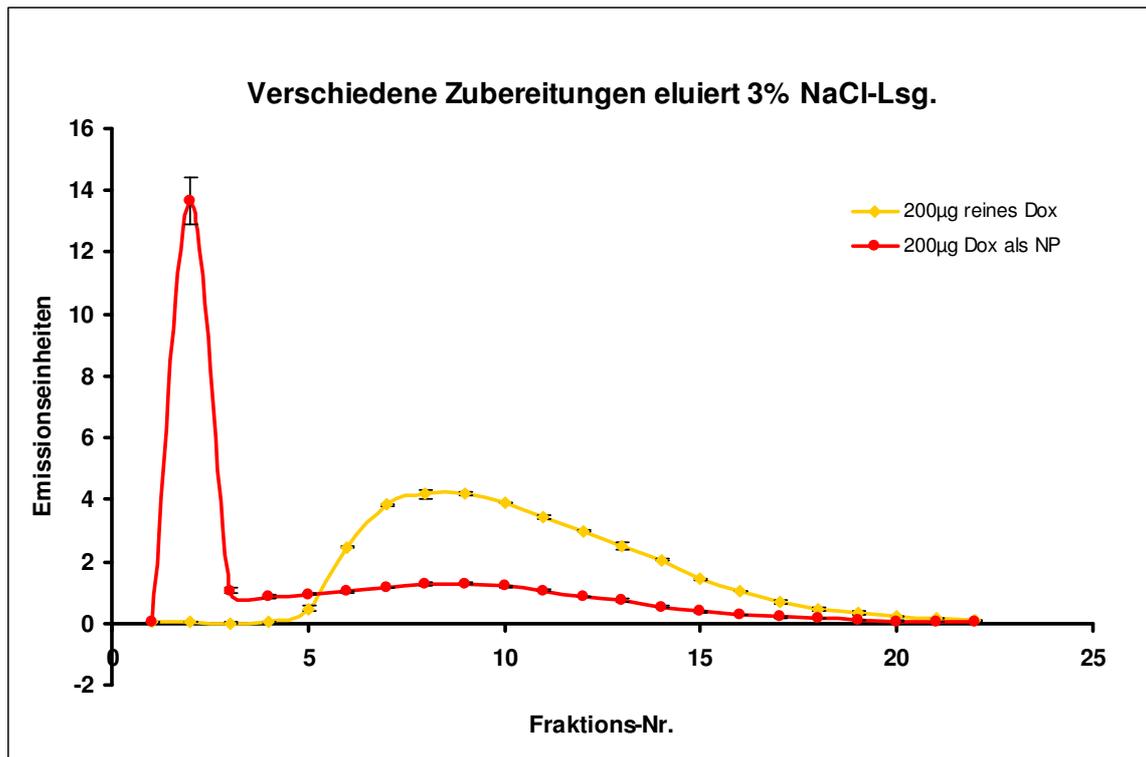


Abbildung 4.52

Größenausschlusschromatogramm erstellt unter Verwendung von PD-10 Desalting Säulen, Elution von reinem Doxorubicin und NP-Rohprodukt in 3 %iger Kochsalzlösung

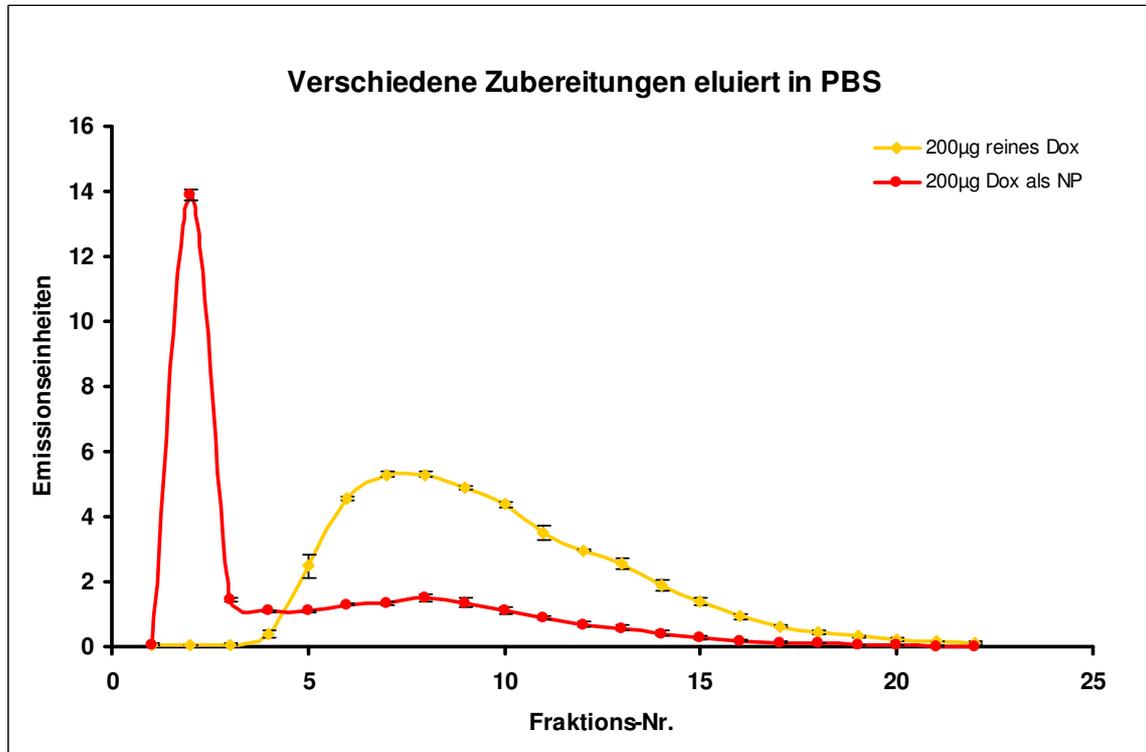


Abbildung 4.53

Größenausschlusschromatogramm erstellt unter Verwendung von PD-10 Desalting Säulen, Elution von reinem Doxorubicin und NP-Rohprodukt in PBS

4. Ergebnisse und Diskussion

Das P-80 hatte bei vorangegangenen Experimenten peakverkleinernde Eigenschaften gezeigt. Daher wurde sein Einfluss auf die Trenneigenschaften auch bei diesem Säulentyp untersucht (s. Abbildung 4.54). Wurde P-80 in einer Konzentration von 1 % in isotoner Kochsalzlösung eingesetzt konnte eine gewisse Verschmälerung des *Peaks* (um 3 Fraktionen) wie auch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Die Auflösung hatte sich jedoch dadurch nicht erheblich verbessert und die Maxima überschneiden sich.

Die Wahl des endgültigen Eluenten für die Aufreinigung fiel auf die Kombination aus bidestilliertem Wasser und 0,9 % NaCl-Lsg, da es wünschenswert ist, möglichst wenig verschiedene Komponenten in die Aufreinigung mit einzubeziehen. Welchen Einfluss das P-80 auf den Aufreinigungsprozess hat und ob es sich an die einzelnen Komponenten anlagert, war noch immer nicht hinreichend geklärt.

Somit wurde die präparative Aufreinigungsmethode auch für die analytische Aufreinigung mit den hier verwendeten Säulen verwendet.

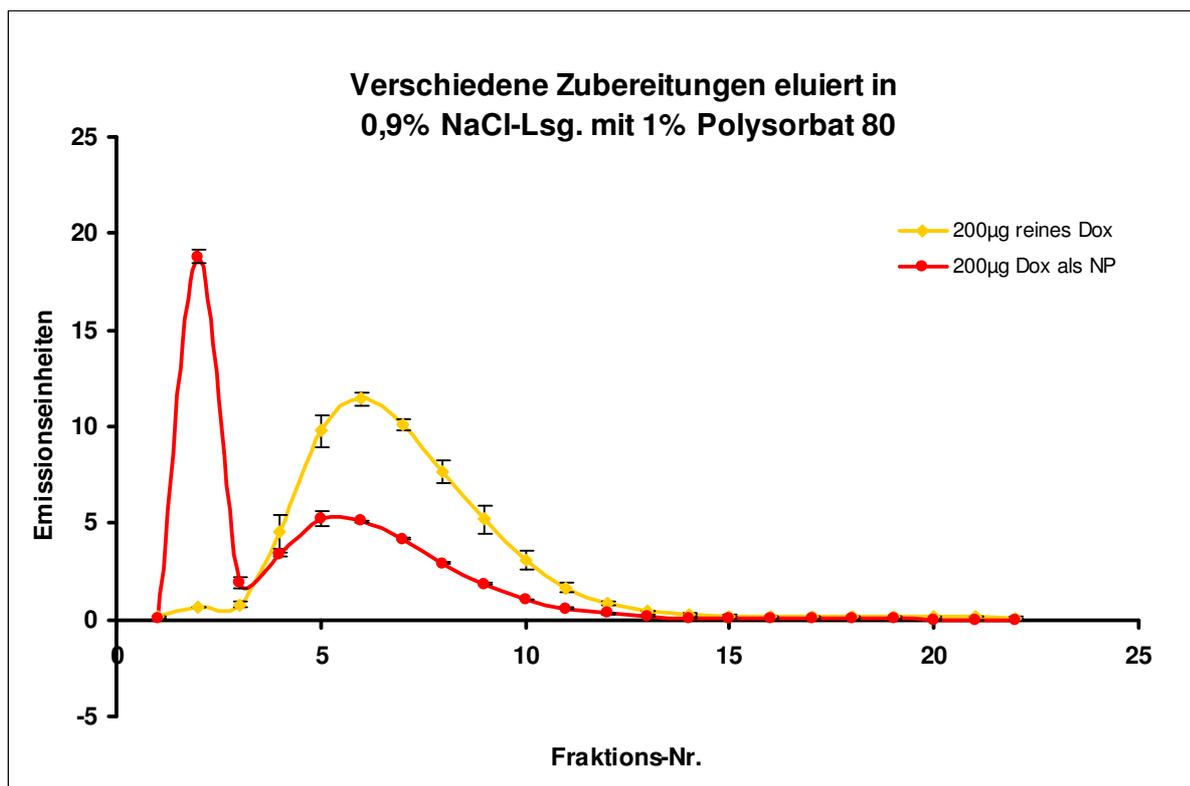


Abbildung 4.54

Größenausschlusschromatogramm erstellt unter Verwendung von PD-10 Desalting Säulen, Elution von reinem Doxorubicin und NP-Rohprodukt 0,9 % NaCl-Lsg. mit 1 % P-80

Verwendet man nun die gleiche Eluentenzusammensetzung wie bei der präparativen Aufreinigung, so ergibt sich ein sehr ähnliches Bild (s Abbildung 4.42). Die Auflösung ist groß genug, allerdings ist der Doxorubicin-*Peak* relativ breit. In den 22 Fraktionen mit Kochsalzlösung wird das Doxorubicin dennoch vollständig eluiert.

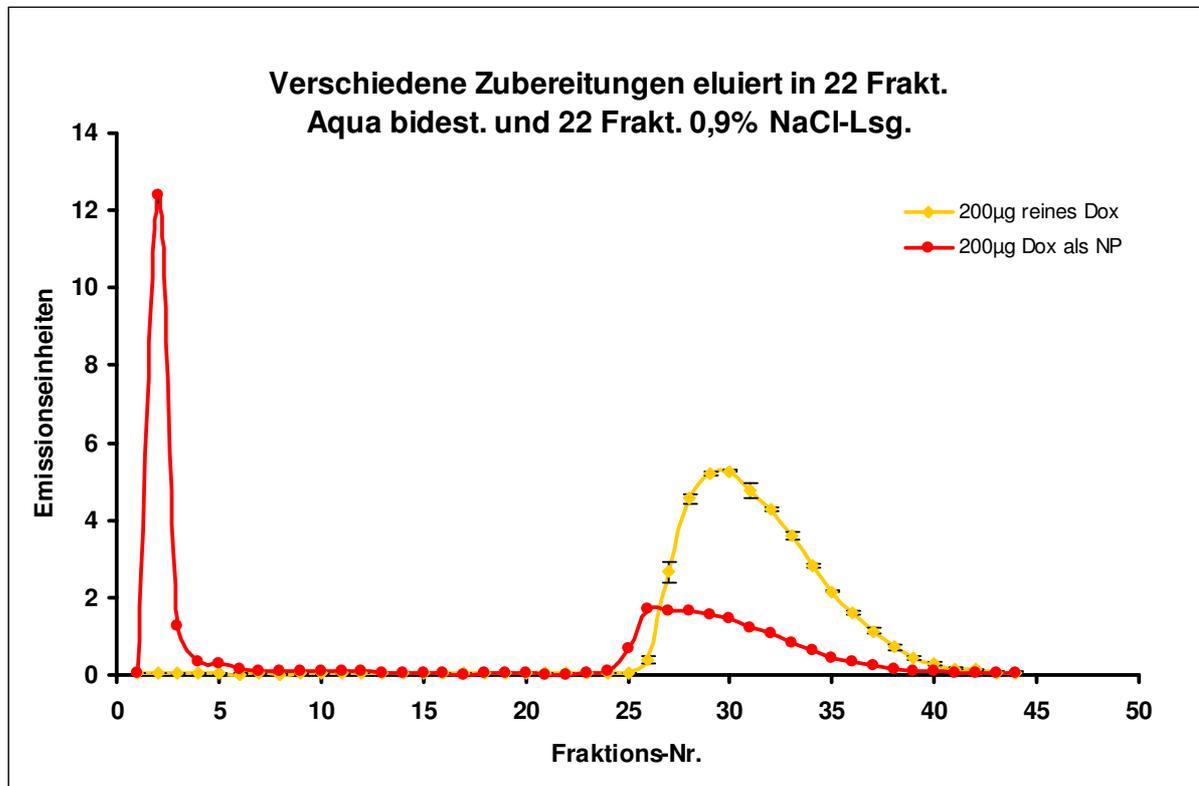


Abbildung 4.55

Größenausschlusschromatogramm der endgültigen Aufreinigung der NP mit den PD 10 Desalting Columns, gleiche Eluentenkombination wie bei der präparativen Aufreinigung der NP

4.3.1.2 Stabilitätsuntersuchungen reines Doxorubicin bei pH 5 und pH 7,4

Zunächst sollte die Dauer der Freisetzungsexperimente aus aufgereinigten NP festgesetzt werden. Zu diesem Zweck wurde die Stabilität gering konzentrierter Doxorubicin-Lösungen unter den folgenden Bedingungen getestet. Doxorubicin wurde in bestimmten Konzentrationen in Puffer bei pH 5 und in PBS bei pH 7,4 bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der relativen Fluoreszenzabnahme.

4. Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 4.56 stellt die Inkubation verschiedener Doxorubicin-Konzentrationen (0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml) in einem Na-Acetat-Puffer bei pH 5 dar. Die Inkubation erfolgte bis hin zu 24 h. Die geringste Konzentration von 0,3 µg/ml wies sehr starke Schwankungen bei den unterschiedlichen Zeitpunkten auf. Schon nach 1 h konnten nur noch 72 % gemessen werden, während nach 24 h der Fluoreszenzwert wieder auf etwa 80 % anstieg. Die Schwankungen sind möglicherweise auf die Erfassungsgrenze des Fluoreszenz-Plattenlesers zurückzuführen. Nach 6h wie auch nach 24 h sind noch etwa 80 % der Fluoreszenz des ursprünglich eingesetzten Doxorubicins vorhanden. Die Konzentration von 3 µg/ml an Doxorubicin unterlag geringeren Schwankungen und die Standardabweichung war kleiner. Allerdings nimmt die Fluoreszenz bei allen Konzentrationen nach ca. 24 h um etwa 20 % ab. Bis 6 h verhält sich die Konzentration von 3 µg/ml noch stabil. Die Konzentration von 1 µg/ml schwankt stark, doch nach 6 h Inkubation sind bei dieser Konzentration noch etwa 87 % der ursprünglichen Fluoreszenz vorhanden.

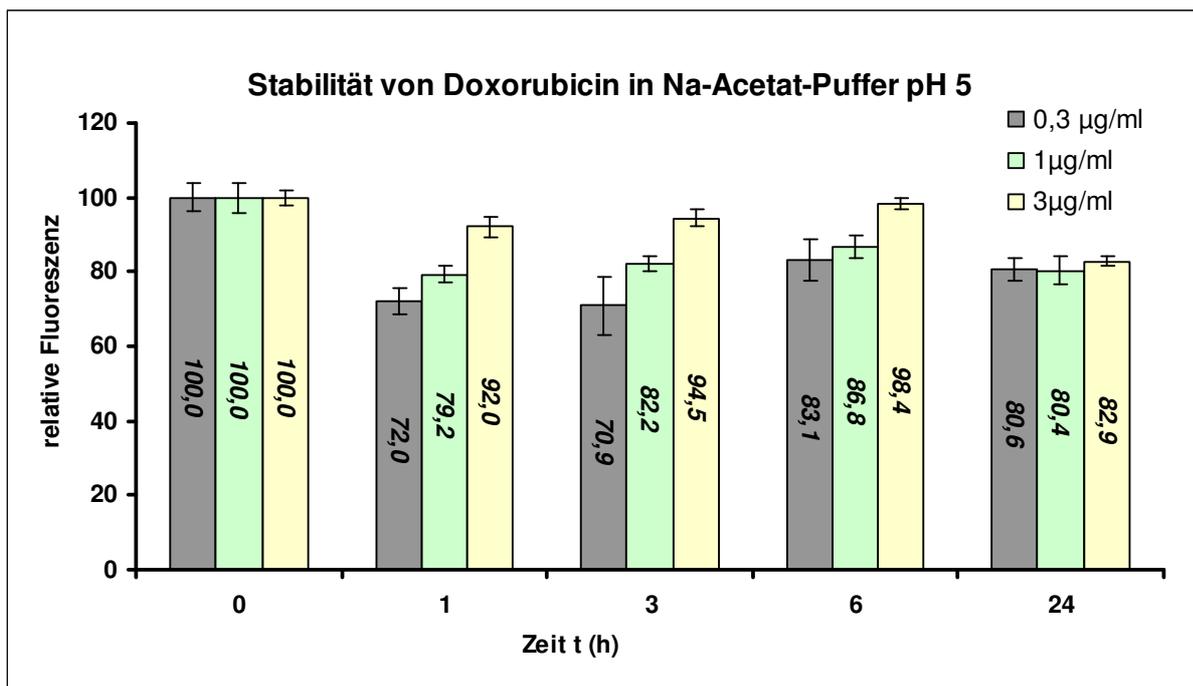


Abbildung 4.56

Relative Fluoreszenzabnahme verschiedener Doxorubicin-Konzentrationen bei pH 5

Eine Stabilitätsuntersuchung bei pH 7,4 in PBS zeigte ebenfalls, dass die geringste Konzentration von Doxorubicin sehr schnell abgebaut wurde. So waren nach 24 h nur noch 66,6 % messbar. Auch die anderen beiden Konzentrationen hatten nach

4. Ergebnisse und Diskussion

24 h wiederum um etwa 20 % abgenommen. Bis 6 h nahmen die gemessenen Werte der Konzentrationen von 1 µg/ml und 3 µg/ml aber nicht so stark ab (s. Abbildung 4.57).

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Stabilität von Doxorubicin massiv von der eingesetzten Konzentration abhängt und dass bis 6 h zumindest die beiden höheren Konzentrationen ausreichend stabil waren. Der 24 h Wert pendelte sich stets auf etwa 80 % ein. Generell ist anzumerken, dass die Werte großen Schwankungen unterlagen.

In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass die Stabilität von Doxorubicin von vielen Faktoren abhängt. Setzt man niedrig konzentriertes Doxorubicin UV-Licht aus, wenn auch lediglich normalem Tageslicht, zersetzt es sich schnell und dieser Abbau erfolgt umgekehrt proportional zur Konzentration [216]. Mit steigendem pH nimmt die Degradation zu [217;218]. Vermutlich wird deshalb das Doxorubicin der Konzentration 0,3 µg/ml bei pH 7,4 stärker abgebaut als bei pH 5.

In biologischen Flüssigkeiten erfolgt ein schneller Abbau, der mit steigender Temperatur ebenfalls zunimmt. In Puffer verhält es sich sehr ähnlich. Bei Körpertemperatur erfolgt generell ein schnellerer Abbau als bei RT oder bei 4 °C. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml und 37 °C erfolgte bei Maniez-Devos et al. der Abbau bei verschiedenen pH-Werten in 0,1 M Puffern im Alkalischen bei pH 8-10 sehr schnell, nach weniger als 24 h war keine Fluoreszenz mehr zu detektieren. Bei pH 5-7 waren nach 24 h nur noch etwa 50 % der ursprünglichen Fluoreszenz zu detektieren und erst bei saureren pH-Werten von 3 und 4 waren nach 24 h noch etwa 80 % der ursprünglich eingesetzten Fluoreszenz messbar. Es wird in dieser Arbeit empfohlen, kühl, schnell, unter Lichtausschluss und bei einem pH kleiner als 6 zu arbeiten [219].

Es war zu erwarten, dass bei den nachfolgenden Freisetzungsexperimenten nur sehr geringe Konzentrationen an Doxorubicin entstehen würden. Da bei diesen Experimenten bei 37 °C und teilweise bei einem physiologischen pH von 7,4 gearbeitet werden musste, wurde die Versuchsdauer auf 6 h festgelegt, um den Abbau von Doxorubicin während des Versuchs möglichst gering zu halten.

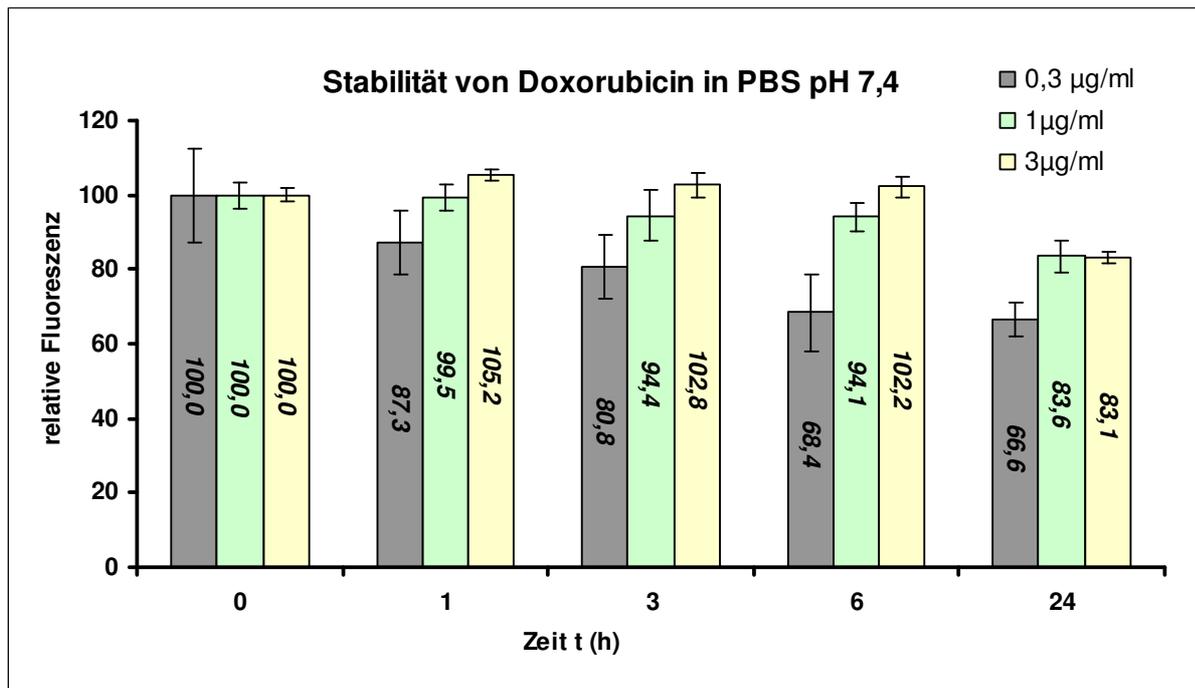


Abbildung 4.57

Relative Fluoreszenzabnahme verschiedener Doxorubicin-Konzentrationen bei pH 7,4

4.3.1.3 Freisetzungsexperimente mit aufgereinigten Doxorubicin beladenen PBCA-NP in Puffer pH 5 und pH 7,4

Nachdem nun die Aufreinigungsmethode der NP, sowie die Methode zur Abtrennung des während eines Freisetzungsexperiments freigesetzten Doxorubicins entwickelt und die Stabilität des freien Doxorubicins näher beleuchtet war, wurden erste Freisetzungsexperimente durchgeführt. Diese sollten zunächst in reinem Puffer bei pH 5 und pH 7,4 stattfinden, sowie dann unter Zusatz von Gehirnhomogenat bei den gleichen pH-Werten. Es sollte ermittelt werden, ob das zugesetzte Gehirnhomogenat die Freisetzung beeinflusst. Der pH-Wert von 7,4 wurde gewählt, um den physiologischen Bereich in Blut und Gewebe widerzuspiegeln, der pH von 5 wurde gewählt, um einen Milieu zu erzeugen, bei dem auch lysosomale Enzyme aktiv sind. Denn aufgrund der vermuteten endozytotischen Aufnahme von NP in die zerebralen Kapillarendothelzellen, bei der nach Internalisierung des NP die Lysosomen aktiv am Abbau beteiligt sind, musste auch dieser Weg des Abbaus in Betracht gezogen werden. Dies ist von Bedeutung, da Lysosomen viele verschiedene hydrolysierende Enzyme, wie Proteasen, Nukleasen und Lipasen zur intrazellulären Verdauung von Material enthalten. Diese Enzyme dienen der Hydrolyse aller wichtigen Gruppen von

4. Ergebnisse und Diskussion

Makromolekülen. Sie erreichen eine hohe Aktivität nur bei einer sauren Umgebung von pH 4,5–5. Dies dient dem Schutz der Zelle beim Aufbruch eines Lysosoms. In einem solchen Fall wären die Enzyme im pH-neutralen Milieu des Zytosols inaktiv.

Abbildung 4.58 zeigt die Gesamtchromatogramme der Freisetzungsuntersuchung in reinem Puffer bei pH 5 von 0 h bis 6 h. Der Wert bei 0 h wurde durch Chromatographie der über Nacht im Kühlschrank gelagerten aufgereinigten Partikel erhalten. Die NP-Fraktion 4 nimmt mit zunehmender Versuchsdauer an Intensität ab. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die NP teilweise aggregierten und durch den der Chromatographie vorgeschalteten Zentrifugationsschritt abgetrennt wurden. Von Fraktion 7-16 eluiert das freigesetzte Doxorubicin. Da die freigesetzte Menge sehr gering ist, lässt sich in der Gesamtdarstellung der *Peak* kaum ausmachen. Bei diesen Versuchen wurde ausschließlich mit 0,9 % NaCl als Eluent gearbeitet. Die Trennung war zwar nicht so scharf wie mit der am Ende festgesetzten Methode, aber dennoch gut analysierbar.

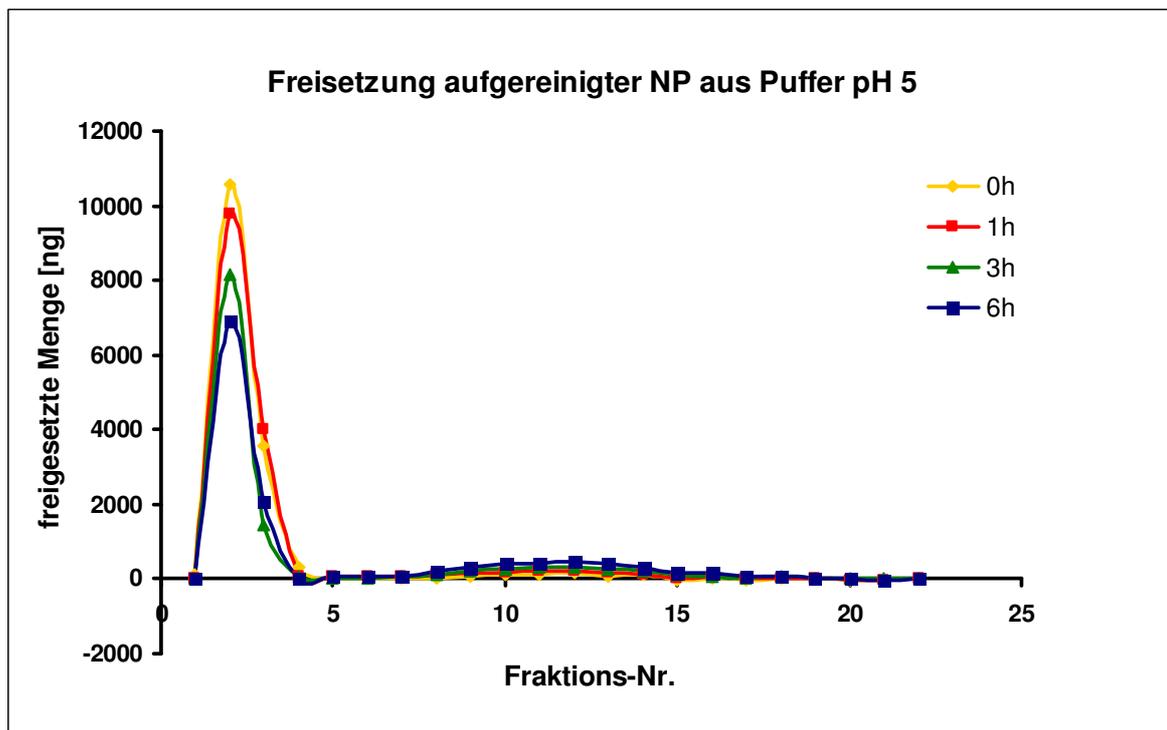


Abbildung 4.58

Chromatogramm eines Freisetzungsexperimentes in Puffer bei pH 5, eluiert in 0,9 % NaCl-Lsg., Fraktion 4 entspricht dem NP-*Peak*, ab Fraktion 7-16 eluiert das reine Doxorubicin

4. Ergebnisse und Diskussion

Vergrößert man indes den Bereich der Fraktionen des freigesetzten Doxorubicins (Abbildung 4.59), zeigt sich, dass die Menge an freigesetztem Doxorubicin über die Zeit zunimmt und bei 6 h am *Maximum* des *Peaks* einen Spitzenwert von etwa 500 ng absolut erreicht. Auch bei der Lagerung über Nacht im Kühlschrank wurde etwas Doxorubicin freigesetzt. Die recht hohen Standardabweichungen kommen dadurch zustande, dass stets am Detektionslimit des Fluoreszenzplattenlesers gemessen werden musste, welches bei etwa 100-200 ng/ml liegt.

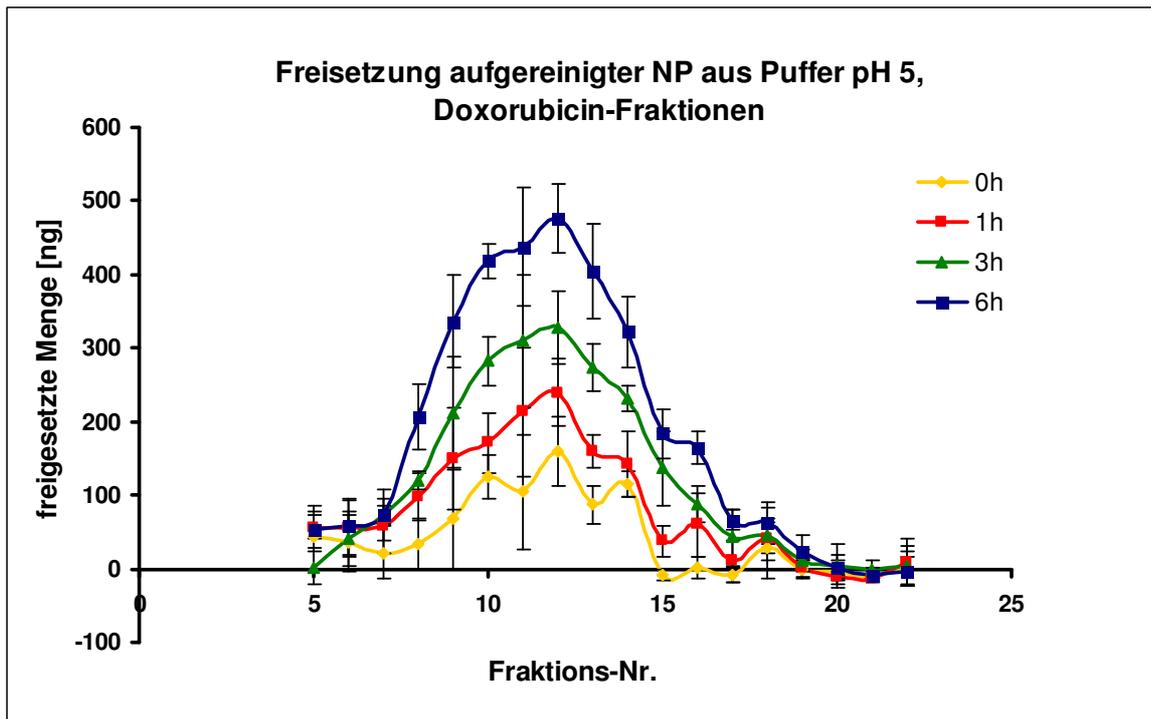


Abbildung 4.59

Fraktionen 5-22 der Abbildung 4.58

Bei der Freisetzung aus PBS pH 7,4 verhält es sich im Gesamtchromatogramm sehr ähnlich wie bei der Freisetzung bei pH 5 (Abbildung 4.60). Die Intensität des NP-*Peaks* (Frakt. 4) nimmt über die Versuchszeit ab und freies Doxorubicin entsteht.

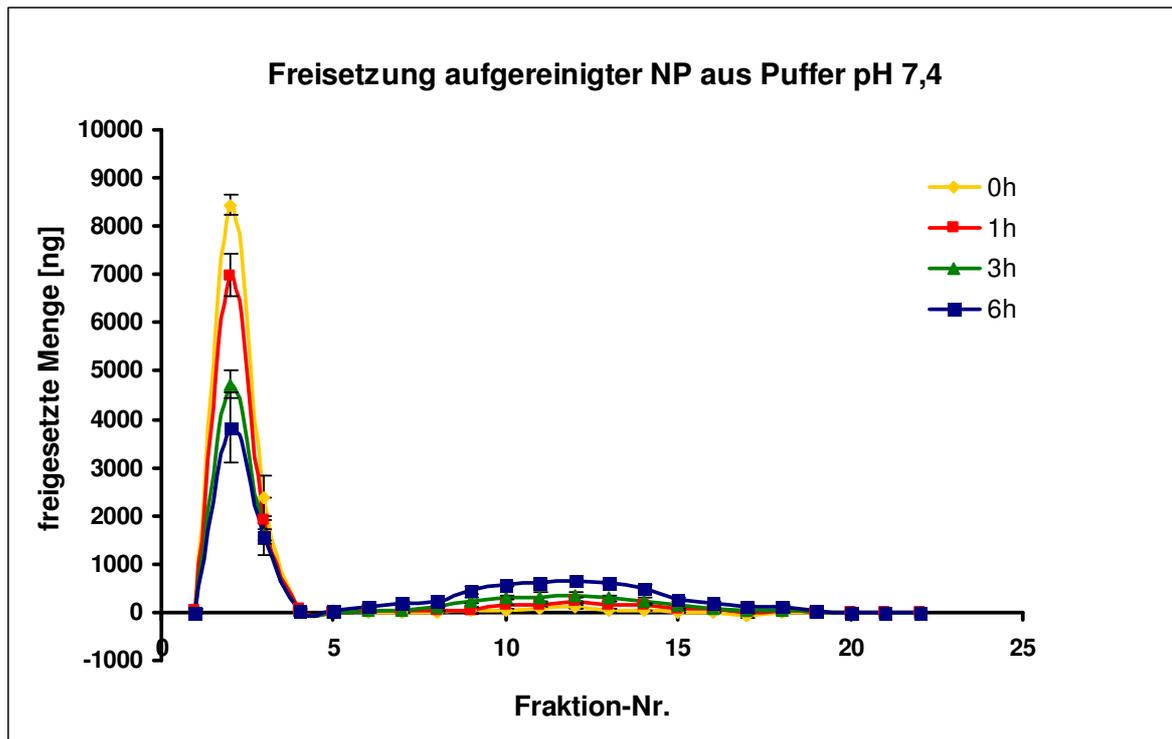


Abbildung 4.60

Chromatogramm eines Freisetzungsexperimentes in Puffer bei pH 7,4, eluiert in 0,9 % NaCl-Lsg., Fraktion 2 entspricht dem NP-Peak, ab Fraktion 6-17 eluiert das reine Doxorubicin

Betrachtet man die Doxorubicin-Fractionen wieder in der Vergrößerung (Abbildung 4.61), so ergibt sich auch hier ein sehr ähnliches Bild wie bei dem bei pH 5 durchgeführten Experiment indes mit dem Unterschied, dass das *Maximum* nach 6 h mit 700 ng freigesetztem Doxorubicin höher liegt als bei niedrigerem pH. Auch nimmt wiederum die freigesetzte Menge an Doxorubicin über die Zeit zu.

4. Ergebnisse und Diskussion

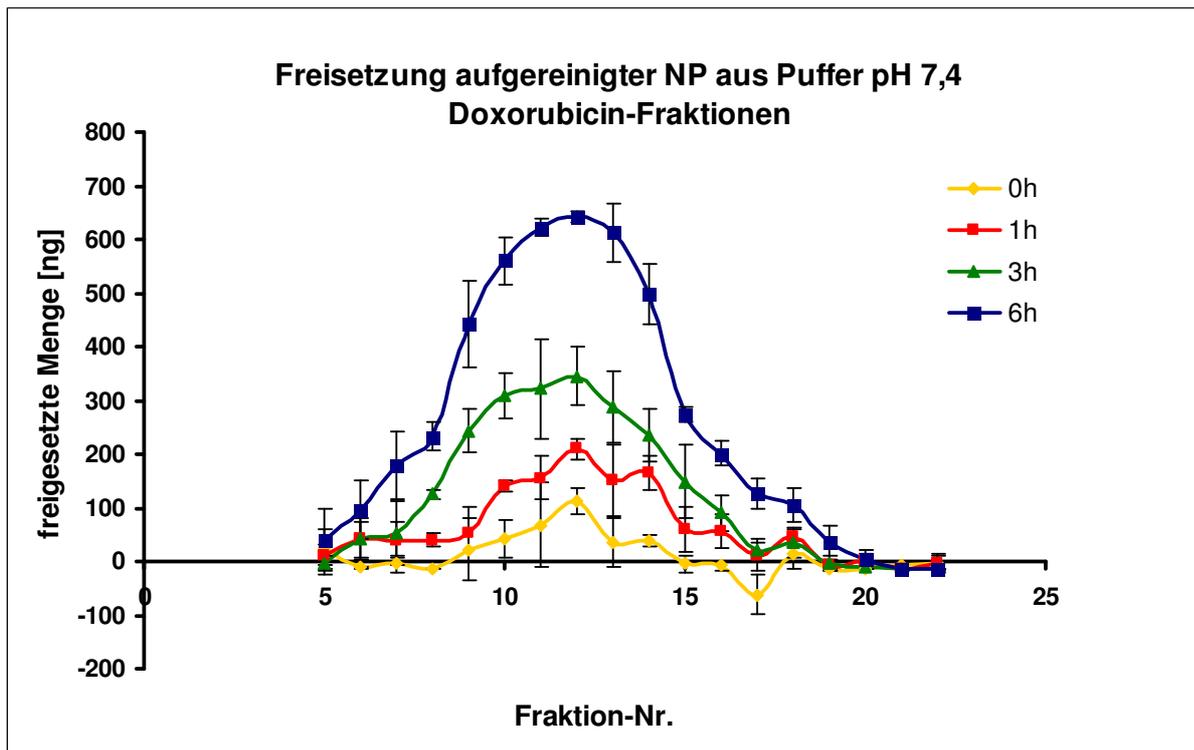


Abbildung 4.61 Fraktionen 5-22 der Abbildung 4.60

Stellt man die freigesetzte Menge an Doxorubicin beider Puffer nunmehr prozentual vom ursprünglich in den aufgereinigten NP inkorporierten Doxorubicin dar, so erhält man Abbildung 4.62. Es ist offensichtlich, dass über den gesamten Zeitraum eine kontrollierte Freisetzung 0. Ordnung stattfindet, wie die Geraden in Abbildung 4.62 demonstrieren. Bei diesen Nanopartikeln war wegen der sehr gründlichen Aufreinigung kein adsorbiertes Doxorubicin an der Oberfläche mehr vorhanden. Daher kam es zu Beginn des Experimentes auch nicht zu einer erhöhten Initialfreisetzung, wie es bei Formulierungen mit adsorbiertem Stoff der Fall war [212;220;221]. Vielmehr ist anzunehmen, dass die in der hier vorgelegten Arbeit beobachtete Art der Freisetzung aufgrund von Diffusion durch die im umgebenden Medium gequollene Polymerschicht und Erosionsprozesse durch Esterhydrolyse an der NP-Oberfläche zustande kam. Die Freisetzungsgerade in PBS pH 7,4 verläuft etwas steiler. Dies könnte auf die stärkere Hydrolyseempfindlichkeit von Estern im leicht Alkalischen zurückzuführen sein. Mithin quillt das Polymer vermutlich aufgrund von vermehrter Abspaltung der Butanol-Seitenketten bei pH 7,4 etwas stärker als bei pH 5. Die Freisetzung bei pH 7,4 liegt deshalb etwas höher bei etwa 6-7 %. Bei pH 5 pendelt sich die Freisetzung nach 6 h bei 4-5 % ein.

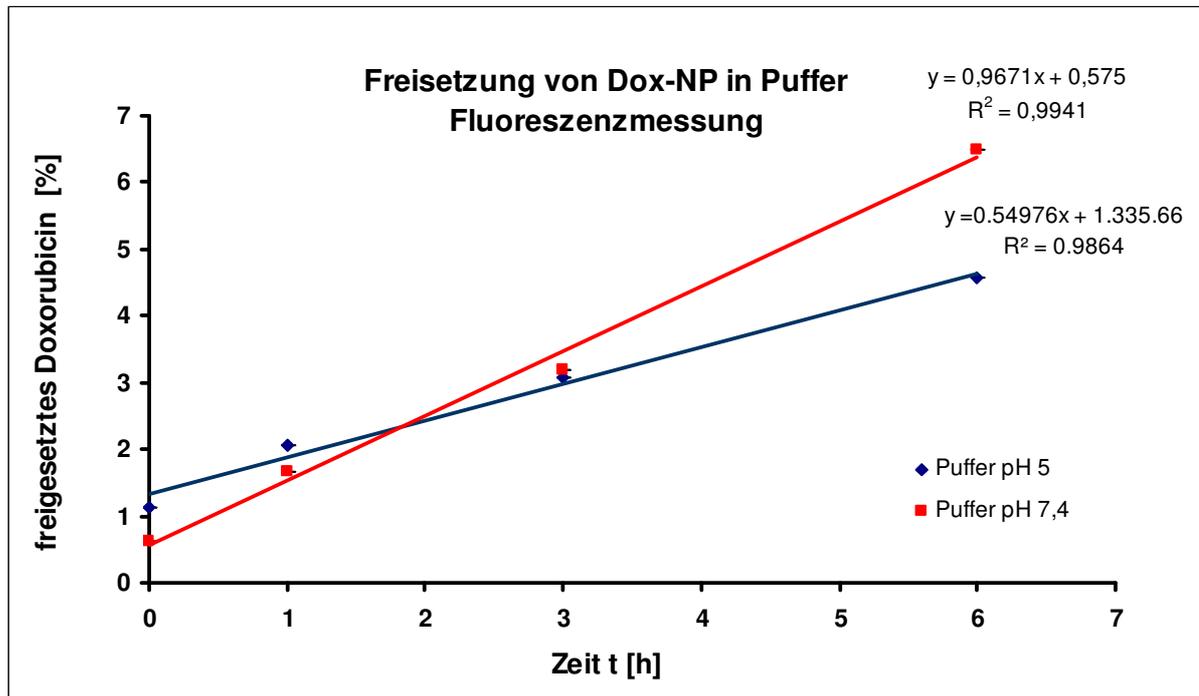


Abbildung 4.62

Prozentuale Freisetzung aus aufgereinigten Doxorubicin-NP in Puffer bei pH 5 und pH 7,4, mit Fluoreszenzplattenleser ermittelt

Da die Standardabweichungen der Einzelmessungen mit dem Fluoreszenzplattenleser relativ hoch waren, wurden bei den nachfolgenden durchgeführten Experimenten auch Gehaltsbestimmungen an der HPLC mit Fluoreszenzdetektor durchgeführt (Abbildung 4.63). Die Erfassungsgrenze des Fluoreszenzdetektors an der HPLC lag bei ca. 5 ng/ml, was im Vergleich zum Limit des Fluoreszenzplattenlesers (200 ng/ml) eine Steigerung der Empfindlichkeit um das 40fache bedeutet. Diese HPLC-Analysen wurden außer Haus von der Analytikabteilung der klinischen Pharmakologie der Universitätsklinik Heidelberg durchgeführt. Trotz der geringeren Empfindlichkeit des Plattenlesers waren die Ergebnisse beinahe identisch mit denen der HPLC-Analysen. Auch hier liegt nach den gemessenen 6 h die Freisetzung bei pH 7,4 bei etwa 6-7 % und bei pH 5 bei etwa 3-4 %.

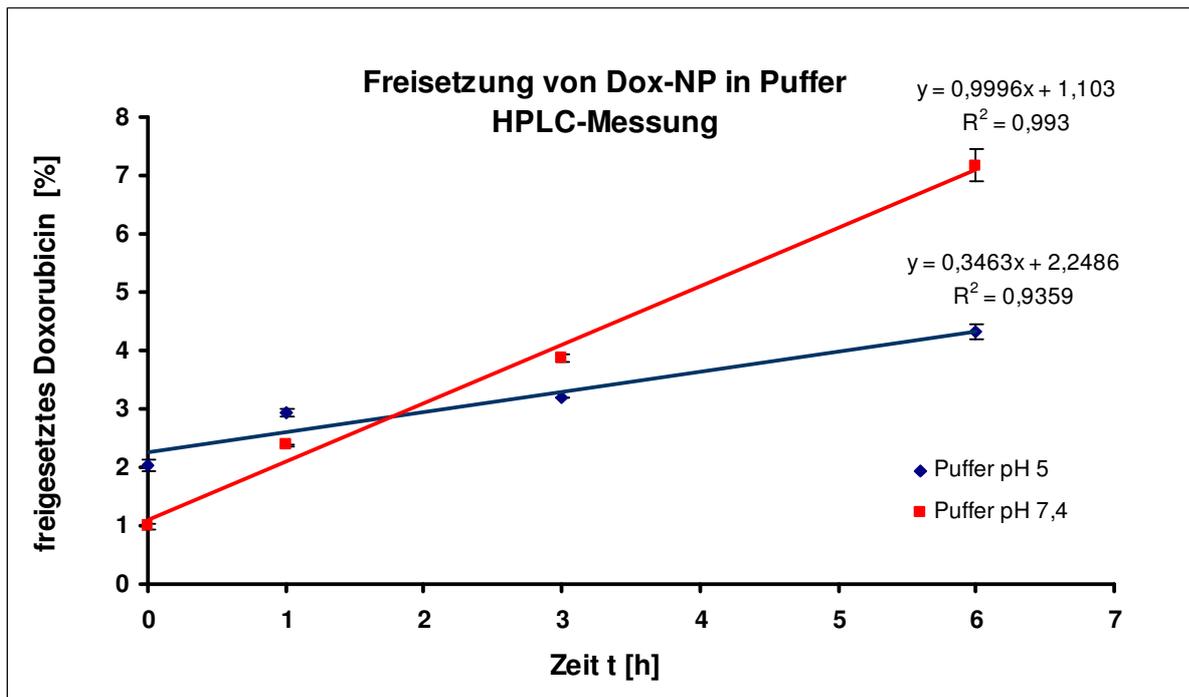


Abbildung 4.63

Prozentuale Freisetzung aus aufgereinigten Doxorubicin-NP bei pH 5 und pH 7,4 mittels HPLC bestimmt

4.3.1.4 Freisetzungsexperimente mit aufgereinigten Doxorubicin beladenen PBCA-NP in Gehirnhomogenat pH 5 und pH 7,4

Nachdem die Freisetzung von Doxorubicin aus aufgereinigten NP in reinem Puffer untersucht worden war, sollte der Einfluss der im Gehirnhomogenat befindlichen Enzyme auf das Freisetzungverhalten untersucht werden. Deshalb wurde den aufgereinigten NP Gehirnhomogenat im Puffer des jeweils untersuchten pH-Wertes zugesetzt.

Abbildung 4.64 zeigt das gesamte Chromatogramm eines Freisetzungsexperiments bei pH 5 in Gehirnhomogenat von 0 h bis 6 h. Im Vergleich zu den Experimenten mit Puffer nimmt der NP-*Peak* bei Fraktion 2 hier deutlich stärker ab. Nach 6 h sind nahezu keine NP mehr vorhanden. Dies war auch optisch während des Versuchs erkennbar, denn die NP flockten im Homogenat und insbesondere bei pH 5 mehr aus als in Puffer. Somit wurden die agglomerierten NP bei der der Aufreinigung vorgeschalteten Zentrifugation vollständig abgetrennt. Da bei der Elutionsmethode dieses Mal zunächst mit 22 ml Wasser und erst danach mit NaCl-Lsg. eluiert wurde,

war auch die Auflösung im Chromatogramm hervorragend. Das freie Doxorubicin eluiert erst ab Fraktion 24 von der Säule.

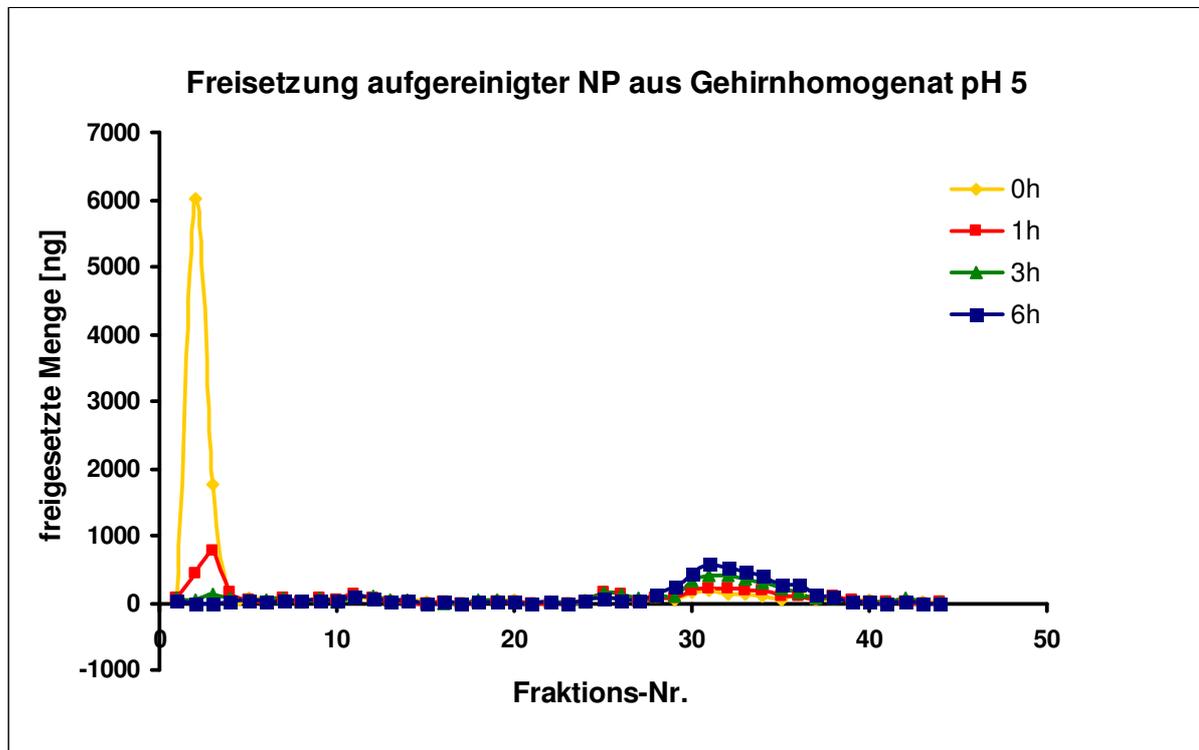


Abbildung 4.64

Chromatogramm eines Freisetzungsexperimentes in Gehirnhomogenat bei pH 5, eluiert in 22 Fraktionen Wasser und danach 22 Fraktionen 0,9 % NaCl-Lsg., Fraktion 2 entspricht dem NP-Peak, ab Fraktion 24-40 eluiert das reine Doxorubicin

Betrachtet man nun wieder die vergrößerte Darstellung der eluierten Doxorubicin-Fractionen (Abbildung 4.65), so ist zu erkennen, dass die eluierte Doxorubicinmenge wieder mit der Zeit zunimmt und bei 6 h im *Maximum* eine Menge von ca. 600 ng erreicht. Aufgrund der geringen Messempfindlichkeit des verwendeten Fluoreszenzplattenlesers waren auch hier die Standardabweichungen recht hoch.

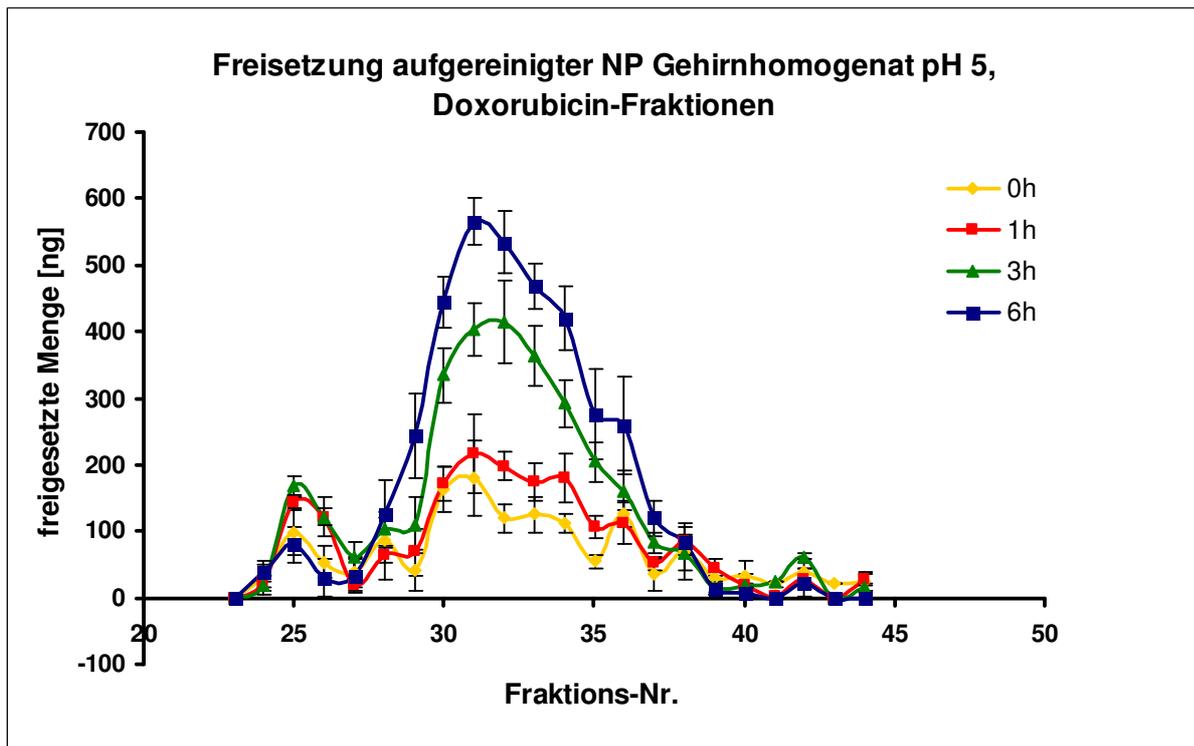


Abbildung 4.65

Fraktionen 23-46 der Abbildung 4.64

Bei pH 7,4 nimmt im Gesamtchromatogramm interessanterweise der NP-Peak bei Fraktion 2 nicht so massiv ab wie beim Versuch bei pH 5 (Abbildung 4.66). Bei 3 h wurden die meisten NP durch Zentrifugation vorher entfernt. Durch die Lagerung der aufgereinigten NP über Nacht in Wasser scheint eine Veränderung der Größe der NP stattgefunden zu haben, denn der NP-Peak ist zweigeteilt. Mit zunehmender Versuchszeit verlagert sich das *Maximum* auf die zweite Hälfte des *Peaks* in Fraktion 5. Welche Veränderung genau stattgefunden hat, ist unklar, würde man bei einer Verzögerung des *Peaks* doch erwarten, dass eine Verkleinerung der NP stattgefunden hat. Dies aber müsste mit einer vermehrten Freisetzung von Doxorubicin beim 0 h Wert einhergehen, was verglichen mit den anderen Experimenten nicht der Fall ist. Ab Fraktion 24 bis Fraktion 40 eluiert das freigesetzte Doxorubicin.

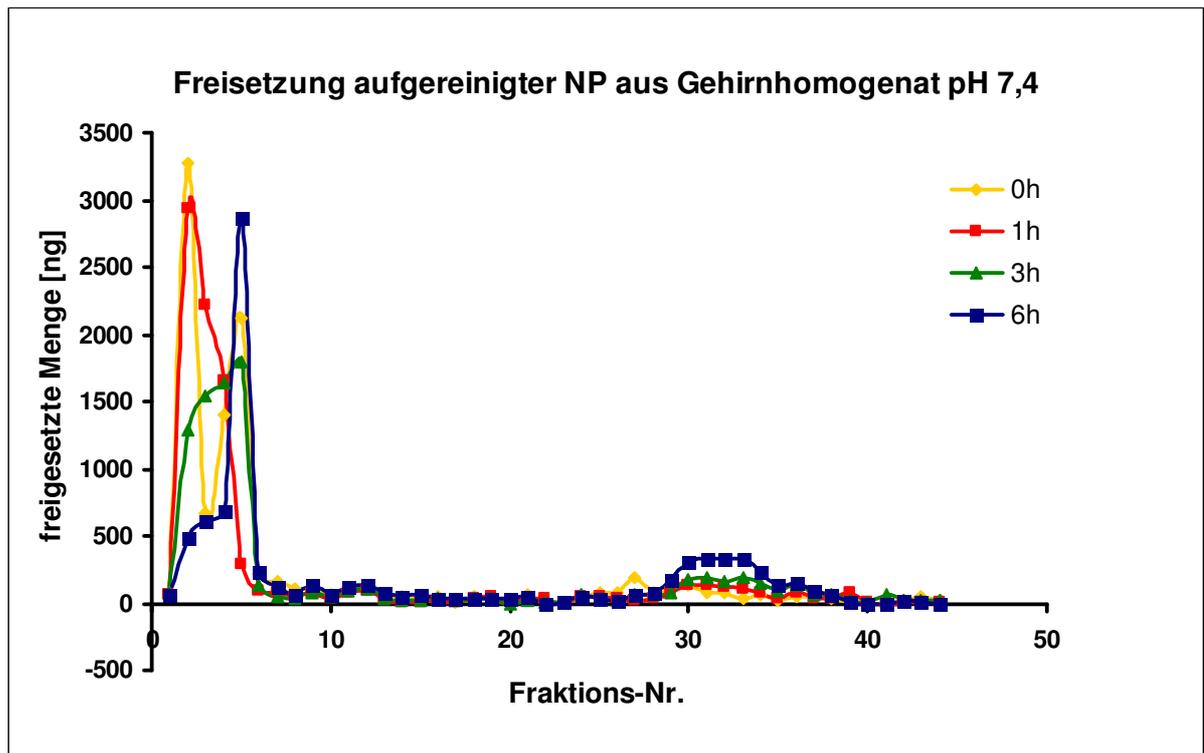


Abbildung 4.66

Chromatogramm eines Freisetzungsexperimentes in Gehirnhomogenat bei pH 7,4, eluiert in 22 Fraktionen Wasser und danach 22 Fraktionen 0,9 % NaCl-Lsg., Fraktion 2 entspricht dem NP-Peak, ab Fraktion 24-40 eluiert das reine Doxorubicin

Die Darstellung der Doxorubicin-Fraktionen (Abbildung 4.67) zeigt wie bei allen anderen Versuchen auch, dass die Menge an freigesetztem Doxorubicin über die Zeit zunimmt. Es besteht allerdings kein messbarer Unterschied zwischen der Freisetzung nach 0 h und nach 1 h. Eine leichte Zunahme ist erst nach 3 h zu verzeichnen. Das *Maximum* nach 6 h liegt zwar nur bei 300-350 ng absolut, wird indes auch von den Fraktionen 30-33 als kleines Plateau aufrechterhalten.

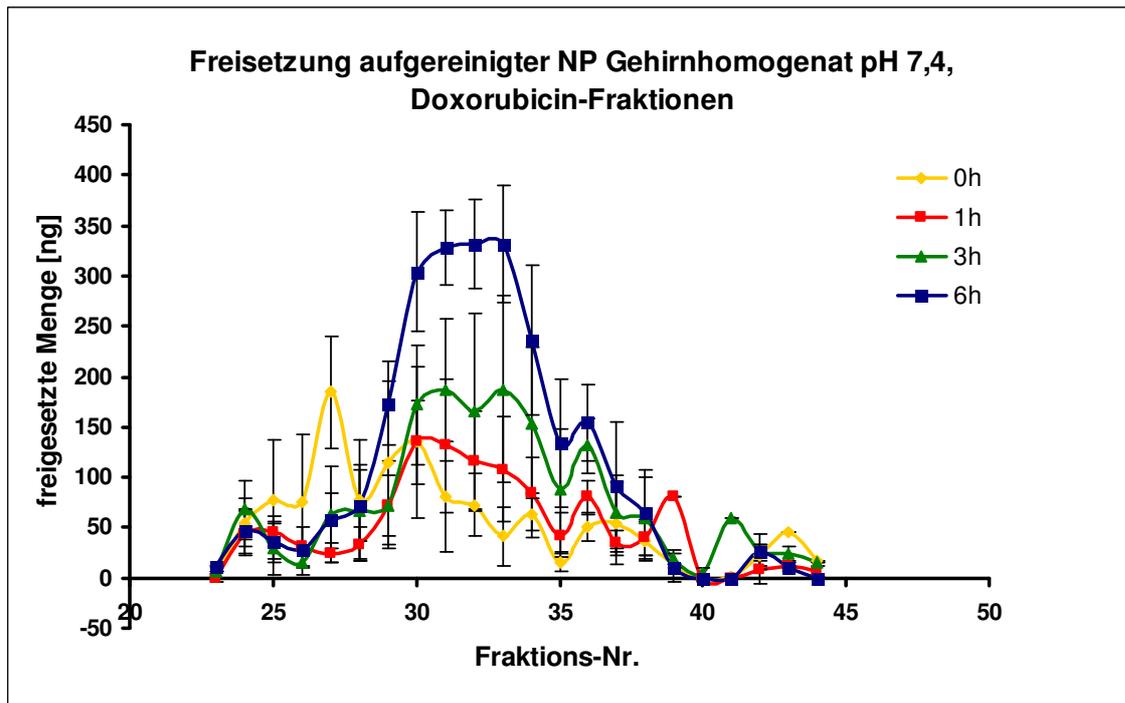


Abbildung 4.67

Fraktionen 23-44 aus Abbildung 4.66

Betrachtet man die prozentuale Freisetzung von Doxorubicin aus aufgereinigten NP in Gehirnhomogenat bei beiden untersuchten pH-Werten, erkennt man auch hier deutlich eine Freisetzung 0. Ordnung, wie die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden verdeutlichen (Abbildung 4.68). Im Homogenat bei pH 5 war ein etwas steilerer Verlauf zu verzeichnen, das Doxorubicin wurde etwas schneller und auch in etwas größerer Menge freigesetzt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen, die aus Versuchen mit HPLC-Analyse des Doxorubicins erreicht wurden, so stellt man fest, dass kaum ein Unterschied in der Freisetzung zwischen den beiden untersuchten pH-Werten besteht (Abbildung 4.69). Dies liegt vermutlich daran, dass bei den Versuchen mit anschließender HPLC-Analyse etwas $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltes Methanol zugesetzt wurde, um die im Homogenat enthaltenen Proteine auszufällen und das möglicherweise daran adsorbierte Doxorubicin davon abzulösen. Die Plasmaproteinbindung beträgt beim Doxorubicin üblicherweise etwa 50-85 % [196;222]. Der Einfluss des eisgekühlten Methanols kommt jedoch nur bei pH 7,4 zum Tragen, bei pH 5 sind die Ergebnisse mit und ohne Methanol bei beiden Analysenverfahren nahezu gleich. Dies liegt sicher daran, dass sich mit dem pH-Wert auch das Ausmaß an Proteinbindung ändert. Bei einem pH unterhalb pH 7,4 wurde für Anthracycline eine geringere Bindung an Plasmaproteine festgestellt [223].

4. Ergebnisse und Diskussion

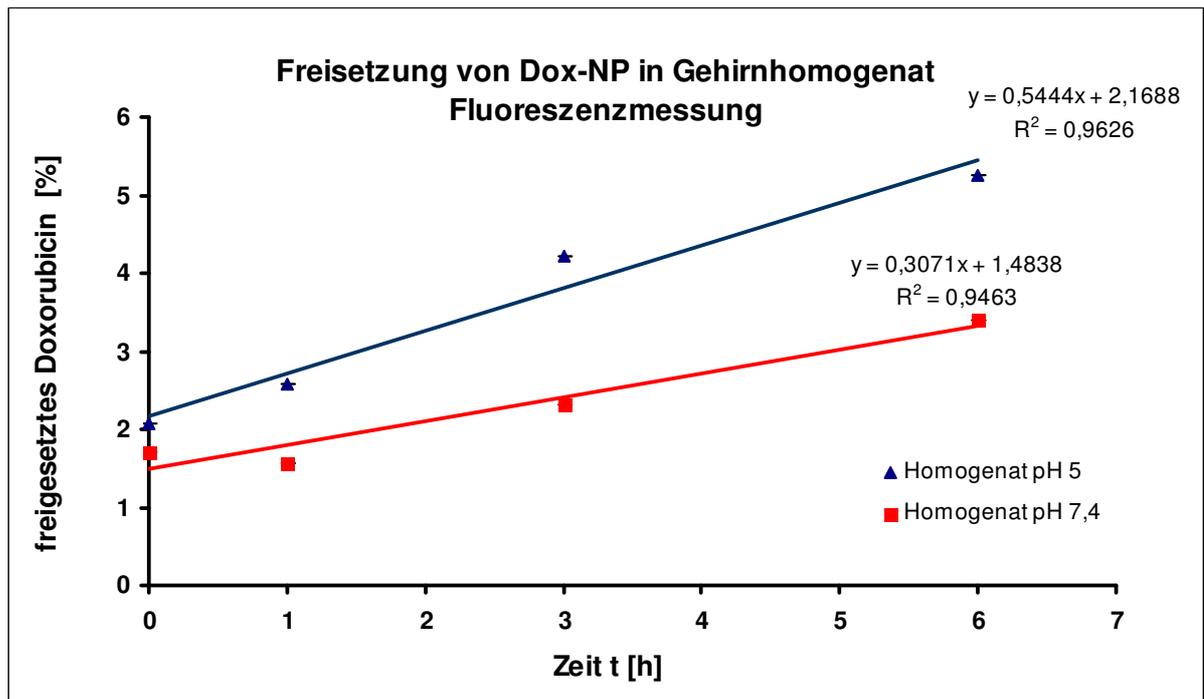


Abbildung 4.68

Prozentuale Freisetzung aus aufgereinigten Doxorubicin-NP Gehirnhomogenat bei pH 5 und pH 7,4, mit Fluoreszenzplattenleser ermittelt

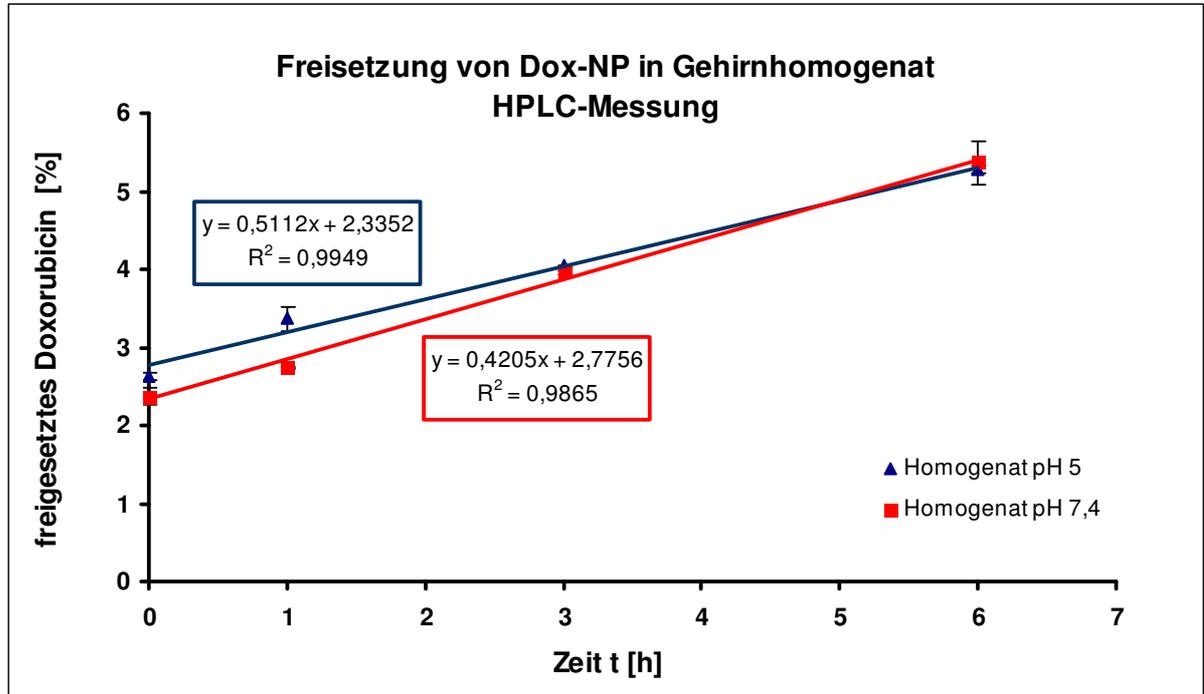


Abbildung 4.69

Prozentuale Freisetzung aus aufgereinigten Doxorubicin-NP Gehirnhomogenat bei pH 5 und pH 7,4, mit HPLC ermittelt, mit Zusatz von eisgekühltem Methanol

4. Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die Freisetzungen in reinem Puffer und in Gehirnhomogenat bei zwei verschiedenen pH-Werten nur unmerklich unterscheiden. In beiden Fällen folgt sie einer Kinetik 0. Ordnung (s. Abbildung 4.70, Abbildung 4.71).

Auch der Vergleich zwischen Messung mittels HPLC (Abbildung 4.71) und Fluoreszenzplattenleser (Abbildung 4.70) zeigt, dass die Ergebnisse trotz der größeren Messgenauigkeit des Fluoreszenzplattenlesers vergleichbar sind. Die Ergebnisse sind sich trotz der hohen Standardabweichungen beim Fluoreszenzplattenleser ausgesprochen ähnlich.

Der Puffer pH 7,4 bewirkt bei beiden Messverfahren die schnellste und höchste (ca. 6,5 %) Freisetzung, was sicherlich auf die Hydrolyseempfindlichkeit des Polymers und die durch damit verbundene Quellung des Polymers zurückzuführen ist. Beim Experiment in Na-Acetatpuffer pH 5 erfolgt die Freisetzung im leicht Sauren etwas langsamer und es wird weniger freigesetzt (ca. 4 %).

Bei den Versuchen mit Gehirnhomogenat sind sich die Freisetzungsverläufe bei beiden pH-Werten sehr ähnlich, mit dem Unterschied, dass aufgrund des fehlenden Methanolzusatzes bei den Messungen mit dem Plattenleser die Freisetzung bei pH 7,4 etwas langsamer und in geringerem Ausmaß erfolgte. Die Freisetzungen im Homogenat liegen etwas oberhalb der Freisetzung in Puffer pH 5 und etwas unterhalb der Freisetzung bei pH 7,4. Die Freisetzung liegt für reinen Puffer und Homogenat in der gleichen Größenordnung. Es konnte keine erhöhte Freisetzung aufgrund von Enzymen im Gehirnhomogenat gemessen werden. Dies liegt jedoch vermutlich daran, dass das PBCA fast ausschließlich an den Esterseitenketten angreifbar ist. Der Angriff geschieht sowohl hydrolytisch als auch enzymatisch. In anderen Arbeiten zum Abbau von PBCA-NP wurden sehr hohe Konzentrationen an Esterasen (1-5 mg/ml) verwendet, um eine Beschleunigung des Abbaus zu erreichen [213]. Das zeigt, dass bei Versuchen *in vitro* große Mengen an Enzym benötigt werden, um den Seitenkettenabbau im Vergleich zu spontaner Hydrolyse zu beschleunigen. Generell wurde in anderen Arbeiten im Vergleich zu den hier gemessenen Mengen mehr inkorporierter Wirkstoff aus beladenen PBCA-NP freigesetzt. In diesen Fällen war allerdings noch Substanz an die Oberfläche der NP adsorbiert. Daher kam es zu einer beschleunigten Freisetzung innerhalb der ersten

4. Ergebnisse und Diskussion

4-5 h [212] oder in den ersten 10 h [220]. Auch war die Dauer der Versuche wesentlich länger. Dadurch ergeben sich freigesetzte Gesamtmengen des Wirkstoffes wie beispielsweise 60 % nach 188 h [220] oder 70-90 % nach 24 h [212]. Aufgrund der verschiedenen Herstellungsverfahren und der unterschiedlichen Beladung von PBCA-NP sind auch die Anteile an inkorporiertem adsorbierter Substanz unterschiedlich. Dies macht einen Vergleich der in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse mit Literaturdaten schwierig.

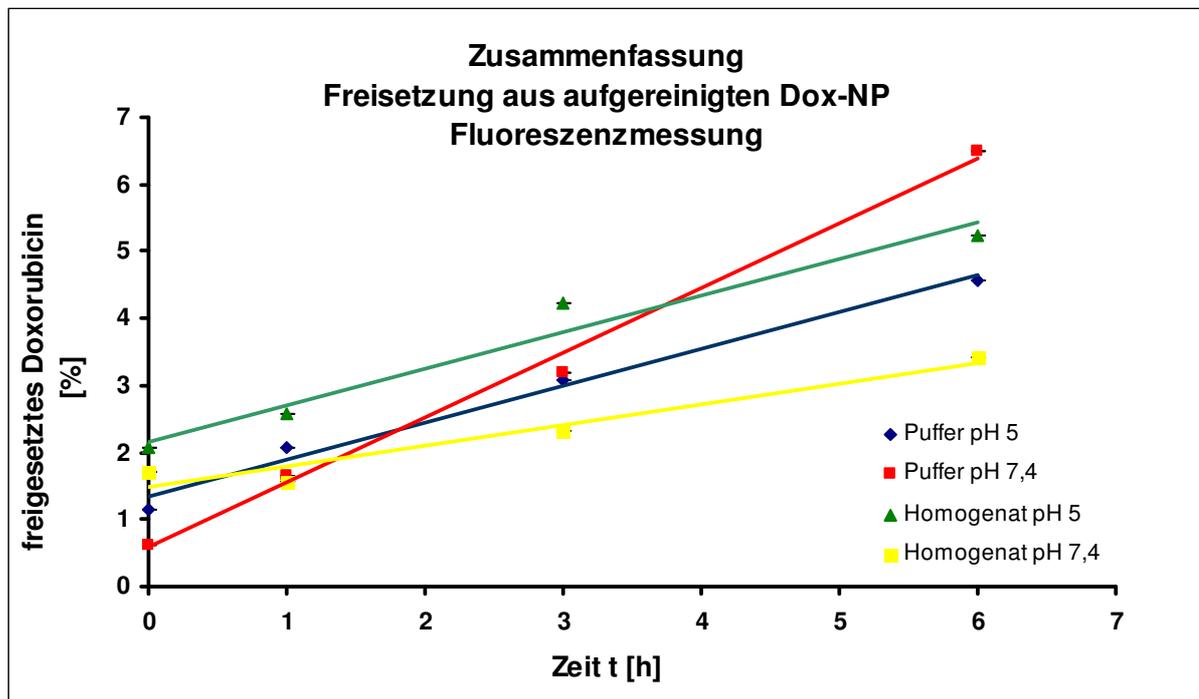


Abbildung 4.70

Zusammenfassung aller Freisetzungsuntersuchungen in Puffer und Gehirnhomogenat pH 5 und pH 7,4 gemessen mit dem Fluoreszenzplattenleser

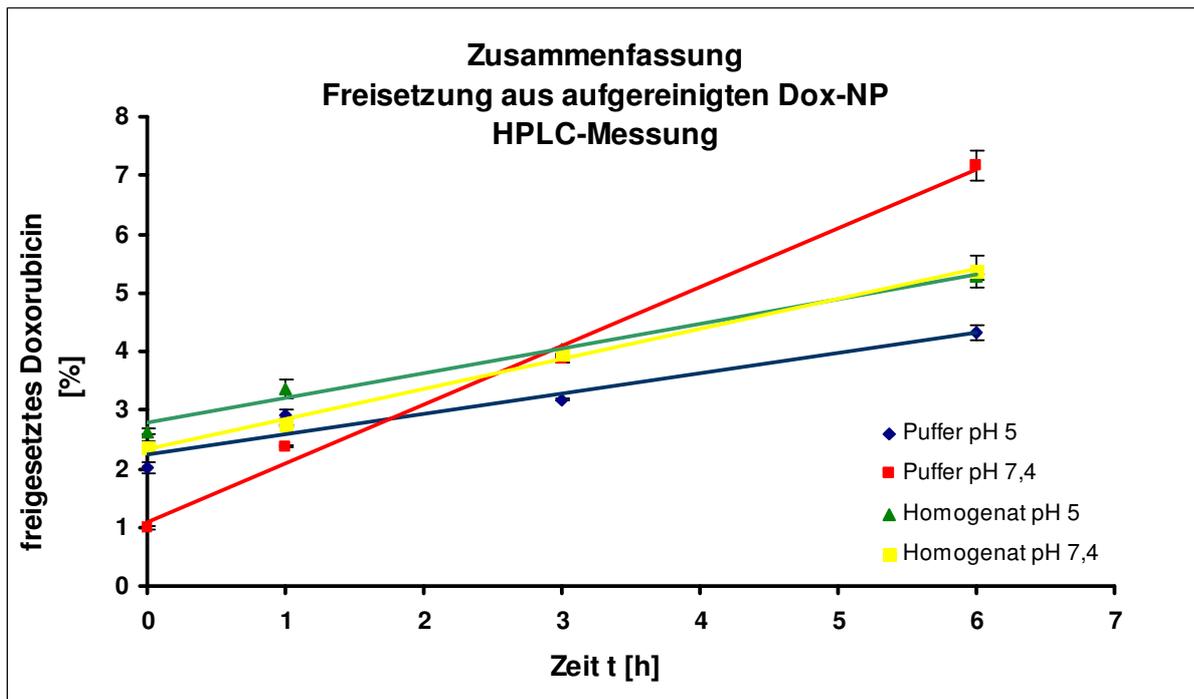


Abbildung 4.71

Zusammenfassung aller Freisetzungsuntersuchungen in Puffer und Gehirnhomogenat pH 5 und pH 7,4 gemessen mit HPLC

4.3.2 Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn

Die Isolation zerebraler Kapillarendothelzellen erfolgte aus Schweinehirn, da große Ähnlichkeiten zwischen den Stoffwechselprozessen von Schweinen und Menschen bestehen [224] und Schweinehirne jederzeit vom lokalen Schlachter bezogen werden konnten. Die Hirnhäute wurden zunächst entfernt, um Verunreinigungen durch periphere Endothelzellen auszuschließen. Für die Isolation der zerebralen Kapillarendothelzellen wurde ausschließlich die graue kortikale Substanz verwendet (Abbildung 4.72), da das restliche Hirngewebe bzw. die weiße Substanz Myelin und Neuronenkerne enthält, die nur schwer abgetrennt werden können und zu einer Verunreinigung mit Oligodendrozyten führen [224].

4. Ergebnisse und Diskussion



Abbildung 4.72

Entfernung der Meningen (links) und anschließendes Zerkleinern der grauen Substanz mittels Kräuterschneider (rechts)

Dispase-Verdau

Dispase ist eine neutrale Metalloprotease. Sie kann zur Gewebedisaggregation eingesetzt werden und zerstört im Gegensatz zu Trypsin, Collagenase oder anderen proteolytischen Enzymen nicht die Zellmembran (s. Abbildung 4.73). Durch den Enzymverdau können die Kapillarfragmente vom umliegenden Hirngewebe (Gliazellen und Neuronen) gelöst und durch die anschließende Dextran-Zentrifugation davon getrennt werden [225;226].



Abbildung 4.73

(von links nach rechts): Inkubation des Gehirnhomogenats mit Dispase (1), danach Abmessen des Gehirnhomogenats (2) für die Becher mit vorgelegtem Dextran (3)

Dextranzentrifugation

Dieser Schritt dient der Abtrennung der Gehirnkapillaren von verdautem Gehirngewebe. Es wird hierfür eine 18 %ige Dextranlösung verwendet. Zelltrümmer, Gliazellen, Neuronen und Fett schwimmen aufgrund geringerer Dichte nach der Zentrifugation oben auf der Dextranlösung und können mit dieser abgeschüttet werden. Die Gehirnkapillaren bleiben als rotes Pellet zurück (Abbildung 4.74).



Abbildung 4.74

Gemisch aus Gehirnhomogenat und Dextran vor der Zentrifugation (links), Dextran-Becher im Rotor (Mitte), Dextranbecher nach Zentrifugation, rotes Kapillarpellet unten, aufschwimmende Anteile des Homogenats oben (rechts)

Collagenase Verdau

Für diesen zweiten enzymatischen Schritt wurde ein Gemisch aus Collagenase und Dispase eingesetzt, das collagenolytische und proteolytische Eigenschaften vereint [Roche, Collagenase/Dispase Produktinformation, 2003]. Dadurch konnte die collagenreiche Basalmembran der Gehirnkapillaren aufgelöst und einzelne Endothelzellen freigesetzt werden. An den Kapillaren anhaftende Gliazellen konnten ebenfalls beseitigt werden. Das entstandene Pellet bestand neben Kapillarendothelzellen aus Gehirnkapillarfragmenten, Erythrozyten, Perizyten, Astrozyten und Zelltrümmern (Abbildung 4.75). Der Verdau wurde nur soweit fortgeführt, dass die Zellen noch nicht ganz vereinzelt waren. Diese wuchsen dann aus den Kapillarfragmenten heraus am Flaschenboden an.



Abbildung 4.75

(von links nach rechts): gesiebte Kapillarsuspension nach Dextran-zentrifugation (1), Inkubation der Kapillarsuspension mit Collagenase/Dispase (2), beladener Percoll-Gradient vor der Zentrifugation, Kapillarschicht ganz oben (3) beladener Percoll-Gradient nach der Zentrifugation, scharfe Trennung, Kapillarendothelzellen in der Interphase (4)

Percoll-Dichtezentrifugation

Es wurde ein diskontinuierlicher Dichtegradient aus Percoll der Dichte 1,07 g/ml und 1,03 g/ml verwendet. Mit diesem Schritt erfolgte die Abtrennung der Kapillarendothelzellen. Percoll besteht aus kolloidalen SiO_2 -Partikeln, die mit Polyvinylpyrrolidon überzogen sind und erlaubt eine isopyknische Trennung von Zellen. Aufgrund des inerten und nicht toxischen Charakters werden Morphologie und Vitalität der Zellen durch die Percoll-Dichtezentrifugation nicht beeinträchtigt. [227] Die Kapillarendothelzellen befanden sich nach der Zentrifugation in der Interphase und konnten aus dieser isoliert werden (s. Abbildung 4.76). In der oberen Phase des Gradienten befanden sich Zelltrümmer, Verunreinigungen und Myelin. Erythrozyten fanden sich als Pellet in der unteren Phase wieder (s. Abbildung 4.76).



Abbildung 4.76

Absaugen der in der Interphase befindlichen Kapillarendothelzellen (links), „Zellwölkchen“ in der Pipette nach dem Absaugen (rechts)

4.3.2.1 Aufnahmeexperimente mit PBCEC

Aufnahmeexperimente mit primären Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn sollten Aufschluss über den Mechanismus der Aufnahme von beladenen PBCA-NP in das Gehirndothel geben und wie sie mit der BHS interagieren und deren Integrität beeinflussen.

Hierzu gibt es einige Arbeiten, die zeigen, dass die mit P-80 beschichteten NP im Blutstrom Apolipoproteine wie Apolipoprotein AI oder Apolipoprotein E an ihre Oberfläche adsorbieren [228;229], als maskierte NP an einen Lipoprotein-Rezeptor (z.B. LDL-Rezeptor) binden können und per rezeptorvermittelter Endozytose bzw. Transzytose ins Gehirn gelangen [206;230-236].

Da es viele verschiedene NP-Formulierungen gibt, sollte nun bei der in der vorgelegten Arbeit verwendeten Formulierung gezeigt werden, ob der oben beschriebene Mechanismus auch in diesem Fall so zutrifft oder ob es möglicherweise andere Wege und Interaktionen gibt. Denn die von der Firma NanoDel Technologies GmbH hergestellten NP wurden nach einem etwas anderen Verfahren hergestellt als die PBCA-NP anderer Arbeitsgruppen. Meist wurde der Stoff für die Beladung an die Oberfläche adsorbiert [205;206;231;237-240]. Bei der hier verwendeten Zubereitung wurde dieser Stoff beim Herstellungsverfahren mit in die NP eingeschlossen und ein Teil wurde natürlich auch an die Oberfläche der NP adsorbiert [2;241].

Des Weiteren gibt es Anhaltspunkte, dass PBCA-NP bei Zellen toxische Reaktionen hervorrufen. Zum einen scheint die Oberflächenladung der NP eine große Rolle dabei zu spielen [242], ob die NP in Kapillarendothelzellen aufgenommen werden. Zum anderen kann auch die Integrität der BHS von der Oberflächenladung beeinflusst werden. So zeigten positiv geladenen NP schnell *in vivo* schnell toxische Effekte, negativ geladene NP hingegen erst ab bestimmten Konzentrationen. Neutrale NP wiederum zeigten den geringsten Einfluss auf die Integrität der BHS. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme neutraler und geringer Konzentrationen anionischer NP besser funktionierte als die Aufnahme kationischer NP [243]. Es konnte aber im Gegenzug auch gezeigt werden, dass NP mit kationisiertem Albumin *in vitro* keinen Einfluss auf den TEER bei bovinen Kapillarendothelzellen hatten und darüber hinaus besser aufgenommen wurden als NP, die mit normalem Rinderalbumin hergestellt wurden [244]. Hierzu ist allerdings anzumerken, dass es schwierig ist, *in vivo* Experimente mit *in vitro* Versuchen zu vergleichen. Auch bestehen unterschiedliche Ansätze, den Mechanismus der Aufnahme von Nanopartikeln ins Gehirn zu erklären. Schließlich werden die Auswirkungen verschiedener Formulierungen auf die Integrität der BHS sehr unterschiedlich bewertet. Einige Arbeiten demonstrieren generell eine gewisse Toxizität verschiedener NP-Formulierungen *in vivo* (erhöhte Mortalität der Tiere) und *in vitro* (Abnahme des TEER) [245-247].

Aus diesem Grund sollte im Anschluss an die Aufnahmeexperimente auch der Einfluss verschiedener NP-Konzentrationen auf den Metabolismus der Zellen als indirekter Nachweis von Toxizität mit Hilfe des AlamarBlue™ Assays untersucht werden.

4.3.2.1.1 Aufnahmeexperimente in 96-Well Platten

Es erfolgte die Durchführung von Experimenten zur Aufnahme in die Kapillarendothelzellen mit den in 96-Well Platten kultivierten PBCEC's. Zunächst wurden diese Experimente standardmäßig in serumfreiem Medium durchgeführt und lediglich der Einfluss einer Oberflächenmodifikation der PBCA-NP mit P-80 untersucht. Per mg NP-Feststoff wurden 0,1 mg P-80 zugesetzt. Dies entsprach einem Zehntel der Konzentration der *in vivo* Versuche, da sich die P-80 Konzentration *in vivo* im Blutstrom durch Verdünnung verringert. So wurden die

4. Ergebnisse und Diskussion

PBCA-NP entsprechend in einer Konzentration von 30 µg/ml Feststoffgehalt eingesetzt, um diese Verdünnung im Blutstrom mit zu berücksichtigen. Abbildung 4.77 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

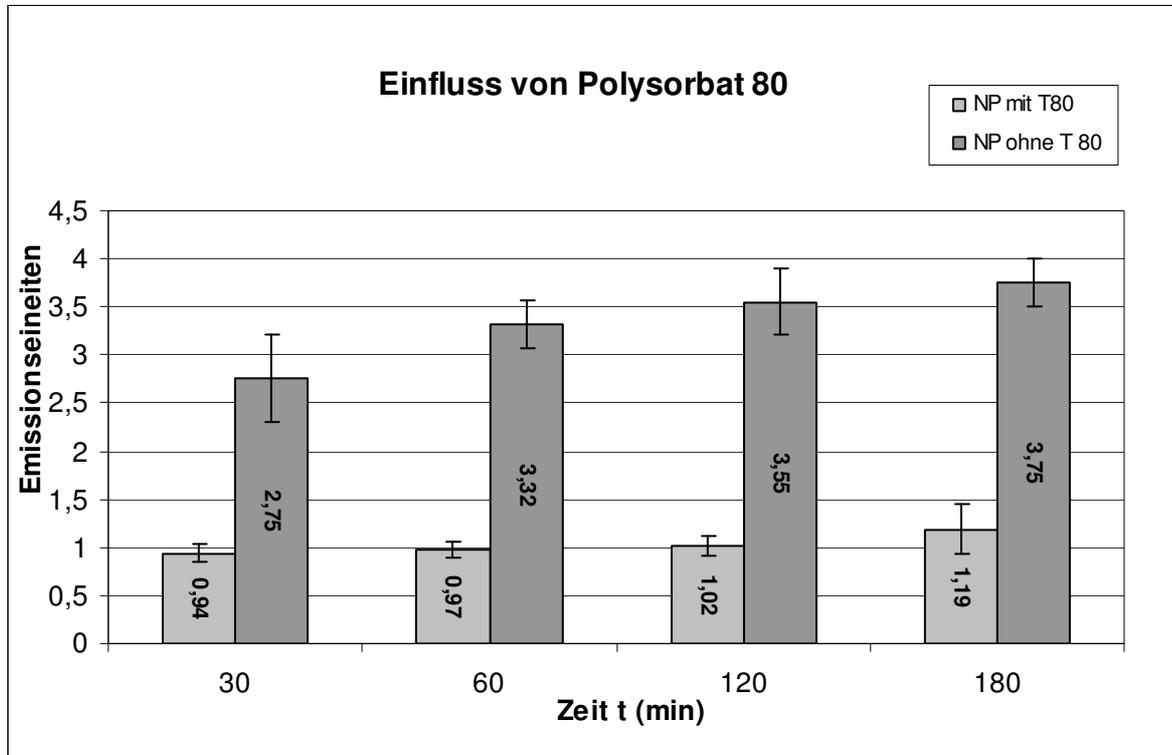


Abbildung 4.77

Vergleich der Aufnahme von Rhodamin 123 markierten PBCA-NP in PBCEC mit und ohne P-80 Coating

Die Werte beider NP-Zubereitungen steigen über die Zeit an. Allerdings ist ersichtlich, dass die Emissionswerte der PBCA-NP ohne P-80-Coating um ein 3 bis 3,5 faches höher sind als die Werte der oberflächenmodifizierten NP-Zubereitung. Dies ist verwunderlich, da die *in vivo* Ergebnisse eindeutig zeigen, dass eine Oberflächenmodifikation mit P-80 zwingend erforderlich ist, um die BHS zu überwinden. Auch gibt es veröffentlichte Daten, die zeigen, dass ein Coating mit P-80 nach 4h in einer 3,7 fachen Aufnahme der PBCA-NP resultiert [240]. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass es sich um bovine und humane primäre Kapillarendothelzellen handelte und dass in diesen Studien bei den Aufnahmeexperimenten mit serumhaltigem Medium gearbeitet wurde. Trotzdem stellte sich die Frage, warum die Emission bei der Zubereitung ohne P-80 wesentlich höher lag. Deshalb wurde im folgenden Versuch die Interaktion zwischen PBCA-NP

und PBCEC und vor allem der Einfluss einer Oberflächenmodifikation mit P-80 auf die Aufnahme von NP in PBCEC mittels konfokaler Laser-Mikroskopie betrachtet, was mit Hilfe von *Chamberslides* möglich war.

4.3.2.1.2 Qualitative Untersuchungen in Chamberslides

In den durchgeführten Versuchen wurden zwei verschiedene Nanopartikel-Konzentrationen (100 $\mu\text{g/ml}$ und 1000 $\mu\text{g/ml}$) getestet. Es wurden sowohl Phasenkontrastbilder als auch Fluoreszenzbilder aufgenommen, um eventuell vorhandene Löcher im Zelllayer zu finden und um damit auf den Zustand der Zellen schließen zu können. In Abbildung 4.78 ist die konfokal mikroskopische Fluoreszenzaufnahme der PBCEC mit Rhodamin 123 markierter PBCA-NP der Konzentration 0,1 mg/ml dargestellt.

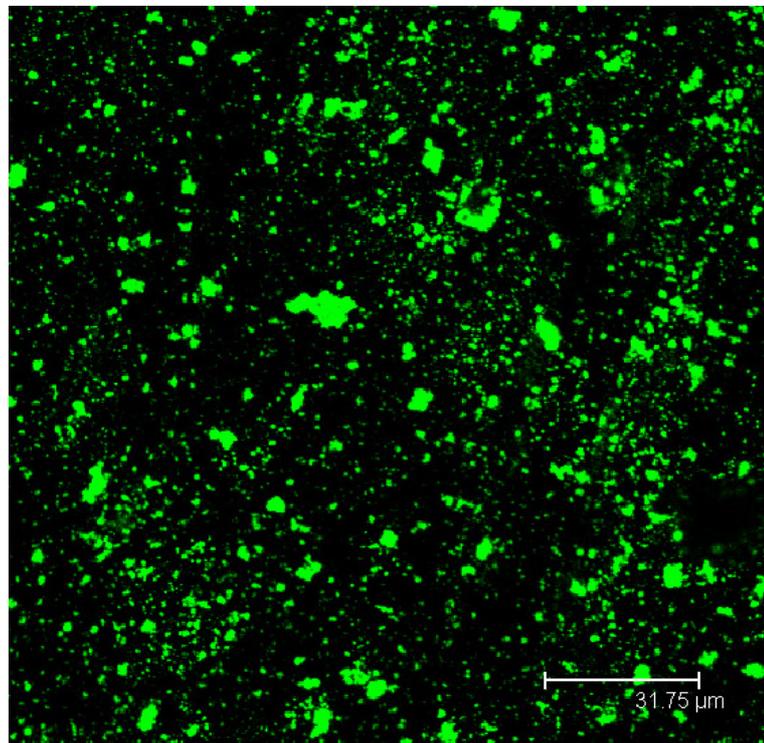


Abbildung 4.78

Konfokal-mikroskopische Aufnahme von mit 0,1 mg/ml PBCA-NP inkubierten PBCEC'S. Die Nanopartikel waren mit Rhodamin 123 markiert. Inkubationszeit: 2 h. Es ist eine diffuse Verteilung der NP ohne Zellassoziation erkennbar.

Für Nanopartikel der Konzentration 100 $\mu\text{g/ml}$ ohne *Coating* mit P-80 ergab sich eine sehr diffuse Verteilung der Nanopartikel ohne erkennbare zellassoziierte Fluoreszenz (Abbildung 4.78). Da keine Zellkerne zu erkennen sind, ist davon auszugehen, dass

4. Ergebnisse und Diskussion

die PBCA-NP adsorptiv an die Zellen angelagert und vermutlich nicht internalisiert wurden. Die Fluoreszenz ist zwar sehr hell, aber nicht genau zu lokalisieren.

Die Inkubation mit den durch P-80 oberflächenmodifizierten PBCA-NP ($c = 100 \mu\text{g/ml}$) ergab eine zwar schwächere, aber dafür deutlich zellassoziierte Fluoreszenz. Die Struktur der Kapillarendothelzellen ist im Fluoreszenzbild (Abbildung 4.79) gut erkennbar, wobei die PBCA-NP in den Bereichen des Zytoplasmas lokalisiert sind.

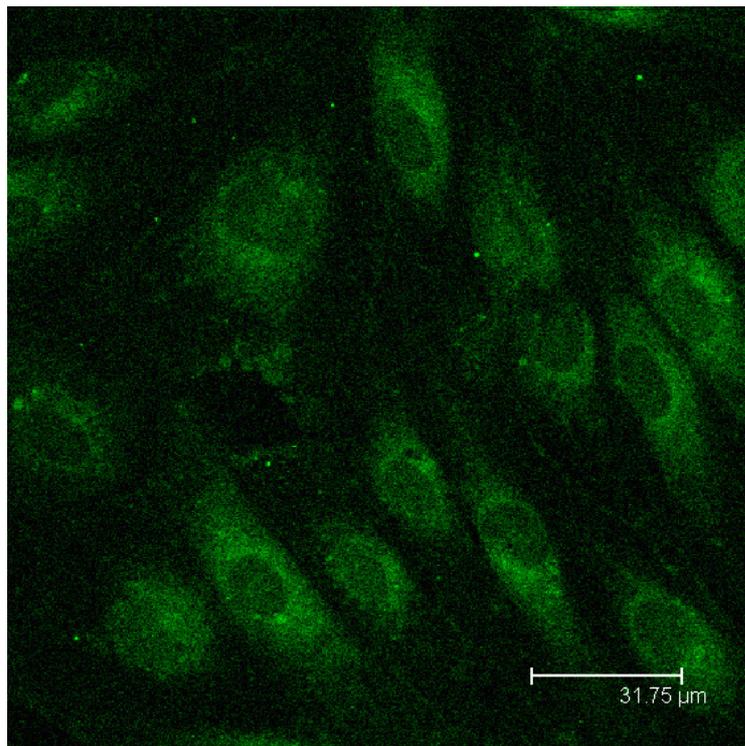


Abbildung 4.79

Konfokal-mikroskopische Aufnahme von PBCEC mit $100 \mu\text{g/ml}$ P-80 beschichteten PBCA-NP. Inkubationszeit: 2h. Die NP waren mit Rhodamin 123 markiert. Die Struktur der PBCEC, sowie eine zellassoziierte Fluoreszenz sind erkennbar

Die Zellkerne sind als dunklere, runde bzw. ovale Zonen innerhalb der Zellen sichtbar. Im Bereich des Zellkerns konnte keine Fluoreszenz detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die Nanopartikel in die Zelle aufgenommen und nicht –wie bei PBCA-NP ohne P-80– adsorptiv angelagert wurden.

Die konfokal-mikroskopische Aufnahme von PBCEC mit $1000 \mu\text{g/ml}$ PBCA-NP ohne Oberflächenmodifikation ist Abbildung 4.80 zu entnehmen. Es konnte aufgrund der höheren NP-Konzentration eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität als bei

100 µg/ml NP detektiert werden. Die PBCA-NP wiesen eine zellassoziierte Verteilung auf. Allerdings waren keine Zellkerne, die als dunklere rundliche Zonen innerhalb der Zelle sichtbar wären, erkennbar. Die Fluoreszenz ist somit wiederum an der Zelloberfläche lokalisiert und diese NP-Zubereitung fluoresziert heller als die Zubereitung mit P-80-Zusatz. In die Zellen aufgenommen werden allerdings nur die NP mit P-80 Modifikation.

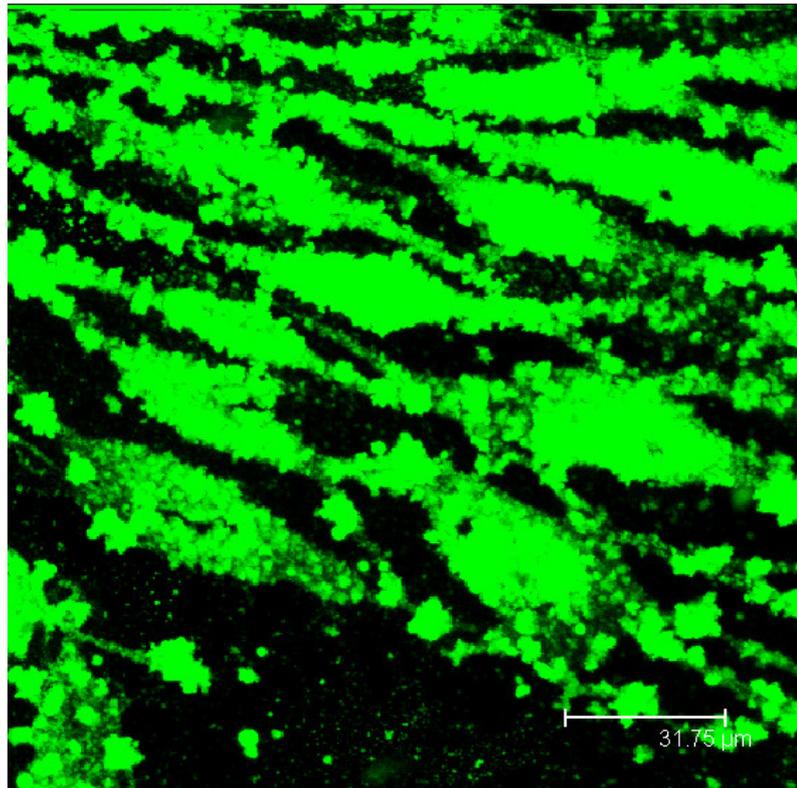


Abbildung 4.80

Konfokal-mikroskopische Aufnahme von PBCEC'S mit 1000 µg/ml PBCA-NP (ohne P-80). NP-Inkubationszeit: 2 h. Die Nanopartikel waren mit Rhodamin 123 markiert. Es konnte eine stärkere Fluoreszenz als bei einer NP-Konzentration von 100 µg/ml detektiert werden.

Rhodamin 123 markierte PBCA-Nanopartikel, die mit P-80 beschichtet wurden, weisen im Gegensatz zu den Nanopartikeln ohne

eine deutliche Assoziation mit den PBCEC'S auf (Abbildung 4.81). Die charakteristische längliche Form der PBCEC und der im Inneren der Zelle dunkel erscheinende Zellkern sind in der konfokal-mikroskopischen Aufnahme deutlich erkennbar. Das Erkennen der Zellstrukturen lässt darauf schließen, dass die

4. Ergebnisse und Diskussion

Fluoreszenz nicht an der Zelloberfläche lokalisiert ist und die PBCA-NP in die Kapillarendothelzellen aufgenommen wurden.

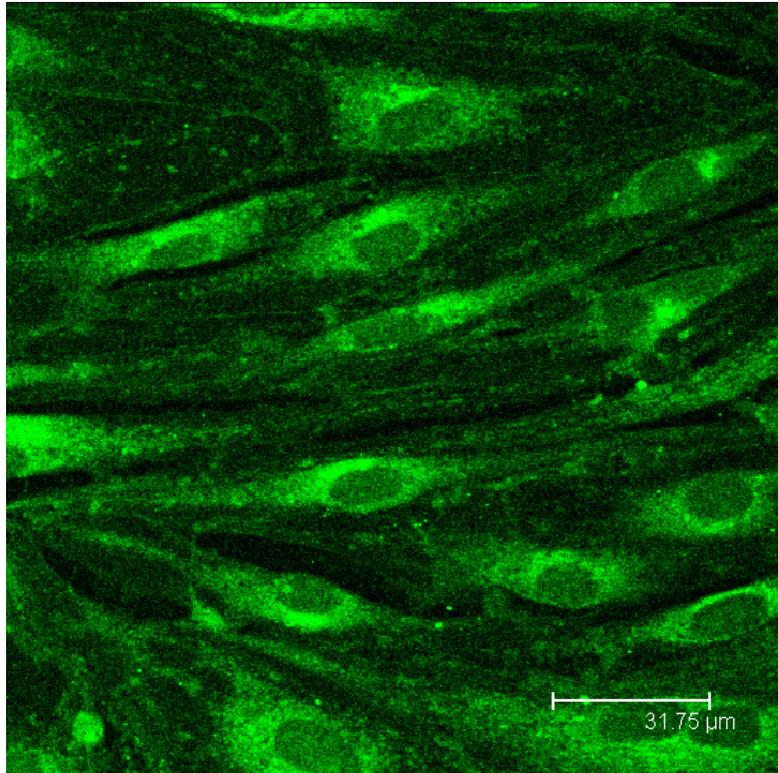


Abbildung 4.81

Konfokal-mikroskopische Aufnahme der Interaktion zwischen mit P-80 gecoateten PBCA-NP und PBCEC. Die Inkubation mit PBCA-NP erfolgte für 2 h. Die NP waren Rhodamin 123 markiert. Die Fluoreszenz ist im Gegensatz zu unbeschichteten PBCA-NP deutlicher mit den Zellen assoziiert.

Mit P-80 beschichtete Nanopartikel werden diesen Ergebnissen zu Folge besser in PBCEC aufgenommen als PBCA-NP ohne Oberflächenmodifikation. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob die Nanopartikel in einer hohen (1 mg/ml) oder einer geringen Konzentration (0,1 mg/ml) eingesetzt werden. Bei hoher Nanopartikel-Konzentration ist lediglich die Fluoreszenzintensität höher als bei geringen Konzentrationen.

PBCA-NP ohne Oberflächenmodifikation lagern sich offensichtlich adsorptiv an die Zellen an, während mit P-80 gecoatete PBCA-NP gut in PBCEC aufgenommen werden und keine adsorptive Anlagerung zeigen. Dies äußert sich in den konfokal-

4. Ergebnisse und Diskussion

mikroskopischen Aufnahmen in einer zellassozierten Fluoreszenz der P-80 beschichteten NP im Bereich des Zytosols und dem dunkel scheinenden Zellkern. Für Nanopartikel ohne Oberflächenmodifikation konnte bei den eingesetzten Konzentrationen lediglich eine adsorptive Anlagerung der Nanopartikel an die Zellen festgestellt werden.

Diese Experimente erklären die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen mit 96-Well Platten (4.3.2.1.1). Auch hier hatte die NP-Zubereitung ohne P-80 *Coating* heller fluoresziert. Vor dem Hintergrund, dass diese vor allem in einer starken Adsorption an die Zelloberfläche begründet ist und nicht zwangsläufig auf eine bessere Aufnahme in die Zelle schließen lässt, zeigt sich nun auch *in vitro*, dass eine Oberflächenmodifikation mit P-80 für eine Aufnahme in die Zellen notwendig ist.

Frühere Untersuchungen zeigten ebenfalls einen verbesserte Nanopartikel-Aufnahme in zerebrale Kapillarendothelzellen für PBCA-NP mit einer P-80 Oberflächenmodifikation. Hierbei schienen die NP nicht an die Zelloberfläche zu adsorbieren, denn in diesem Fall war auch die Fluoreszenzintensität der mit P-80 modifizierten NP höher [240]. Die Aufnahme von PBCA-NP in bovine Kapillarendothelzellen mit einer P-80 Oberflächenmodifikation stieg nach 4 Stunden um die 3,7fache Fluoreszenzintensität gegenüber unbeschichteten Nanopartikeln an.

Dass die NP ohne P-80 Modifikation so stark an die Zellen adsorbieren, könnte mit dem Umstand zu erklären sein, dass sich der Zusatz von P-80 stabilisierend auf die NP-Suspension auswirkt, die Partikel dadurch weniger aggregieren, nicht so schnell absinken und besser aufgenommen werden können. Bei starker Verdünnung der NP für verschiedene Experimente tauchte gelegentlich das Problem auf, dass die NP aggregierten und bei Zubereitungen mit P-80-Zusatz trat eine Aggregation kaum auf.

Ein direkter Mechanismus, der der Aufnahme von Nanopartikeln in PBCEC zugrunde liegt, konnte mit diesen Ergebnissen noch nicht ermittelt werden. Die Aufnahme von mit P-80 beschichteten PBCA-NP in die Zellen gegenüber der Oberflächenadsorption dieser bei Nanopartikeln ohne diese Oberflächenmodifikation lässt darauf schließen, dass P-80 eine wichtige Rolle bei der Aufnahme in die Zelle spielt.

Allerdings stellte sich nun die Frage, warum eine Aufnahme der gecoateten NP erfolgte, obwohl keine Lipoproteine vorhanden waren, denn es wurde in serumfreiem

Medium gearbeitet. Es gibt viele Arbeiten zur P-80-vermittelten Adsorption von Apolipoproteinen (meist Apolipoprotein E) an NP [228;229]. Diese können anschließend an einen Lipoprotein-Rezeptor binden und per rezeptorvermittelter Endozytose bzw. Transzytose ins Gehirn gelangen [206;230-236].

4.3.2.1.3 Serum-vermittelte Aufnahme von NP in PBCEC

In den folgenden Versuchen sollte der Einfluss von Serum auf die Aufnahme von Rhodamin 123 beladenen P-80 gecoateten NP in PBCEC untersucht werden. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass Apolipoproteine vorhanden sind, die an NP adsorbieren können, um den Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose über einen Lipoproteinrezeptor zu ermöglichen.

Hierzu wurden PBCEC in 96-Well Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Die für den Versuch den Zellen zugesetzte Menge NP betrug 30 µg/ml NP-Feststoff und 0,1 mg P-80 per mg NP-Feststoff. Es gab zwei Versuchsgruppen: Einem Teil wurden 25 % NCS zugesetzt, dem anderen hingegen nicht. Abbildung 4.82 zeigt den Verlauf der Inkubationszeiten mit und ohne Serumzusatz.

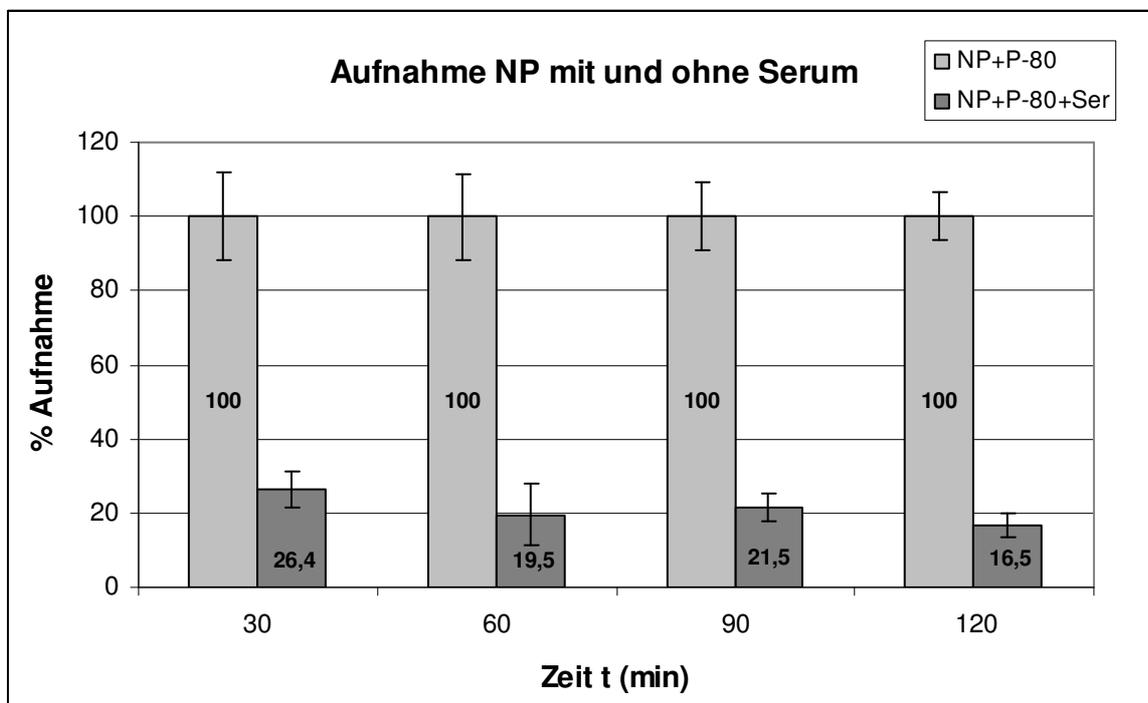


Abbildung 4.82

Einfluss von Serum auf die Aufnahme von PBCA-NP in PBCEC. Unter Serumzusatz ist die Aufnahme der NP in die Zellen deutlich gehemmt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Entgegen der Erwartungen zeigte sich, dass der Zusatz von Serum die Aufnahme der NP massiv hemmte. Eigentlich sollte die Aufnahme von NP in die Kapillarendothelzellen durch das Vorhandensein von Apolipoproteinen im Inkubationsmedium verbessert werden, wie bereits von anderen beschrieben wurde [240]. Auch wenn in diesem Fall grundsätzlich eine Aufnahme in serumhaltigem Medium erfolgte, entsprachen die Werte im oben gezeigten Ergebnis entsprechen beinahe den Blindwerten. Die aufgenommene Menge NP in Serum war extrem gering (absolute Werte nicht dargestellt).

Zur Aufnahme von Nanopartikeln *in vitro* existieren verschiedene Arbeiten mit zum Teil kontroversen Ergebnissen: Wie oben bereits erwähnt, stieg in einer Studie die Aufnahme an PBCA-NP in die Zellen in Apolipoprotein freiem Serum stark an, zum anderen war die Aufnahme mit dem Phagozytoseinhibitor Cytochalasin B hemmbar [240]. Dies spricht zwar für einen endozytotischen Prozess der Aufnahme, allerdings nicht zwangsläufig für den einer rezeptorvermittelten Endozytose. Cytochalasin B hemmt die Mikrofilamente in Zellen, sowie den Glukosetransport [248-251]. Allerdings könnte es sich auch um eine allgemeine Phagozytose handeln

Eine Arbeit mit Protamin-NP zeigte, dass eine kovalente Bindung des Apolipoprotein AI gegenüber unbehandelten NP zu einer besseren Aufnahme in bovine zerebrale Kapillarendothelzellen führte [231]. Eine Hemmung des HDL-Rezeptors, welcher für die Aufnahme von Apolipoprotein AI verantwortlich ist, inhibierte die Aufnahme der „Proticles“. Allerdings muss beachtet werden, dass diese NP aufgrund ihres Materials positiv geladen sind. Der isoelektrische Punkt des Protamin liegt bei pH 11,2, da es sehr reich an der Aminosäure Arginin ist. Somit erscheint es auch möglich, dass diese Nanopartikel an die Zelloberfläche adsorbieren und in Verbindung mit Apolipoprotein AI besser aufgenommen werden, da ein zweiter Mechanismus der Aufnahme über den HDL-Rezeptor möglich ist. In der Literatur wird im Zusammenhang mit dem Aufnahmemechanismus von PBCA-NP meist nur vom LDL-Rezeptor gesprochen [232;252;253]. Nun aber zeigt die Arbeit mit den Protamin-NP, dass es durchaus auch andere Wege geben könnte, wie beispielsweise jenen über den HDL-Rezeptor.

Es wird in der Literatur beschrieben, dass sich an P-80 gecoatete Lipid-Nanopartikel unterschiedliche Apolipoproteine anlagerten, je nach Art des Plasmas mit dem die

Nanopartikel inkubiert wurden [228;229;254]. So wurde im menschlichen Plasma vor allem die Adsorption der Apolipoproteine AI, AIV und E gefunden und im Mäuseplasma nur die Apolipoproteine AI und AIV, während E nicht sicher nachzuweisen war [228]. Somit kann wahrscheinlich nicht generell davon ausgegangen werden, dass Apolipoprotein E als LDL-Rezeptorligand fast ausschließlich für die Aufnahme von P-80 gecoateten Nanopartikeln ins Gehirn verantwortlich ist. Dies wird vielmehr je nach Spezies unterschiedlich sein, da sich unterschiedliche Apolipoproteine an die NP anlagern. *In vivo* ließ sich mehrfach belegen, dass eine kovalente Bindung von Apolipoproteinen an Nanopartikel zu einer verbesserten Aufnahme ins Gehirn oder zu einer analgetischen Wirkung führte, nachdem die NP mit dem Peptid Darlargin oder Loperamid beladen wurden. Beide Substanzen zeigen bei normaler Applikation keinen zentralen Effekt [232;233;235]. Allerdings können diese Ergebnisse wohl nicht direkt auf die Situation *in vitro* übertragen werden. Aber auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass eine Modifikation von NP-Zubereitungen mit Apolipoprotein E zu einer vermehrten Aufnahme in zerebrale Kapillarendothelzellen führte und es durch die Blockade des LDL-Rezeptors zu einer Hemmung der Aufnahme kam [230;235]. Hier wurde allerdings mit Zelllinien gearbeitet, nicht mit Primärzellen.

So kann es also sein, dass eine kovalente Bindung von Apolipoprotein E an etwa Albumin-NP eine bessere Aufnahme ins Gehirn zeigt, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* [235]. Jedoch muss dies nicht bedeuten, dass die Adsorption des Apolipoprotein E an die NP der einzige Mechanismus der Aufnahme sein muss. Es könnte schlichtweg auch als Modifikation der NP gewertet werden mit dem Ziel LDL-Rezeptor. Es scheint sich bei der Aufnahme allerdings um einen zytotischen Prozess zu handeln.

Abschließend lässt sich sagen, dass bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten die Möglichkeit besteht, dass es durch den Zusatz von Serum zu einer kompetitiven Hemmung durch zu zahlreich vorhandene Apolipoproteine gekommen ist. Indes ist unklar, warum dann in diesem Fall bei Abwesenheit von Apolipoproteinen überhaupt eine Aufnahme in die Zellen erfolgte (s. Kapitel 4.3.2.1.1, 4.3.2.1.2) und warum es in einer anderen Arbeit auch gerade bei PBCA-NP zu einer verbesserten Aufnahme in Apolipoprotein freiem Medium kam [240]. Vermutlich

besteht ein großer Unterschied zwischen PBCA-NP und anderen NP-Formulierungen einerseits und den Zelllinien und Primärzellen verschiedener Spezies andererseits sowie der generellen Situation *in vivo*. Der Mechanismus der Aufnahme von PBCA-NP in das Gehirn über eine rezeptorvermittelte Endozytose via LDL-Rezeptor konnte hiermit nicht sicher belegt, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Vermutlich besteht der tatsächliche Aufnahmemechanismus der Partikel aus einer Kombination mehrerer Mechanismen.

4.3.2.2 AlamarBlue™ Assay

Der AlamarBlue™ Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um zu klären welche Auswirkungen verschiedene PBCA-NP Konzentrationen auf den Stoffwechsel von zerebralen Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn haben. Es sollte herausgefunden werden, ob PBCA-NP den Zellstoffwechsel beeinflussen oder gar schädigen können. Im Folgenden werden die Schaubilder der untersuchten Inkubationszeiten (30, 60, 120, 180 und 240 min) analysiert und mögliche Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel diskutiert. Da insgesamt 8 verschiedene NP-Konzentrationen getestet wurden, sind in den Schaubildern der Übersicht halber jeweils nur vier Konzentrationen aufgetragen. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von drei Stunden.

Der AlamarBlue™-Assay zeichnet sich durch eine sehr einfache Anwendung aus. AlamarBlue™ (Resazurin) ist ein wasserlöslicher, nicht-toxischer blauer Farbstoff, welcher von Zellen aufgenommen und in den Zellen entsprechend ihrer proliferativen Aktivität zu einem pinkfarbenen und fluoreszierenden Farbstoff (Resorufin) reduziert wird. Indirekt wird mit Hilfe dieses Tests die katalytische Wirkung NADPH/NADH-abhängiger Dehydrogenasen in den Zellen sichtbar gemacht. In proliferierenden Zellen ist das Verhältnis von NADPH/NADP und NADH/NAD in Richtung NADPH bzw. NADH verschoben. Die durch die Reduktion entstehende Farbentwicklung kann spektrophotometrisch oder fluorimetrisch gemessen werden. Es wird also indirekt die mitochondriale metabolische Aktivität der Zellen gemessen [255-257].

Im Folgenden werden die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der

4. Ergebnisse und Diskussion

GraphPad Prism[®] Software mit dem ANOVA Test. Der Angabe von Sternen liegen folgende P-Werte zugrunde:

P-Werte und Signifikanz:

< 0.001	***
< 0.01	**
< 0.05	*
> 0.05	keine

30 min Vorinkubation

In der nachfolgenden Abbildung 4.83 ist die prozentuale mitochondriale Stoffwechselaktivität für verschiedene PBCA-NP Konzentrationen bei einer NP-Vorinkubationszeit von 30 min dargestellt.

Bei einer 30-minütigen Vorinkubation mit PBCA-NP der Konzentrationen 15, 30, 60 und 120 µg/ml ist eine leichte Zunahme des Stoffwechsels auf etwa 125 % zu verzeichnen. Bei allen NP-Konzentrationen steigt die mitochondriale Stoffwechselaktivität langsam an. Nach drei Stunden ist der Einfluss von Nanopartikeln der Konzentrationen 30, 60 und 120 µg/ml auf den Zellstoffwechsel statistisch signifikant (**) gegenüber dem Kontrollwert. Bei einer Konzentration von 15 µg/ml konnte keine Signifikanz verzeichnet werden.

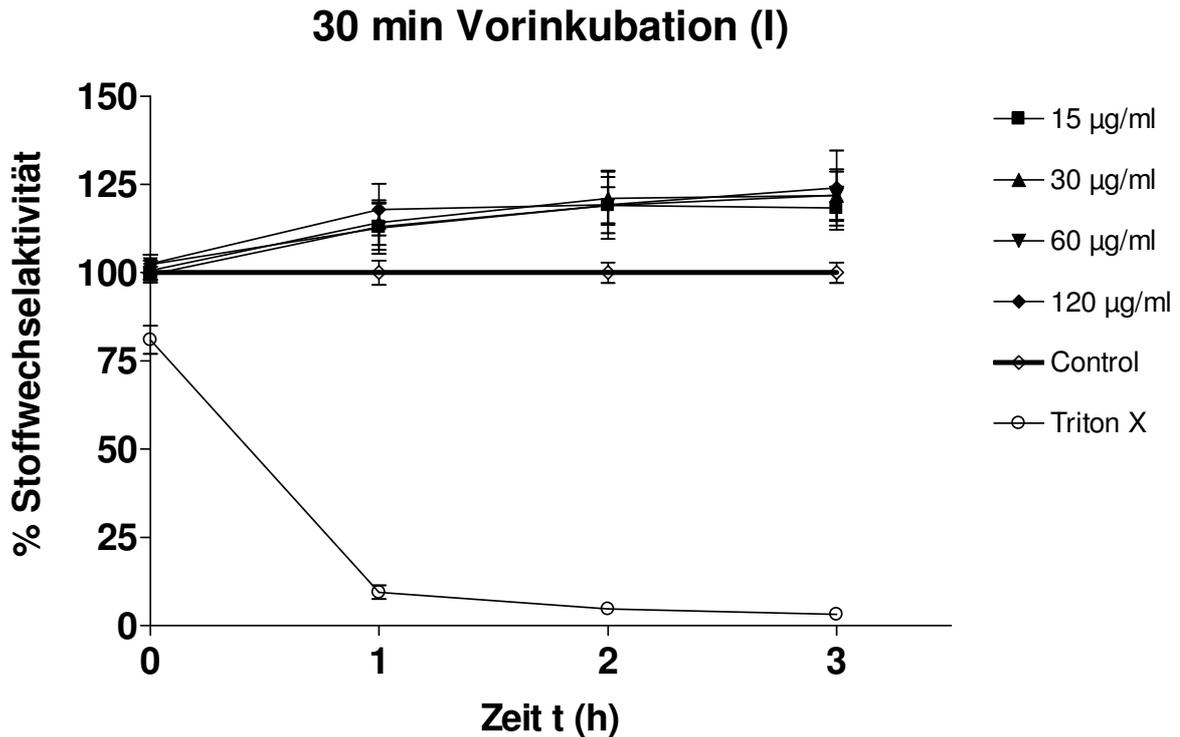


Abbildung 4.83

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 30-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen NP-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 15, 30, 60 und 120 µg/ml NP, sowie 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Werte (PBCEC mit Triton X-100 lysiert).

Ein Wert des Stoffwechsels auf Kontroll-Niveau kann bei keiner der eingesetzten Konzentrationen beobachtet werden. Zudem scheinen die NP in diesen Konzentrationen lediglich zu einer Anregung des Stoffwechsels zu führen und nicht zu einer Schädigung der Zellen.

In nachfolgender Abbildung 4.84 sind die Kurvenverläufe für eine Vorinkubation von 30 min mit höheren NP-Konzentrationen (240, 480, 960 µg/ml und 2 mg/ml) dargestellt. Ebenfalls aufgetragen sind die Verläufe für den Kontrollwert (Control) und Triton-X. Die mitochondriale Metabolisierung bei NP-Konzentrationen von 240 und 480 µg/ml liegt auf dem Niveau des 100 %-Kontrollwerts, die Abweichungen vom Kontrollwert weisen keinerlei Signifikanz auf. Dies würde bedeuten, dass der Stoffwechsel für diese Konzentrationen auch nach 3h auf einem 100 %-Niveau bleibt und nicht beeinflusst wird.

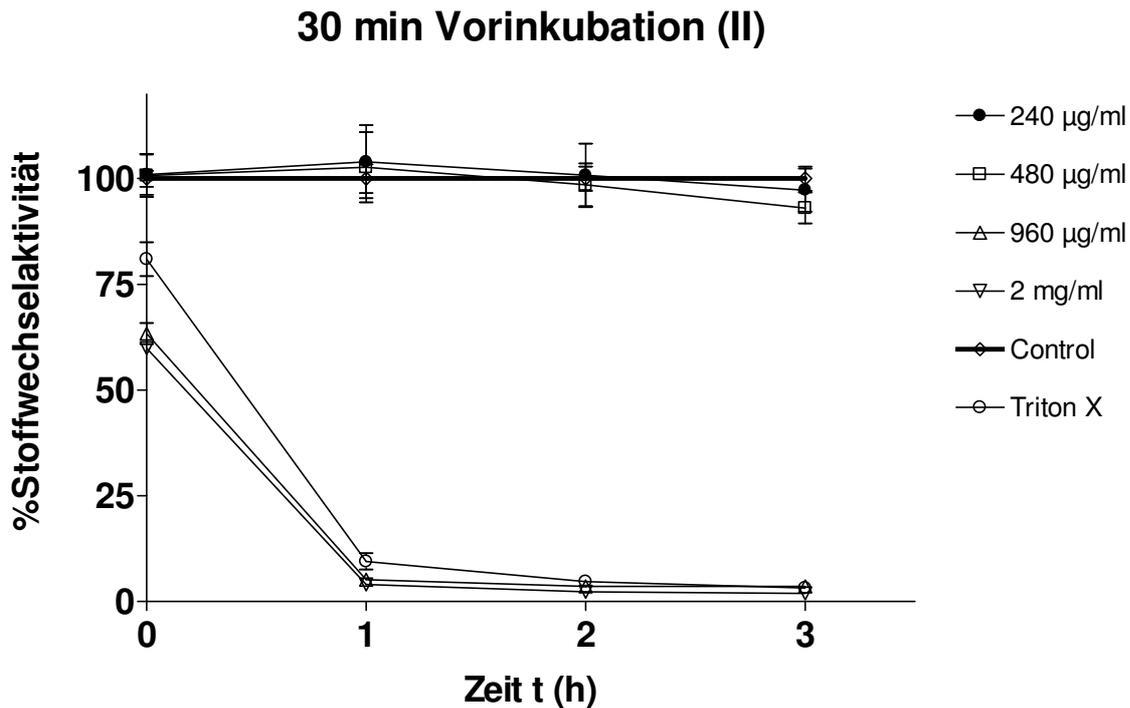


Abbildung 4.84

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 30-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen NP-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 240, 480, 960 µg/ml und 2 mg/ml NP, sowie zur Kontrolle 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Werte (PBCEC mit Triton X-100 lysiert).

Für die NP-Konzentrationen von 960 µg/ml und 2 mg/ml konnte indes eine signifikante Abnahme (***) des Zellstoffwechsels festgestellt werden, welche nach einer Stunde bereits auf Niveau des Verlaufs für mit Triton-X-100 behandelte Zellen sank. Dies deutet auf eine sehr starke Schädigung der Zellen bzw. auf ein Erliegen der mitochondrialen Aktivität durch hohe Konzentrationen von PBCA-NP hin. Ein Aktivitätsverlust der Mitochondrien hat eine schlechtere Energieversorgung der Zelle zu Folge, was sich in der hier entdeckten verminderten Viabilität äußert.

Es sei jedoch anzumerken, dass eine Vorinkubation mit PBCA-NP in hohen Konzentrationen von 960 µg/ml und 2 mg/ml zu einer sichtbaren Anlagerung der Nanopartikel an den Boden der Wells geführt hat. Die Nanopartikel konnten auch nach mehrmaligem Waschen nicht vollständig entfernt werden und dürften so zu einer Beeinflussung der Fluoreszenzmessung geführt haben. Auch der erste Wert bei 0 min der NP-Konzentration von 960 µg/ml bzw. 2 mg/ml ist im Gegensatz zum ersten Wert anderer NP-Konzentrationen zu niedrig, er liegt deutlich unter 100 %. Da

die Messung von diesem Wert unmittelbar nach der Zugabe des AlamarBlue™ erfolgte und noch keine nennenswerte Umsetzung des Farbstoffs stattgefunden haben kann, ist auszuschließen, dass der Stoffwechsel durch die NP zu diesem Zeitpunkt bereits so stark beeinträchtigt gewesen sein konnte. Vermutlich erfolgte eine Fluoreszenzlöschung (Quenching) durch diese hohen NP-Konzentrationen.

60 min Vorinkubation

Abbildung 4.85 zeigt die PBCA-NP Konzentrationen 15, 30, 60 und 120 µg/ml und deren Auswirkungen auf den Stoffwechsel von PBCEC, sowie die Kontrollwerte (Control, Triton-X) bei einer 60minütigen Vorinkubation. Ähnlich einer 30 minütigen Vorinkubation zeigte die einstündige Vorinkubation mit PBCA-NP eine Zunahme der Stoffwechselaktivität der PBCEC. Zu Beginn der Messungen liegen alle NP-Konzentrationen auf Höhe des Kontrollwertes. Nach einer Stunde unterscheiden sich 30, 60 und 120 µg/ml NP signifikant von der Kontrolle (**, bei 60 µg/ml ***).

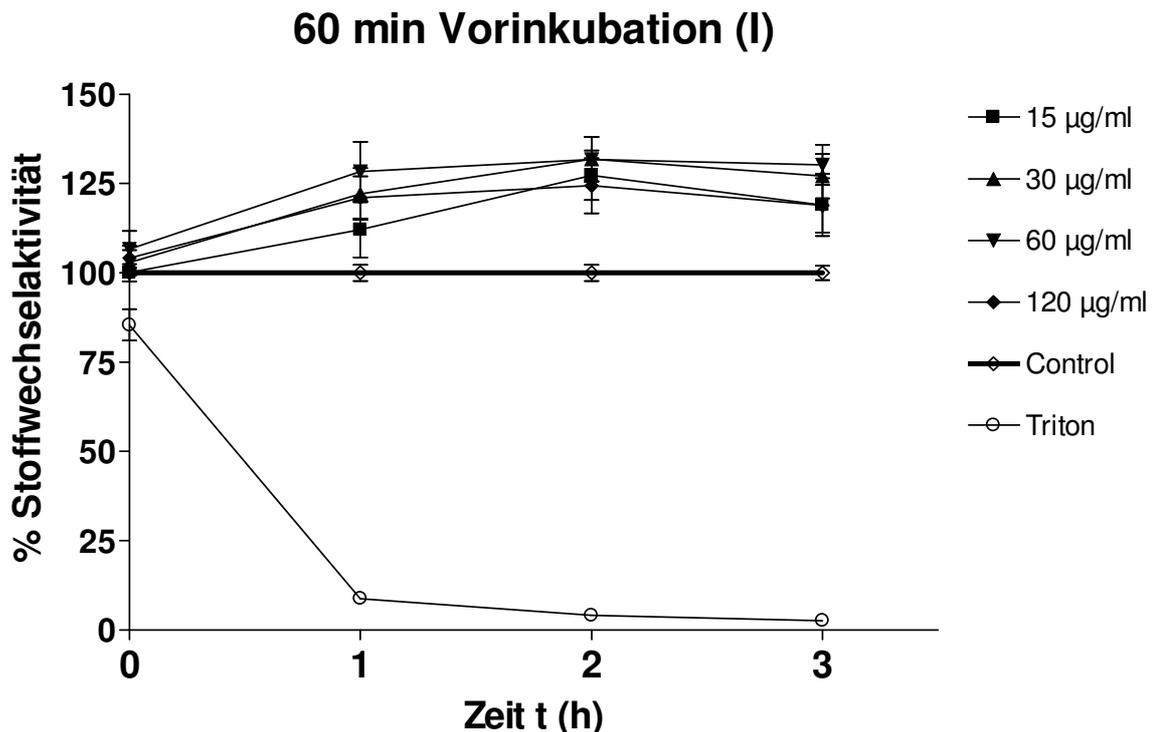


Abbildung 4.85

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 60-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen Nanopartikel-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 15, 30, 60 und 120 µg/ml NP, 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Werte (mit Triton X-100 behandelte PBCECs).

4. Ergebnisse und Diskussion

Die metabolische Aktivität erreicht bei ca. 2 Stunden ihr maximales Niveau (***) . Bei einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ steigt der Stoffwechsel etwas langsamer an, unterscheidet sich erst nach 2h signifikant (*) vom 100 %-Wert (Control) und nimmt nach 3h erneut etwas ab. Verglichen mit einer Vorinkubation von 30 min (Abbildung 4.84) ist die prozentuale Stoffwechselaktivität etwas höher. Eine längere Vorinkubation mit PBCA-NP gleicher Konzentrationen führt demnach zu einer stärkeren Antwort der Zellen bzw. einer erhöhten mitochondrialen Aktivität. Diese Reaktion der Zellen auf die Nanopartikel erholt sich auch nach 3h nicht zurück auf Kontrollniveau.

Abbildung 4.86 zeigt die Ergebnisse einer einstündigen Vorinkubation mit PBCA-NP der Konzentrationen 240, 480, 960 $\mu\text{g/ml}$ und 1 mg/ml. 240 und 480 $\mu\text{g/ml}$ NP führen wie bei einer 30 minütigen NP-Inkubation zu keiner signifikanten Änderung des prozentualen Wertes des Zellstoffwechsels. Eine, wenn auch nicht signifikante Tendenz zur Abnahme des Stoffwechsels ist allerdings zu erkennen.

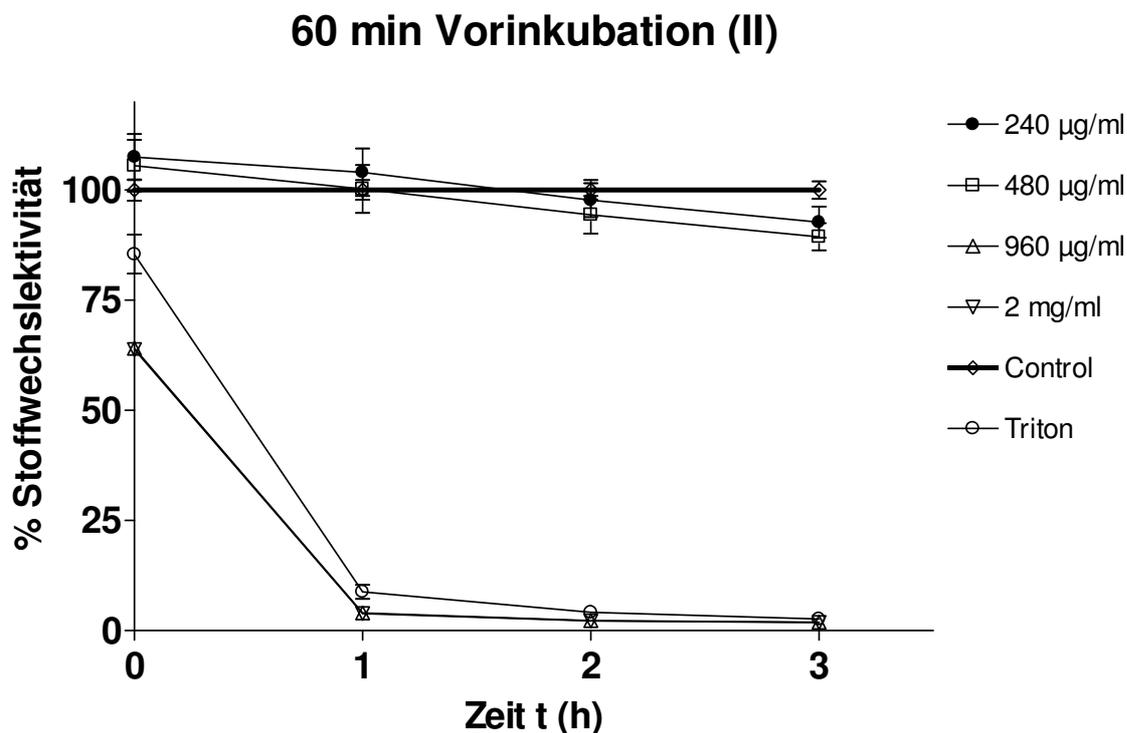


Abbildung 4.86

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 60-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen Nanopartikel-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 240, 480, 960 $\mu\text{g/ml}$ und 2 mg/ml NP, sowie ein 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Wert (PBCEC mit Triton x lysiert).

Die Verläufe für NP-Konzentrationen von 960 µg/ml und 2 mg/ml sind bei dieser Vorinkubationszeit sehr ähnlich. Der zelluläre Metabolismus wurde durch diese hohen Konzentrationen deutlich gehemmt, der Zustand der Zellen weicht allerdings nicht signifikant von den mit Triton X-100 behandelten PBCEC ab. Lediglich der Nullwert der 960 µg/ml und 2 mg/ml Konzentrationen zeigt signifikante Abweichung (***) vom Triton-Wert, allerdings könnten hierfür wie bereits erwähnt Beeinflussungen der Fluoreszenzmessungen durch Quenching der PBCA-NP verantwortlich sein.

120 min Vorinkubation

Der Graph für NP-Konzentrationen von 15-120 µg/ml ist Abbildung 4.87 zu entnehmen. Es kann wie bei den zuvor getesteten Inkubationszeiten (Abbildung 4.83, Abbildung 4.85) eine Stoffwechselzunahme ausgemacht werden. Diese Zunahme ist bei allen eingesetzten NP-Konzentrationen nach einer Stunde signifikant (***). Danach sinkt der Stoffwechsel für eine NP-Konzentration von 15 µg/ml wieder auf ein nicht signifikantes Niveau ab. Die anderen Konzentrationen (30, 60 und 120 µg/ml) weisen allerdings über alle gemessenen Zeitpunkte eine signifikante Erhöhung (***) vom Kontrollwert auf. Des Weiteren ruft die längere Vorinkubationszeit eine stärkere Anregung der mitochondrialen Aktivität hervor als eine einstündige oder 30 minütige Inkubationszeit. Die Aktivität der Zellen normalisiert sich nach 3h ebenfalls noch nicht, was darauf hindeutet, dass die von den PBCA-NP ausgelöste Reaktion der Zellen weiter andauert.

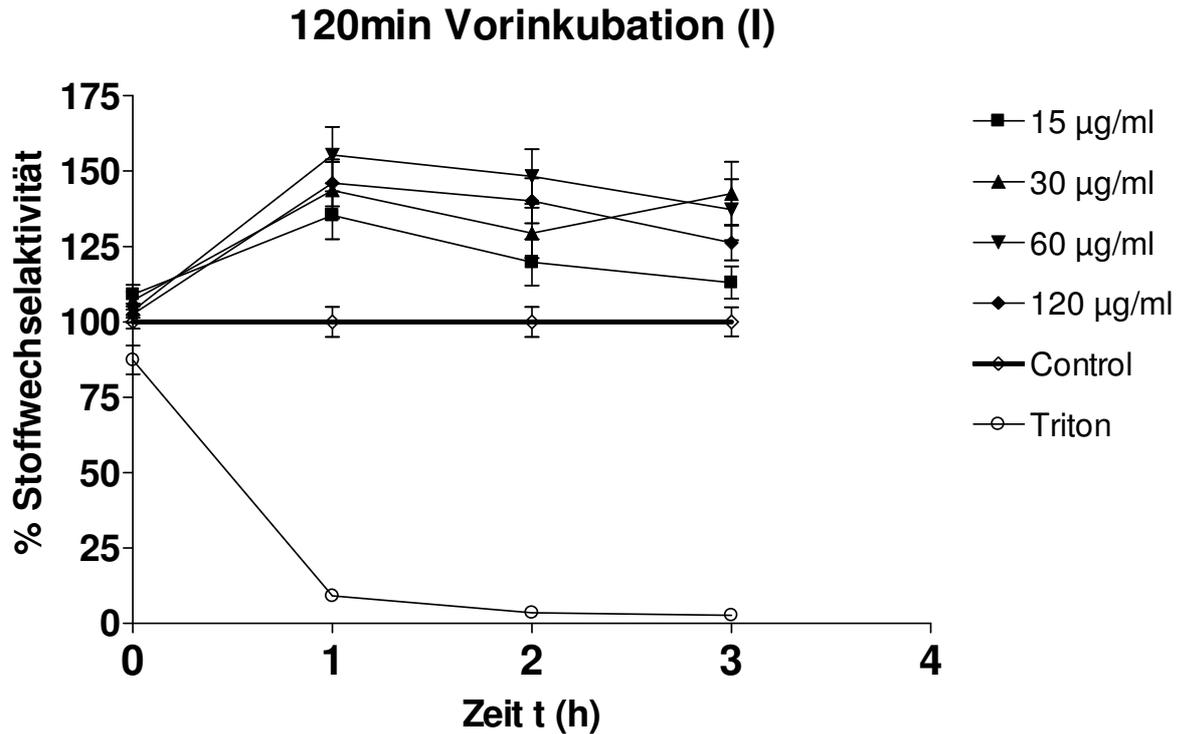


Abbildung 4.87

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 120-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen Nanopartikel-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 15, 30, 60 und 120 µg/ml NP, sowie ein 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Wert (mit Triton X-100 behandelte PBCEC).

Die Auswirkungen auf den PBCEC-Stoffwechsel von NP höherer Konzentrationen sind in Abbildung 4.88 dargestellt. Die NP-Konzentrationen von 240 und 480 µg/ml weisen ebenfalls keine signifikante Auswirkung auf den Zellstoffwechsel auf und bewegen sich im Bereich der Kontrollwertes. Es konnte allerdings auch hier mikroskopisch eine Schädigung der Zellen in Form von vereinzelt auftretenden Löchern beobachtet werden. Möglicherweise überlagern sich hier bereits Stoffwechselanregung und Zelltoxizität.

120min Vorinkubation (II)

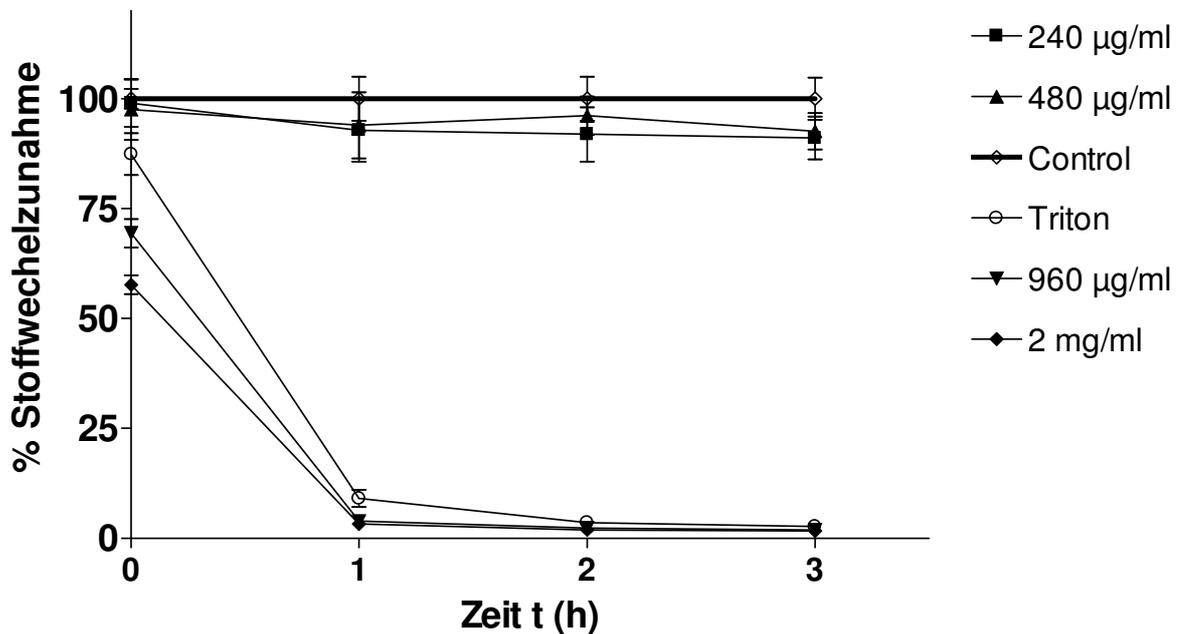


Abbildung 4.88

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 120-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen Nanopartikel-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 240, 480, 960 µg/ml und 2 mg/ml NP, sowie ein 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Wert (PBCEC mit Triton x lysiert).

Eine Konzentration von 960 µg/ml und 2 mg/ml zeigt wie bei den zuvor untersuchten Inkubationszeiten eine statistisch signifikante Abnahme des Zellstoffwechsels (***). Diese NP-Konzentrationen verlaufen erneut auf Niveau der Kurve der mit Triton-X 100 behandelten Zellen, ohne signifikant von dieser abzuweichen. Bei diesen hohen Konzentrationen macht es also keinen Unterschied, ob eine kürzere oder längere Inkubationszeit gewählt wird.

180 min Vorinkubation

Bei einer 180 minütigen Vorinkubation der PBCEC mit PBCA-NP verschiedener Konzentrationen konnten noch stärkere Einflüsse der Nanopartikel auf den Zellstoffwechsel beobachtet werden. Konzentrationen von 15 µg/ml bis 120 µg/ml zeigten eine, verglichen mit kürzeren Inkubationszeiten, weitaus stärkere Anregung des Zellstoffwechsels (Abbildung 4.89). Lag die Verstoffwechslung bei kürzerer NP-Inkubation lediglich in Bereichen zwischen 120 % und 160 % gegenüber der

Kontrolle, so konnte nun ein Umsatz von bis zu 225 % verzeichnet werden (30 µg/ml).

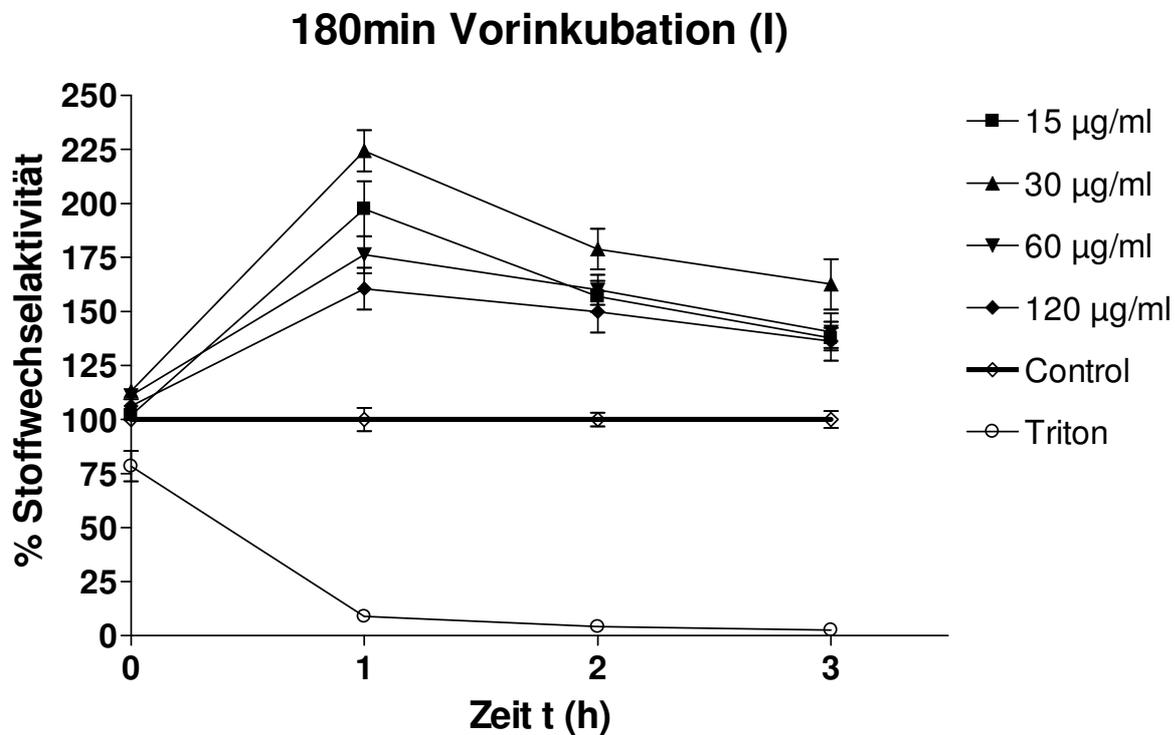


Abbildung 4.89

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 180-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen Nanopartikel-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 15, 30, 60 und 120 µg/ml NP, sowie 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Werte (mit Triton X-100 behandelte PBCEC).

Alle NP-Konzentrationen führen nach einer Stunde Messdauer zu einem Maximalwert der mitochondrialen Aktivität (***). Nach 2 bzw. 3 Stunden scheinen sich die Zellen etwas zu regenerieren, da die Stoffwechselaktivität wieder sinkt. Allerdings scheint diese Regeneration auch nach 3 Stunden nicht abgeschlossen zu sein, da auch dann noch eine signifikante Abweichung vom Kontrollwert besteht (***).

Für höhere NP-Konzentrationen sind die Ergebnisse in Abbildung 4.90 dargestellt. Konzentrationen von 240 µg/ml und 480 µg/ml zeigen abermals keinen signifikanten Einfluss auf den Metabolismus der PBCEC. Mikroskopisch konnte hingegen festgestellt werden, dass die PBCEC vereinzelt Löcher aufwiesen, also eine Schädigung der Zellen durch die NP-Konzentrationen vorliegen muss. Die

beobachtete Schädigung zeigt sich hier allerdings nicht anhand eines Absinkens des zellulären Stoffwechsels unter den Kontrollwert.

180min Vorinkubation (II)

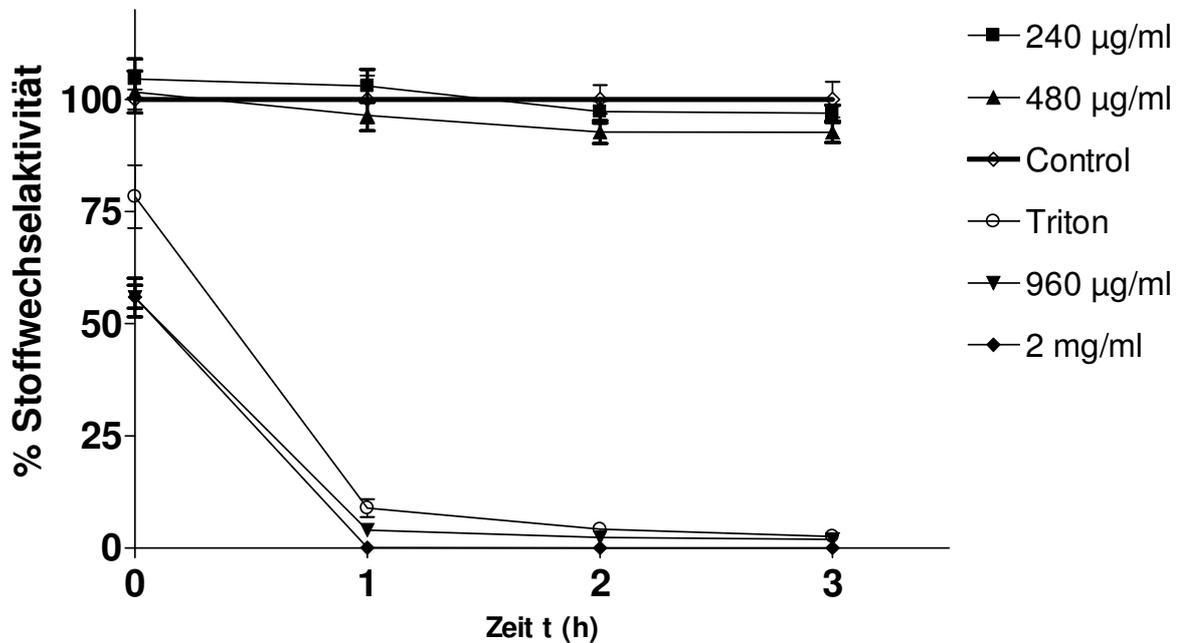


Abbildung 4.90

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 180-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen Nanopartikel-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 240, 480, 960 µg/ml und 2 mg/ml NP, sowie zur Kontrolle 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Werte (PBCEC mit Triton x lysiert).

Möglich wäre, dass bei 240 und 480 µg/ml Nanopartikelkonzentration sowohl eine Stoffwechselanregung, als auch Schädigung stattfindet. Ein Teil der PBCEC könnte demnach eine erhöhte Umsetzung der NP aufweisen, während ein anderer Teil der Zellen bereits einen geringeren Metabolismus zeigt. Diese gleichzeitige, gegensätzliche Wirkung könnte zu einem Mittelwert auf Höhe des Kontrollwertes führen.

Konzentrationen von 960 µg/ml und 2 mg/ml lassen die mitochondriale Aktivität auf das Niveau von mit Triton-X-100 versetzten PBCEC sinken. Eine Regeneration dieser so behandelten Zellen erfolgt nicht, weshalb davon auszugehen ist, dass eine so hohe NP-Konzentration zum Tod der Zellen führt.

240 min Vorinkubation

Bei einer 240 minütigen Vorinkubation von PBCEC mit PBCA-NP verschiedener Konzentrationen konnten für NP-Konzentration bis 120 $\mu\text{g/ml}$ weniger hohe Stoffwechselzunahmen als nach einer 180 minütigen Vorinkubation beobachtet werden. Allerdings ist die Stoffwechselzunahme noch immer massiv gegenüber dem Kontrollwert (bis zu 175 % nach 1 h) Wie in Abbildung 4.91 ersichtlich, erreichen die mitochondrialen Aktivitäten bei verschiedenen NP-Konzentrationen nach einer Stunde ein Maximum (***) und sinken danach langsam ab.

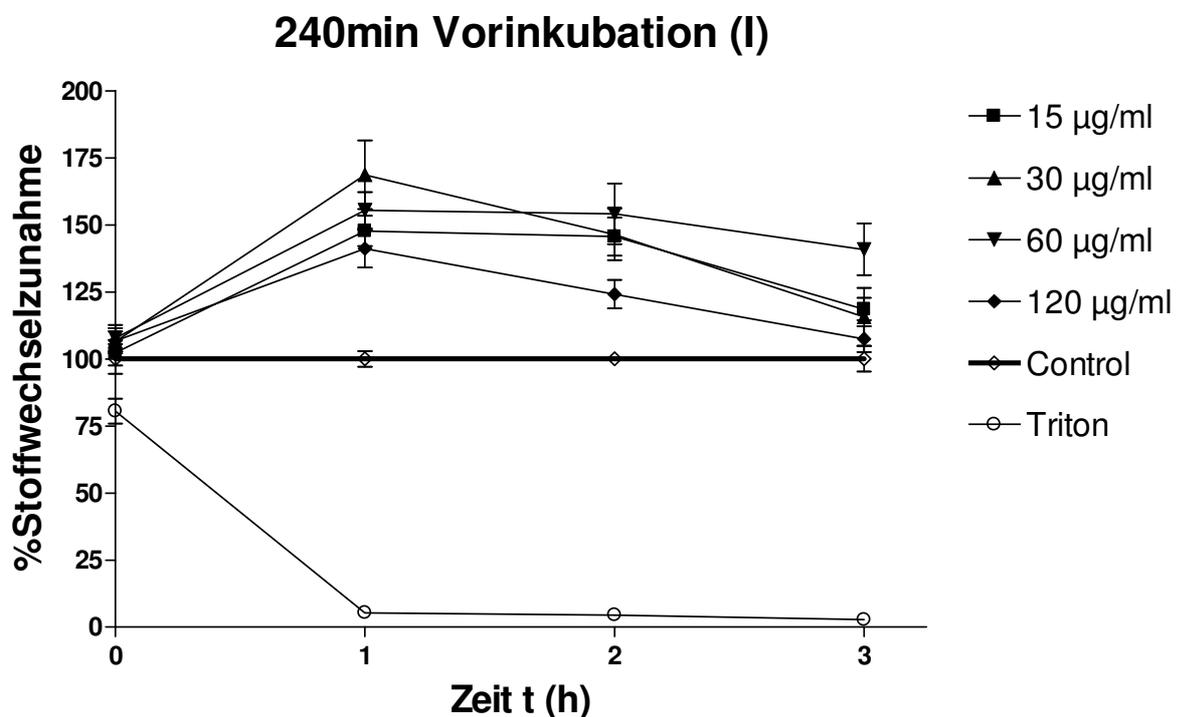


Abbildung 4.91

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 240-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen Nanopartikel-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 15, 30, 60 und 120 $\mu\text{g/ml}$ NP, sowie Kontroll-Kurven für 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Werte (PBCEC mit Triton x lysiert).

Nach 3 Stunden kann nur noch bei einer NP-Konzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikante Abweichung (***) vom Kontrollwert festgestellt werden. Alle weiteren NP-Konzentrationen zeigen nach 3 Stunden keine signifikante Erhöhung des Zellstoffwechsels, sind aber ebenfalls noch erhöht. Dies deutet darauf hin, dass sich

PBCEC nach insgesamt 7 Stunden (4 Stunden NP-Inkubationszeit plus 3 Stunden Messdauer) möglicherweise wieder von der Nanopartikel-Exposition erholen.

Bei höheren NP-Konzentrationen konnte diese Regeneration allerdings auch nach 3 Stunden Messdauer nicht beobachtet werden (Abbildung 4.92). 240 und 480 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBCA-NP zeigen ein weiteres Mal keine signifikante Veränderung der metabolischen Aktivität. Eine NP-Konzentration von 960 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sowie von 2 mg/ml zeigte über die gesamte Messdauer wieder eine statische Signifikanz (***) gegenüber dem Kontrollwert. Die Kurvenverläufe dieser beiden Konzentrationen weichen allerdings nicht signifikant von dem Verlauf der Triton-Kurve ab.

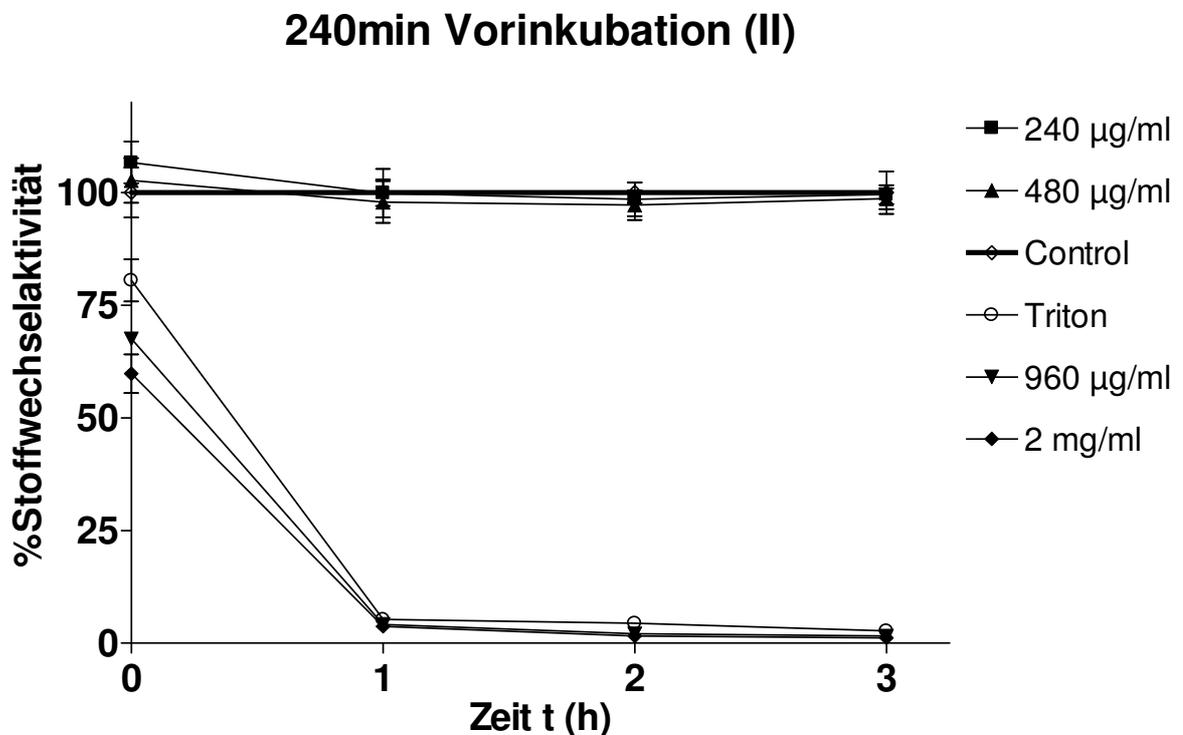


Abbildung 4.92

Prozentuale Stoffwechselaktivität der PBCEC nach einer 240-minütigen Vorinkubation mit verschiedenen Nanopartikel-Konzentrationen. Aufgetragen wurden die prozentualen Verläufe für 240, 480, 960 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 2 mg/ml NP, sowie 100 %-(Control, Zellen ohne NP-Zugabe) und Triton X-Werte (PBCEC mit Triton x 100 lysiert)

Da bei allen Vorinkubationszeiten ähnliche Aussagen über die Einflüsse von 960 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 2 mg/ml NP-Konzentrationen getroffen werden konnten und keine Regeneration der Zellen zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass diese NP-

4. Ergebnisse und Diskussion

Konzentrationen eine für PBCEC hohe Toxizität besitzen und dass diese Toxizität zum Zelltod führt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass PBCA-NP bis zu einer Konzentration von 120 µg/ml zu einer deutlichen Zunahme der Stoffwechselaktivität von PBCEC führen. Die Verstoffwechslung weist bei einer Vorinkubation von 180 min ihr Maximum auf (vgl. Abbildung 4.89) und sinkt erst nach etwa 7 Stunden (4h Vorinkubation mit NP plus 3h Messdauer; vgl. Abbildung 4.91) auf Niveau des Kontrollwerts von 100 % ab. Eine durch PBCA-NP induzierte Stoffwechselerhöhung erscheint umso interessanter, wenn man beachtet, dass der AlamarBlue™ Assay die mitochondriale Aktivität von Zellen misst. Der Farbstoff AlamarBlue™ liegt bei Zugabe zu den PBCEC in seiner oxidierten Form (blauer, nicht fluoreszierender Farbstoff) vor und wird durch die Stoffwechselaktivität von Zellen (reduzierendes Milieu) in seine reduzierte Form (roter, fluoreszierender Farbstoff) umgewandelt. Diese Eigenschaft kann sich zu Nutzen gemacht werden, um eine quantitative Proliferation von Zellen, sowie die relative Zytotoxizität von verschiedenen Substanzen zu bestimmen.

Die Stoffwechselzunahme, die sich nun bei Konzentrationen bis zu 120 µg/ml PBCANP zeigte, muss demnach mit einer erhöhten mitochondrialen Aktivität verknüpft sein. Mitochondrien sind im Zytosol von eukaryotischen Zellen lokalisierte Organellen und für die Produktion von ATP zuständig [258]. Somit bedeutet eine im AlamarBlue™ gemessene erhöhte Stoffwechselaktivität eine vermehrte ATP-Synthese in den Mitochondrien. Möglicherweise benötigen Zellen also bei einer Aufnahme von Nanopartikeln sehr viel ATP und erhöhen daher die mitochondriale Aktivität. Der der NP-Aufnahme zugrunde liegende Prozess könnte daher ATP-abhängig sein oder induziert vielleicht eine gesteigerte ATP-Produktion. Denkbar wären hierbei also endozytotische, aber vor allem auch inflammatorische Prozesse. Da sich die PBCEC jedoch nach einigen Stunden zu regenerieren scheinen, ist eine immunvermittelte Reaktion wahrscheinlicher. Auch eine Betrachtung von TEER-Werten ist bei der Klärung des Mechanismus hilfreich. So wurde in einer Arbeit aus dem Jahre 2006 [247] beschrieben, dass die TEER-Werte porziner Kapillarendothelzellen bei einer PBCA-NP-Konzentration von 10 µg/ml direkt nach der NP-Zugabe absanken, nach 4 Stunden aber wieder auf Ausgangsniveau anstiegen. Bei einer höheren NP-Konzentration von 60 µg/ml wurde in der eben

4. Ergebnisse und Diskussion

erwähnten Arbeit ebenfalls ein Abfallen der TEER-Werte verzeichnet. Nach 8 Stunden konnte dann eine erneute Regeneration beobachtet werden. In im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte nach 7 Stunden eine Normalisierung des Stoffwechsels festgestellt werden, die möglicherweise auch mit einer Regeneration des TEER einhergehen könnte.

Eine Verringerung des transendothelialen Widerstands deutet darauf hin, dass die *tight junctions* nicht mehr ganz intakt sind. Sinkt der TEER von PBCEC, so bedeutet dies normalerweise eine erhöhte parazelluläre Diffusion, wodurch im Extremfall PBCA-NP an den Kapillarendothelzellen vorbeigekommen könnten. Messungen des Inulin-durchfluteten Raumes im Gehirn nach Infusion von Nanopartikelsuspensionen in Mäusen zeigten aber auch, dass es *in vivo* nicht zu einer nennenswerten Öffnung von *tight junctions* der BHS kommt [259]. Dieser Befund wurde durch *in vitro*-Messungen der Permeabilität von Inulin und Sucrose in Endothelzellmonolayern bei gleichzeitiger Behandlung mit Nanopartikeln unterstützt. Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen ergaben intakte Zellen mit intakten *tight junctions* [260]. Somit ist eher zu vermuten, dass NP nicht auf parazellulärem Wege die BHS passieren können.

Eine Messung der mRNA- und Proteinkonzentrationen inflammatorischer Marker (z.B.: TNF- α , Interleukine), sowie des TEER von PBCEC während einer NP-Inkubation könnten zur Klärung der Frage beitragen, warum eine Stoffwechselzunahme als Reaktion auf die Konfrontation mit PBCA-NP erfolgt.

Bei Nanopartikel-Konzentrationen von 240 und 480 $\mu\text{g/ml}$ konnte keine signifikante Anregung der zellulären Stoffwechselaktivität ermittelt werden. Da aber NP-Konzentrationen bis 120 $\mu\text{g/ml}$ einen signifikanten Effekt auf die PBCEC hatten, muss auch bei höheren Konzentrationen etwas in den Zellen passieren. Denkbar wäre dabei, dass einige Zellen auf die NP-Exposition mit erhöhter Stoffwechselaktivität reagieren, während andere Zellen bereits eine Schädigung erleiden und einen niedrigeren Metabolismus aufweisen. Diese Effekte könnten bei 240 und 480 $\mu\text{g/ml}$ NP gleich stark sein, sodass im Mittel keine signifikante Abweichung von einer 100 %igen Stoffwechselaktivität besteht. Zudem konnten wie bereits erwähnt mikroskopisch einige Löcher in den PBCEC beobachtet werden. Eine beginnende Zellschädigung muss daher angenommen werden. Für hohe

4. Ergebnisse und Diskussion

Konzentrationen an PBCA-NP (960 µg/ml, 2 mg/ml) konnten signifikante Stoffwechselabnahmen verzeichnet werden, welche auf Niveau von toten, mit Triton-X 100 behandelten Zellen lagen. Diese Konzentrationen führen demnach zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen bzw. Zelltod durch toxische Wirkung.

Fazit aus diesen Versuchen ist, dass eine Inkubation mit PBCA-NP bis zu einer bestimmten Konzentration den Stoffwechsel der PBCEC anregt (15-120 µg/ml), dass diese Anregung bei zunehmender Konzentration an NP stagniert (240-480 µg/ml) und dass bei hohen Konzentrationen an NP (>980 µg/ml) die Stoffwechselaktivität einbricht und die Zellen sterben.

5 Abschlussbetrachtung und Ausblick

Viele Krankheiten des Zentralnervensystems können nicht zufriedenstellend behandelt werden, da die BHS als Schutzwall das ZNS vor dem Eindringen körperfremder Substanzen und damit auch vor den meisten Arzneistoffen abschirmt. Da in der Vergangenheit bereits in anderen Arbeiten gezeigt wurde, dass beladene, mit P-80 umhüllte PBCA-NP in der Lage sind, zentrale pharmakologische Effekte hervorzurufen, sollte in dieser Arbeit die Interaktion beladener PBCA-NP mit der BHS in mehrerlei Hinsicht beleuchtet werden. Zunächst wurde die Arbeit mit Versuchen *in vivo* an männlichen Ratten begonnen. Ziel war es, visuell darzustellen, wie beladene NP die BHS passieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine Oberflächenmodifikation mit P-80 essentiell für eine Passage der BHS ist. Es konnte in dieser Arbeit anhand von konfokal-mikroskopischen Aufnahmen eindeutig demonstriert werden, dass PBCA-NP, die mit FITC-Dextran, Rhodamin 123 oder Doxorubicin beladen waren, in der Lage sind, die BHS zu passieren. Ebenso konnte bewiesen werden, dass eine Oberflächenbehandlung mit P-80 für die Überwindung der BHS unbedingt notwendig ist.

Da Doxorubicin auch kardiotoxisch ist, sollte für die Doxorubicin-NP darüber hinaus untersucht werden, inwieweit sich die Anreicherung des freien Doxorubicins von der des partikulär gebundenen unterscheidet. Die qualitative Analyse legt nahe, dass die partikuläre Form aufgrund einer geringeren lokalen Konzentration des freien Doxorubicins weniger kardiotoxisch ist als die freie Substanz, da Gefrierschnitte der Proben mit freiem Doxorubicin eine flächige Fluoreszenz zeigten, während die partikulären Zubereitungen punktuell fluoreszierten.

Im Anschluss wurde –am Beispiel von Doxorubicin- die Freisetzung aus PBCA-NP *in vitro* in Puffer und Gehirnhomogenat quantitativ bestimmt. Zunächst musste für die *in vitro* Freisetzungsuntersuchungen sowohl eine präparative als auch eine analytische Aufreinigungsmethode der Doxorubicin beladenen NP entwickelt werden. Denn aufgrund des Herstellungsprozesses der Nanopartikel war stets nicht inkorporiertes sowie an die NP adsorbiertes Doxorubicin in der NP-Suspension enthalten. Hierzu wurden selbst gepackte Säulen mit Sephadex[®] G50 fine, sowie PD 10 Desalting Fertigsäulen verwendet. Alle getesteten Eluenten lieferten bei alleiniger Verwendung

keine ausreichend große Auflösung bei der Trennung der zu unterscheidenden Komponenten (NP und freies Doxorubicin). Da bei Verwendung von bidestilliertem Wasser das freie Doxorubicin aufgrund von Adsorptionsvorgängen quantitativ auf der Säule verblieb, wurden zur Verbesserung der Auflösung die NP zunächst mit Wasser eluiert und das freie Doxorubicin anschließend mit isotoner Kochsalzlösung. Dieses Verfahren wurde sowohl für die präparative als auch für die analytische Aufreinigung der NP verwendet.

Um die Versuchsdauer der Freisetzungsexperimente festzulegen, wurde die Stabilität des Doxorubicins bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Da bereits nach 24 h meist über 20 % Fluoreszenzabnahme zu finden war, wurde die Versuchsdauer auf 6 h festgelegt, da bis zu diesem Zeitpunkt das Maß Fluoreszenzabnahme vertretbar war.

Die Freisetzungsexperimente erfolgten in Puffer und in Gehirnhomogenat bei pH 5 und pH 7,4. Das Freisetzungverhalten in reinem Puffer und in Gehirnhomogenat unterschied sich nicht sehr stark. In beiden Fällen folgte die Freisetzung einer Kinetik 0. Ordnung. Der Puffer pH 7,4 zeigte die schnellste und höchste (ca. 6,5 %) Freisetzung, was sicherlich auf die Hydrolyseempfindlichkeit des Polymers und die durch damit verbundene Quellung zurückzuführen ist. Bei der Freisetzung im leicht sauren Na-Acetatpuffer (pH 5) erfolgte diese etwas langsamer und es wurde etwas weniger freigesetzt (ca. 4 %). Im Gehirnhomogenat konnte keine erhöhte Freisetzung aufgrund von Enzymen im Gehirnhomogenat gemessen werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Hauptabbauweg des Polymers in der Degradation der Butanol-Seitenketten besteht. Dies geschieht sowohl hydrolytisch als auch enzymatisch. Als Abbauprodukt bleibt eine hydrophile Polysäure zurück.

Im nächsten Teil der Arbeit sollte der Aufnahmemechanismus von NP ins Gehirn beispielhaft mit Rhodamin 123 beladenen NP untersucht werden. Dazu wurde die Interaktion von PBCA-NP mit isolierten Schweinehirn-Kapillarendothelzellen betrachtet.

Zunächst wurde der Einfluss von P-80 in serumfreiem Medium auf die Zellen getestet. Ohne P-80-*Coating* war eine starke Adsorption der NP an die Zelle festzustellen, mit P-80 konnte die Aufnahme in die Zellen eindeutig gezeigt werden.

Daraufhin stellte sich die Frage, warum eine Aufnahme der gecoateten NP erfolgte, obwohl keine Lipoproteine während des Versuchs vorhanden waren. Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass die mit P-80 beschichtete NP im Blutstrom Apolipoproteine an ihre Oberfläche adsorbieren und somit an einen Lipoprotein-Rezeptor binden können und per rezeptorvermittelter Endozytose bzw. Transzytose ins Gehirn gelangen können. Ein Aufnahme-Versuch mit Serumzusatz führte jedoch zu einer massiven Hemmung der Aufnahme in die Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass es bei diesen Experimenten durch den Zusatz von Serum zu einer kompetitiven Hemmung durch zu zahlreich vorhandene Apolipoproteine gekommen ist oder aber dass der Mechanismus der Aufnahme ein anderer ist. Die Literaturlage hierzu ist widersprüchlich.

Abschließend wurde mit diesen Primärzellen der AlamarBlue™ Assay durchgeführt, um zu klären welche Auswirkungen verschiedene PBCA-NP Konzentrationen auf den Stoffwechsel von zerebralen Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn haben. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass die Inkubation mit PBCA-NP bis zu einer bestimmten Konzentration den Stoffwechsel der PBCEC anregt (15-120 µg/ml), dass diese Anregung bei zunehmender Konzentration an NP stagniert (240-480 µg/ml) und dass bei hohen Konzentrationen an NP (>980 µg/ml) die Stoffwechselaktivität komplett einbricht und die Zellen sterben. Die Anregung des Stoffwechsels resultiert aus einer vermehrten ATP-Synthese. Es sind zwei Gründe hierfür denkbar: Der eine ist, dass möglicherweise der Aufnahmemechanismus der NP ATP-abhängig ist und daher mehr ATP produziert wird. Die andere Möglichkeit wäre eine Entzündungsreaktion. Diese Möglichkeit erscheint wahrscheinlicher, da es Literatur dazu gibt, dass der transendotheliale Widerstand primärer Monolayer aus zerebralen Kapillarendothelzellen nach Konfrontation mit PBCA-NP massiv sinkt, sich aber teilweise nach bestimmten Zeiten wieder erholt.

Für die Zukunft wäre es natürlich wünschenswert zu wissen, welcher Mechanismus der Partikelpermeation *in vitro* und *in vivo* zugrunde liegt und in welchem Ausmaß die wirkstoffbeladenen Nanopartikel tatsächlich über die Blut-Hirn-Schranke gelangen. Außerdem ist natürlich auch von besonderem Interesse, wie stark NP nach i.v. Gabe in Organen akkumulieren, gerade im Hinblick auf die Kardiotoxizität des Doxorubicins. Wenn die NP die BHS passiert haben, was eindeutig bewiesen werden

konnte, stellt sich anschließend die Frage wie schnell die Partikel nach der Passage durch die BHS abgebaut werden und welche zellbiologischen Reaktionen die Zellen nach Konfrontation mit Nanopartikeln zeigen. Die Erhöhung des mitochondrialen Stoffwechsels, die im AlamarBlue™ Assay gezeigt werden konnte, deutet möglicherweise auf inflammatorische Reaktionen hin. Könnte es dadurch aufgrund des Absinkens der TEER sogar zu einer parazellulären Aufnahme der NP kommen? Eine Untersuchung der Abgabe inflammatorischer Marker wie beispielsweise TNF- α könnte Aufschluss darüber geben. Auch Permeationsstudien in Transwell-Zellkultursystemen könnten zeigen, ob ein Parazellulärmarker wie Sucrose nach Inkubation der Zellen mit unbeladenen NP vermehrt auf die basolaterale Seite gelangen kann.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die in dieser Dissertation untersuchten PBCA-NP eine Arzneiform darstellen, die zur Behandlung von Erkrankungen des ZNS verwendet werden können, da sie in der Lage sind, die BHS zu passieren, den inkorporierten Wirkstoff nach 0. Ordnung kontrolliert freisetzen und erst in recht hohen Konzentrationen zum Zelltod führen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Website. Lecture on CNS, www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/007cns.htm. 2009.
Ref Type: Online Source
- [2] Reimold,I., Domke,D., Bender,J., Seyfried,C.A., Radunz,H.E., & Fricker,G. (2008) Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **70**, 627-632.
- [3] Pardridge,W.M. (2007) Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* **12**, 54-61.
- [4] Carvalho,C., Santos,R.X., Cardoso,S., Correia,S., Oliveira,P.J., Santos,M.S., & Moreira,P.I. (2009) Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr. Med. Chem.* **16**, 3267-3285.
- [5] Scherrmann,J.M. (2005) Expression and function of multidrug resistance transporters at the blood-brain barriers. *Expert. Opin. Drug Metab Toxicol.* **1**, 233-246.
- [6] Hermann,D.M., Kilic,E., Spudich,A., Kramer,S.D., Wunderli-Allenspach,H., & Bassetti,C.L. (2006) Role of drug efflux carriers in the healthy and diseased brain. *Ann. Neurol.* **60**, 489-498.
- [7] Ehrlich,P. Das Sauerstoffbeduerfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. 1885. Berlin.
Ref Type: Report
- [8] Goldmann E.E. Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. *Beitr. Klin. Chirurg* 64 (1909),. 192-265. 1909.
Ref Type: Report
- [9] Goldmann E.E. (1913) Vitalfärbung am Zentral-Nervensystem. *Abh. Preuss. Akad. Wiss. , Phys. -Math.* **KL I.**, 1-60.
- [10] Walter.F.K. (1930) Die allgemeinen Grundlagen des Stoffaustausches zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* **101**, 195-230.
- [11] Spatz,H. (1933) Die Bedeutung der vitalen Färbung für die Lehre vom Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. *Arch. Psychiatr. Nervenkr* **101**, 267-358.
- [12] Krogh,A. (1946) The active and passive exchange of inorganic ions through the surface of living cells and through living membranes generally. *Proc. R. Soc. Lond* 140-200.
- [13] DEMPSEY,E.W. & WISLOCKI,G.B. (1955) An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 245-256.
- [14] Miller,G. (2002) Drug targeting. Breaking down barriers. *Science* **297**, 1116-1118.

6. Literaturverzeichnis

- [15] Brightman, M.W. & Reese, T.S. (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* **40**, 648-677.
- [16] Zlokovic, B.V. & Apuzzo, M.L. (1998) Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system. *Neurosurgery* **43**, 877-878.
- [17] Pardridge, W.M. (1996) Brain drug delivery and blood-brain barrier transport. *Drug Delivery* **3**, 99-115.
- [18] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d8/Blood-brain_barrier_02.png. Wikimedia- Blood Brain Barrier. 2009.
Ref Type: Online Source
- [19] Grieb, P., Forster, R.E., Strome, D., Goodwin, C.W., & Pape, P.C. (1985) O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator-dilution technique. *J. Appl. Physiol* **58**, 1929-1941.
- [20] Rubin, L.L. (1992) Endothelial cells: adhesion and tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 830-833.
- [21] Crone, C. & Olesen, S.P. (1982) Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.* **241**, 49-55.
- [22] Balda, M.S., Fallon, M.B., Van Itallie, C.M., & Anderson, J.M. (1992) Structure, regulation, and pathophysiology of tight junctions in the gastrointestinal tract. *Yale J. Biol. Med.* **65**, 725-735.
- [23] Lippoldt, A., Kniesel, U., Liebner, S., Kalbacher, H., Kirsch, T., Wolburg, H., & Haller, H. (2000) Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Res.* **885**, 251-261.
- [24] Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., & Vestweber, D. (2004) Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell Sci.* **117**, 19-29.
- [25] Bradbury, M.W. (1985) The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium. *Circ. Res.* **57**, 213-222.
- [26] Ghersi-Egea, J.F., Minn, A., & Siest, G. (1988) A new aspect of the protective functions of the blood-brain barrier: activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels. *Life Sci.* **42**, 2515-2523.
- [27] Risau, W., Engelhardt, B., & Wekerle, H. (1990) Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro. *J. Cell Biol.* **110**, 1757-1766.
- [28] Timpl, R. (1994) Proteoglycans of basement membranes. *EXS* **70**, 123-144.
- [29] Sims, D.E. (1986) The pericyte--a review. *Tissue Cell* **18**, 153-174.
- [30] R. Dermietzel, D.C. Spray, & M. Nedergaard. Blood-Brain Barriers. [1], 109-110. 2006. Wiley-VCH.
Ref Type: Edited Book

6. Literaturverzeichnis

- [31] Rubin,L.L. & Staddon,J.M. (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 11-28.
- [32] Abbott,N.J., Ronnback,L., & Hansson,E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41-53.
- [33] Abbott,N.J. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* **200**, 629-638.
- [34] Sobue,K., Yamamoto,N., Yoneda,K., Hodgson,M.E., Yamashiro,K., Tsuruoka,N., Tsuda,T., Katsuya,H., Miura,Y., Asai,K., & Kato,T. (1999) Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* **35**, 155-164.
- [35] Wolburg,H., Noell,S., Wolburg-Buchholz,K., Mack,A., & Fallier-Becker,P. (2009) Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier. *Neuroscientist.* **15**, 180-193.
- [36] Anderson,C.M. & Swanson,R.A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**, 1-14.
- [37] Hawkins,B.T. & Davis,T.P. (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **57**, 173-185.
- [38] Lok,J., Gupta,P., Guo,S., Kim,W.J., Whalen,M.J., van,L.K., & Lo,E.H. (2007) Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem. Res.* **32**, 2032-2045.
- [39] Drewes LR (2006) Biology of the blood-brain glucose transporter. In Introduction to the BBB (Pardridge,W.M., ed), pp. 165-174. Cambridge University press.
- [40] Pardridge,W.M., Boado,R.J., & Farrell,C.R. (1990) Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J. Biol. Chem.* **265**, 18035-18040.
- [41] Oldendorf,W.H. (1971) Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am. J. Physiol* **221**, 1629-1639.
- [42] Sanchez del Pino,M.M., Peterson,D.R., & Hawkins,R.A. (1995) Neutral amino acid transport characterization of isolated luminal and abluminal membranes of the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* **270**, 14913-14918.
- [43] Smith,Q.R., Momma,S., Aoyagi,M., & Rapoport,S.I. (1987) Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* **49**, 1651-1658.
- [44] Betz,A.L. & Goldstein,G.W. (1978) Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science* **202**, 225-227.
- [45] Goldstein,G.W. & Betz,A.L. (1983) Recent advances in understanding brain capillary function. *Ann. Neurol.* **14**, 389-395.
- [46] Wolf,S., Seehaus,B., Minol,K., & Gassen,H.G. (1996) [The blood-brain barrier: a specialty of cerebral microcirculation systems]. *Naturwissenschaften* **83**, 302-311.
- [47] Bauer B. *In vitro* Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke zur Untersuchung der Permeation und P-Glycoprotein-Interaktion von Arzneistoffen. 2002.

6. Literaturverzeichnis

Ref Type: Thesis/Dissertation

- [48] Cordon-Cardo,C., O'Brien,J.P., Casals,D., Rittman-Grauer,L., Biedler,J.L., Melamed,M.R., & Bertino,J.R. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 695-698.
- [49] Huai-Yun,H., Secrest,D.T., Mark,K.S., Carney,D., Brandquist,C., Elmquist,W.F., & Miller,D.W. (1998) Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 816-820.
- [50] Seetharaman,S., Barrand,M.A., Maskell,L., & Scheper,R.J. (1998) Multidrug resistance-related transport proteins in isolated human brain microvessels and in cells cultured from these isolates. *J. Neurochem.* **70**, 1151-1159.
- [51] Regina,A., Koman,A., Piciotti,M., El,H.B., Center,M.S., Bergmann,R., Couraud,P.O., & Roux,F. (1998) Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J. Neurochem.* **71**, 705-715.
- [52] Eisenblatter,T., Huwel,S., & Galla,H.J. (2003) Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res.* **971**, 221-231.
- [53] [http: & upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Efflux_01.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Efflux_01.png). Efflux Transporters at the BBB. 2009. wikimedia.
Ref Type: Online Source
- [54] Abbott,N.J. & Romero,I.A. (1996) Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol. Med. Today* **2**, 106-113.
- [55] Kumagai,A.K., Eisenberg,J.B., & Pardridge,W.M. (1987) Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a beta-endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport. *J. Biol. Chem.* **262**, 15214-15219.
- [56] Thole,M., Nobmanna,S., Huwyler,J., Bartmann,A., & Fricker,G. (2002) Uptake of cationized albumin coupled liposomes by cultured porcine brain microvessel endothelial cells and intact brain capillaries. *J. Drug Target* **10**, 337-344.
- [57] Pardridge,W.M., Triguero,D., & Buciak,J. (1989) Transport of histone through the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**, 821-826.
- [58] de Vries,H.E., Kuiper,J., de Boer,A.G., van Berkel,T.J., & Breimer,D.D. (1993) Characterization of the scavenger receptor on bovine cerebral endothelial cells in vitro. *J. Neurochem.* **61**, 1813-1821.
- [59] Abbott,N.J. & Romero,I.A. (1996) Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol. Med. Today* **2**, 106-113.
- [60] Pardridge,W.M., Eisenberg,J., & Yang,J. (1985) Human blood-brain barrier insulin receptor. *J. Neurochem.* **44**, 1771-1778.
- [61] Bradbury,M.W. (1993) The blood-brain barrier. *Exp. Physiol* **78**, 453-472.

6. Literaturverzeichnis

- [62] Friden,P.M., Olson,T.S., Obar,R., Walus,L.R., & Putney,S.D. (1996) Characterization, receptor mapping and blood-brain barrier transcytosis of antibodies to the human transferrin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 1491-1498.
- [63] Jones,A.T. (2007) Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell Mol. Med.* **11**, 670-684.
- [64] Benmerah,A. & Lamaze,C. (2007) Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic.* **8**, 970-982.
- [65] Deurs,B.v., Holm,P.K., Sandvig,K., & Hansen,S.H. (1993) Are caveolae involved in clathrin-independent endocytosis? *Trends in Cell Biology* **3**, 249-251.
- [66] Anderson,R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199-225.
- [67] Lajoie,P. & Nabi,I.R. (2007) Regulation of raft-dependent endocytosis. *J. Cell Mol. Med.* **11**, 644-653.
- [68] Mayor,S. & Pagano,R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603-612.
- [69] Luzio,J.P., Pryor,P.R., & Bright,N.A. (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 622-632.
- [70] M.K.Gumerlock & E.A.Neuwalt (1992) Therapeutic opening of the blood-brain barrier in man. In Physiology and pharmacology of the blood-brain barrier. Handbook of experimental pharmacology (Bradbury,M.W.B., ed), pp. 525-542. Springer-Verlag, Berlin.
- [71] Unterberg,A., Wahl,M., & Baethmann,A. (1984) Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **4**, 574-585.
- [72] Begley,D.J. (1996) The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**, 136-146.
- [73] Oldendorf,W.H. (1974) Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **147**, 813-815.
- [74] Bodor,N., Prokai,L., Wu,W.M., Farag,H., Jonalagadda,S., Kawamura,M., & Simpkins,J. (1992) A strategy for delivering peptides into the central nervous system by sequential metabolism. *Science* **257**, 1698-1700.
- [75] Rahimy,M.H., Simpkins,J.W., & Bodor,N. (1990) Dose and time-course evaluation of a redox-based estradiol-chemical delivery system for the brain. II. Pharmacodynamic responses. *Pharm. Res.* **7**, 1107-1112.
- [76] Brewster,M.E., Raghavan,K., Pop,E., & Bodor,N. (1994) Enhanced delivery of ganciclovir to the brain through the use of redox targeting. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 817-823.

6. Literaturverzeichnis

- [77] Brewster, M.E., Anderson, W.R., Helton, D.O., Bodor, N., & Pop, E. (1995) Dose-dependent brain delivery of zidovudine through the use of a zidovudine chemical delivery system. *Pharm. Res.* **12**, 796-798.
- [78] Deguchi, Y., Inabe, K., Tomiyasu, K., Nozawa, K., Yamada, S., & Kimura, R. (1995) Study on brain interstitial fluid distribution and blood-brain barrier transport of baclofen in rats by microdialysis. *Pharm. Res.* **12**, 1838-1844.
- [79] Fukuta, M., Okada, H., Inuma, S., Yanai, S., & Toguchi, H. (1994) Insulin fragments as a carrier for peptide delivery across the blood-brain barrier. *Pharm. Res.* **11**, 1681-1688.
- [80] Broadwell, R.D., Baker-Cairns, B.J., Friden, P.M., Oliver, C., & Villegas, J.C. (1996) Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. III. Receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier of blood-borne transferrin and antibody against the transferrin receptor. *Exp. Neurol.* **142**, 47-65.
- [81] van, G.W., Cleton-Soeteman, M.I., Huijskes-Heins, M.I., van Run, P.R., & van Eijk, H.G. (1997) Transcytosis of 6.6-nm gold-labeled transferrin: an ultrastructural study in cultured porcine blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Res.* **746**, 105-116.
- [82] Pardridge, W.M., Kang, Y.S., Buciak, J.L., & Yang, J. (1995) Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood-brain barrier in vivo in the primate. *Pharm. Res.* **12**, 807-816.
- [83] Bickel, U., Yoshikawa, T., Landaw, E.M., Faull, K.F., & Pardridge, W.M. (1993) Pharmacologic effects in vivo in brain by vector-mediated peptide drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 2618-2622.
- [84] Broadwell, R.D., Baker-Cairns, B.J., Friden, P.M., Oliver, C., & Villegas, J.C. (1996) Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. III. Receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier of blood-borne transferrin and antibody against the transferrin receptor. *Exp. Neurol.* **142**, 47-65.
- [85] Kang, Y.S. & Pardridge, W.M. (1994) Brain delivery of biotin bound to a conjugate of neutral avidin and cationized human albumin. *Pharm. Res.* **11**, 1257-1264.
- [86] Pardridge, W.M., Triguero, D., Buciak, J., & Yang, J. (1990) Evaluation of cationized rat albumin as a potential blood-brain barrier drug transport vector. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 893-899.
- [87] Kumagai, A.K., Eisenberg, J.B., & Pardridge, W.M. (1987) Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a beta-endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport. *J. Biol. Chem.* **262**, 15214-15219.
- [88] Schinkel, A.H., Smit, J.J., van, T.O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van, D.L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P., & . (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* **77**, 491-502.

6. Literaturverzeichnis

- [89] Fellner,S., Bauer,B., Miller,D.S., Schaffrik,M., Fankhanel,M., Spruss,T., Bernhardt,G., Graeff,C., Farber,L., Gschaidmeier,H., Buschauer,A., & Fricker,G. (2002) Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest* **110**, 1309-1318.
- [90] Kinoshita,M. (2006) Targeted drug delivery to the brain using focused ultrasound. *Top. Magn Reson. Imaging* **17**, 209-215.
- [91] Kinoshita,M., McDannold,N., Jolesz,F.A., & Hynynen,K. (2006) Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 11719-11723.
- [92] Treat,L.H., McDannold,N., Vykhodtseva,N., Zhang,Y., Tam,K., & Hynynen,K. (2007) Targeted delivery of doxorubicin to the rat brain at therapeutic levels using MRI-guided focused ultrasound. *Int. J. Cancer* **121**, 901-907.
- [93] Liu,H.L., Hsu,P.H., Chu,P.C., Wai,Y.Y., Chen,J.C., Shen,C.R., Yen,T.C., & Wang,J.J. (2009) Magnetic resonance imaging enhanced by superparamagnetic iron oxide particles: usefulness for distinguishing between focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption and brain hemorrhage. *J. Magn Reson. Imaging* **29**, 31-38.
- [94] Liu,H.L., Wai,Y.Y., Hsu,P.H., Lyu,L.A., Wu,J.S., Shen,C.R., Chen,J.C., Yen,T.C., & Wang,J.J. (2009) In vivo assessment of macrophage CNS infiltration during disruption of the blood-brain barrier with focused ultrasound: a magnetic resonance imaging study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*
- [95] Bangham,A.D. (1993) Liposomes: the Babraham connection. *Chem. Phys. Lipids* **64**, 275-285.
- [96] Kreuter,J. (1983) Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm. Acta Helv.* **58**, 242-250.
- [97] Kreuter,J. (1991) Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics. *Infection* **19 Suppl 4**, S224-S228.
- [98] Tiwari,S.B. & Amiji,M.M. (2006) A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* **3**, 219-232.
- [99] Kreuter,J. (1994) Drug targeting with nanoparticles. *Eur. J. Drug Metab Pharmacokinet.* **19**, 253-256.
- [100] Grislain,L., Couvreur,P., Lenaerts,V., Roland,M., Deprez-Decampeneere,D., & Speiser,P. (1983) Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier. *International Journal of Pharmaceutics* **15**, 335-345.
- [101] Matsumura,Y. & Maeda,H. (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387-6392.
- [102] Kreuter,J. (2001) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 65-81.

6. Literaturverzeichnis

- [103] Tröster, S.D., Müller, U., & Kreuter, J. (1990) Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. *International Journal of Pharmaceutics* **61**, 85-100.
- [104] Borchard, G., Audus, K.L., Shi, F., & Kreuter, J. (1994) Uptake of surfactant-coated poly(methyl methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics* **110**, 29-35.
- [105] Araujo, L., Lobenberg, R., & Kreuter, J. (1999) Influence of the surfactant concentration on the body distribution of nanoparticles. *J. Drug Target* **6**, 373-385.
- [106] Peracchia, M.T., Vauthier, C., Puisieux, F., & Couvreur, P. (1997) Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol). *J. Biomed. Mater. Res.* **34**, 317-326.
- [107] Brigger, I., Morizet, J., Laudani, L., Aubert, G., Appel, M., Velasco, V., Terrier-Lacombe, M.J., Desmaele, D., d'Angelo, J., Couvreur, P., & Vassal, G. (2004) Negative preclinical results with stealth nanospheres-encapsulated Doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *J. Control Release* **100**, 29-40.
- [108] Wartlick, H., Michaelis, K., Balthasar, S., Strebhardt, K., Kreuter, J., & Langer, K. (2004) Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells. *J. Drug Target* **12**, 461-471.
- [109] Lenaerts, V., Couvreur, P., Christiaens-Leyh, D., Joiris, E., Roland, M., Rollman, B., & Speiser, P. (1984) Degradation of poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* **5**, 65-68.
- [110] Vezin, W.R. & Florence, A.T. (1980) In vitro heterogeneous degradation of poly(n-alkyl alpha-cyanoacrylates). *J. Biomed. Mater. Res.* **14**, 93-106.
- [111] Reimold, I., Domke, D., Bender, J., Seyfried, C.A., Radunz, H.E., & Fricker, G. (2008) Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **70**, 627-632.
- [112] Kreuter, J., Alyautdin, R.N., Kharkevich, D.A., & Ivanov, A.A. (1995) Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res.* **674**, 171-174.
- [113] Alyautdin, R.N., Petrov, V.E., Langer, K., Berthold, A., Kharkevich, D.A., & Kreuter, J. (1997) Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.* **14**, 325-328.
- [114] Kurakhmaeva, K.B., Djindjikhshvili, I.A., Petrov, V.E., Balabanyan, V.U., Voronina, T.A., Trofimov, S.S., Kreuter, J., Gelperina, S., Begley, D., & Alyautdin, R.N. (2009) Brain targeting of nerve growth factor using poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Drug Target* **17**, 564-574.
- [115] Reimold, I., Domke, D., Bender, J., Seyfried, C.A., Radunz, H.E., & Fricker, G. (2008) Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **70**, 627-632.
- [116] Kuo, Y.C. & Su, F.L. (2007) Transport of stavudine, delavirdine, and saquinavir across the blood-brain barrier by polybutylcyanoacrylate, methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate, and solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **340**, 143-152.

6. Literaturverzeichnis

- [117] Ambruosi,A., Yamamoto,H., & Kreuter,J. (2005) Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [14C]poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i.v. administration in rats. *J. Drug Target* **13**, 535-542.
- [118] Pereverzeva,E., Treschalin,I., Bodyagin,D., Maksimenko,O., Kreuter,J., & Gelperina,S. (2008) Intravenous tolerance of a nanoparticle-based formulation of doxorubicin in healthy rats. *Toxicol. Lett.* **178**, 9-19.
- [119] Lobenberg,R., Araujo,L., von,B.H., Rodgers,E., & Kreuter,J. (1998) Body distribution of azidothymidine bound to hexyl-cyanoacrylate nanoparticles after i.v. injection to rats. *J. Control Release* **50**, 21-30.
- [120] Gulyaev,A.E., Gelperina,S.E., Skidan,I.N., Antropov,A.S., Kivman,G.Y., & Kreuter,J. (1999) Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.* **16**, 1564-1569.
- [121] Kreuter,J. (1988) Possibilities of using nanoparticles as carriers for drugs and vaccines. *J. Microencapsul.* **5**, 115-127.
- [122] Kreuter,J., Nefzger,M., Liehl,E., Czok,R., & Voges,R. (1983) Distribution and elimination of poly(methyl methacrylate) nanoparticles after subcutaneous administration to rats. *J. Pharm. Sci.* **72**, 1146-1149.
- [123] Kreuter,J. & Speiser,P.P. (1976) New adjuvants on a polymethylmethacrylate base. *Infect. Immun.* **13**, 204-210.
- [124] Lherm,C., Müller,R.H., Herbort,J., & Brandes,G. (1989) Cytotoxicity of polyalcylycyanoacrylate particles of increasing chain length. *APGI-Kongreß*, **III**, 81-88.
- [125] Bootz,A., Russ,T., Gores,F., Karas,M., & Kreuter,J. (2005) Molecular weights of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles determined by mass spectrometry and size exclusion chromatography. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**, 391-399.
- [126] Muller,R.H., Lherm,C., Herbort,J., & Couvreur,P. (1990) In vitro model for the degradation of alkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* **11**, 590-595.
- [127] Müller,R.H., Lherm,C., Herbort,J., Blunk,T., & Couvreur,P. (1992) Alkylcyanoacrylate drug carriers: I. Physicochemical characterization of nanoparticles with different alkyl chain length. *International Journal of Pharmaceutics* **84**, 1-11.
- [128] Henry-Michelland,S., Alonso,M.J., Andremon,A., Maincen,P., Sauzières,J., & Couvreur,P. (1987) Attachment of antibiotics to nanoparticles: preparation, drug-release and antimicrobial activity in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* **35**, 121-127.
- [129] Couvreur,P., Kante,B., Grislain,L., Roland,M., & Speiser,P. (1982) Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **71**, 790-792.
- [130] Kante,B., Couvreur,P., Dubois-Krack,G., De,M.C., Guiot,P., Roland,M., Mercier,M., & Speiser,P. (1982) Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles I: Free nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **71**, 786-790.

6. Literaturverzeichnis

- [131] Kayser,K., Zeillinger,C., Zeng,F.Y., Gabius,S., Gabius,H.J., & Weiser,W.Y. (1993) Detection of the lymphokine migration inhibitory factor in normal and disease-affected lung by antibody and by its major binding protein, the interferon antagonist sarcolectin. *Pathol. Res. Pract.* **189**, 992-995.
- [132] Gipps,E.M., Groscurth,P., Kreuter,J., & Speiser,P.P. (1987) The effects of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles on human normal and malignant mesenchymal cells in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* **40**, 23-31.
- [133] Cruz,T., Gaspar,R., Donato,A., & Lopes,C. (1997) Interaction between polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and peritoneal macrophages: MTT metabolism, NBT reduction, and NO production. *Pharm. Res.* **14**, 73-79.
- [134] Oldendorf,W.H. (1970) Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Res.* **24**, 372-376.
- [135] Pardridge,W.M. (1995) Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Advanced Drug Delivery Reviews* **15**, 5-36.
- [136] Fenstermacher,J.D., Blasberg,R.G., & Patlak,C.S. (1981) Methods for Quantifying the transport of drugs across brain barrier systems. *Pharmacol. Ther.* **14**, 217-248.
- [137] Hardebo,J.E. & Nilsson,B. (1979) Estimation of cerebral extraction of circulating compounds by the brain uptake index method: influence of circulation time, volume injection, and cerebral blood flow. *Acta Physiol Scand.* **107**, 153-159.
- [138] Tamai,I. & Tsuji,A. (1996) Drug delivery through the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* **19**, 401-424.
- [139] Takasato,Y., Rapoport,S.I., & Smith,Q.R. (1984) An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **247**, H484-H493.
- [140] Zlokovic,B.V., Begley,D.J., Djuricic,B.M., & Mitrovic,D.M. (1986) Measurement of solute transport across the blood-brain barrier in the perfused guinea pig brain: method and application to N-methyl-alpha-aminoisobutyric acid. *J. Neurochem.* **46**, 1444-1451.
- [141] Triguero,D., Buciak,J., & Pardridge,W.M. (1990) Capillary depletion method for quantification of blood-brain barrier transport of circulating peptides and plasma proteins. *J. Neurochem.* **54**, 1882-1888.
- [142] Cerletti,A., Drewe,J., Fricker,G., Eberle,A.N., & Huwyler,J. (2000) Endocytosis and transcytosis of an immunoliposome-based brain drug delivery system. *J. Drug Target* **8**, 435-446.
- [143] Alvarez,F.D., Schafer,M.K., Ferger,B., Gross,S., Westermann,R., Weihe,E., & Kuschinsky,K. (2001) Sensitization to the behavioural effects of cocaine: alterations in tyrosine hydroxylase or endogenous opioid mRNAs are not necessarily involved. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **363**, 288-294.
- [144] de Lange,E.C., Hesselink,M.B., Danhof,M., de Boer,A.G., & Breimer,D.D. (1995) The use of intracerebral microdialysis to determine changes in blood-brain barrier transport characteristics. *Pharm. Res.* **12**, 129-133.

6. Literaturverzeichnis

- [145] de Lange,E.C., Danhof,M., de Boer,A.G., & Breimer,D.D. (1994) Critical factors of intracerebral microdialysis as a technique to determine the pharmacokinetics of drugs in rat brain. *Brain Res.* **666**, 1-8.
- [146] de Lange,E.C., Danhof,M., de Boer,A.G., & Breimer,D.D. (1997) Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **25**, 27-49.
- [147] de Lange,E.C., de,B.G., Schinkel,A.H., de Boer,A.G., & Breimer,D.D. (1998) BBB transport and P-glycoprotein functionality using MDR1A (-/-) and wild-type mice. Total brain versus microdialysis concentration profiles of rhodamine-123. *Pharm. Res.* **15**, 1657-1665.
- [148] Terasaki,T., Deguchi,Y., Sato,H., Hirai,K., & Tsuji,A. (1991) In vivo transport of a dynorphin-like analgesic peptide, E-2078, through the blood-brain barrier: an application of brain microdialysis. *Pharm. Res.* **8**, 815-820.
- [149] Cheng,Q., Feng,J., Chen,J., Zhu,X., & Li,F. (2008) Brain transport of neurotoxin-I with PLA nanoparticles through intranasal administration in rats: a microdialysis study. *Biopharm. Drug Dispos.* **29**, 431-439.
- [150] de Boer,A.G. & Breimer,D.D. (1996) Reconstitution of the blood-brain barrier in cell culture for studies of drug transport and metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews* **22**, 251-264.
- [151] Takakura,Y., Audus,K.L., & Borchardt,R.T. (1991) Blood-brain barrier: transport studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells. *Adv. Pharmacol.* **22**, 137-165.
- [152] Williams,S.K., Gillis,J.F., Matthews,M.A., Wagner,R.C., & Bitensky,M.W. (1980) Isolation and characterization of brain endothelial cells: morphology and enzyme activity. *J. Neurochem.* **35**, 374-381.
- [153] Lasbennes,F. & Gayet,J. (1984) Capacity for energy metabolism in microvessels isolated from rat brain. *Neurochem. Res.* **9**, 1-10.
- [154] Pardridge,W.M. (1988) New directions in blood-brain barrier research. Studies with isolated human brain capillaries. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **529**, 50-60.
- [155] Joo,F. (1992) The cerebral microvessels in culture, an update. *J. Neurochem.* **58**, 1-17.
- [156] Joo,F. (1993) The blood-brain barrier in vitro: the second decade. *Neurochem. Int.* **23**, 499-521.
- [157] Tontsch,U. & Bauer,H.C. (1989) Isolation, characterization, and long-term cultivation of porcine and murine cerebral capillary endothelial cells. *Microvasc. Res.* **37**, 148-161.
- [158] Bowman,P.D., Betz,A.L., Ar,D., Wolinsky,J.S., Penney,J.B., Shivers,R.R., & Goldstein,G.W. (1981) Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro* **17**, 353-362.

6. Literaturverzeichnis

- [159] Rubin,L.L., Hall,D.E., Porter,S., Barbu,K., Cannon,C., Horner,H.C., Janatpour,M., Liaw,C.W., Manning,K., Morales,J., & . (1991) A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* **115**, 1725-1735.
- [160] Biegel,D., Spencer,D.D., & Pachter,J.S. (1995) Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties in vitro. *Brain Res.* **692**, 183-189.
- [161] Audus,K.L. & Borchardt,R.T. (1987) Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for the blood-brain barrier. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **507**, 9-18.
- [162] Audus,K.L. & Borchardt,R.T. (1986) Characterization of an In Vitro Blood-Brain Barrier Model System for Studying Drug Transport and Metabolism. *Pharmaceutical Research* **3**, 81-87.
- [163] Meyer,J., Mischeck,U., Veyhl,M., Henzel,K., & Galla,H.J. (1990) Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* **514**, 305-309.
- [164] Franke,H., Galla,H., & Beuckmann,C.T. (2000) Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **5**, 248-256.
- [165] D.Lechardeur, B.Schwartz, & D.Scherman (1997) Rat brain microvessel endothelial cells: primary cultures and immortalized differentiated cell line. In Drug transport across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo techniques (Albertus G.De Boer & Win Sutanto, eds), pp. 27-34. Harwood Scientific Publisher, Amsterdam.
- [166] DeBault,L.E. (1981) [gamma]-Glutamyltranspeptidase induction mediated by glial foot process-to endothelium contact in co-culture. *Brain Research* **220**, 432-435.
- [167] Raub,T.J., Kuentzel,S.L., & Sawada,G.A. (1992) Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp. Cell Res.* **199**, 330-340.
- [168] Tontsch,U. & Bauer,H.C. (1991) Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res.* **539**, 247-253.
- [169] Roux,F., Durieu-Trautmann,O., Chaverot,N., Claire,M., Maily,P., Bourre,J.M., Strosberg,A.D., & Couraud,P.O. (1994) Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J. Cell Physiol* **159**, 101-113.
- [170] Durieu-Trautmann,O., Foignant-Chaverot,N., Perdomo,J., Gounon,P., Strosberg,A.D., & Couraud,P.O. (1991) Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **27A**, 771-778.
- [171] Neuhaus,W., Plattner,V.E., Wirth,M., Germann,B., Lachmann,B., Gabor,F., & Noe,C.R. (2008) Validation of in vitro cell culture models of the blood-brain barrier: tightness characterization of two promising cell lines. *J. Pharm. Sci.* **97**, 5158-5175.
- [172] Zhang,Y., Li,C.S., Ye,Y., Johnson,K., Poe,J., Johnson,S., Bobrowski,W., Garrido,R., & Madhu,C. (2006) Porcine brain microvessel endothelial cells as an in

6. Literaturverzeichnis

- vitro model to predict in vivo blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos.* **34**, 1935-1943.
- [173] Yang,T., Roder,K.E., & Abbruscato,T.J. (2007) Evaluation of bEnd5 cell line as an in vitro model for the blood-brain barrier under normal and hypoxic/aglycemic conditions. *J. Pharm. Sci.* **96**, 3196-3213.
- [174] Cucullo,L., Couraud,P.O., Weksler,B., Romero,I.A., Hossain,M., Rapp,E., & Janigro,D. (2008) Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **28**, 312-328.
- [175] Fahr,A. & Kissel,T. (1997) Mikropartikel und Implantate: Arzneiformen zur parenteralen Applikation. In Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen (R.H.Müller,G.E.H., ed), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart.
- [176] Gopferich,A. (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* **17**, 103-114.
- [177] Stricker,H. (1969) Die in-vitro-Untersuchung der ‚Verfügbarkeit von Arzneistoffen‘ im Gastrointestinaltrakt. *Pharm. Ind.* **31**, 794-799.
- [178] Siewert,M., Dressman,J., Brown,C.K., & Shah,V.P. (2003) FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS. PharmSciTech.* **4**, E7.
- [179] Redhead,H.M., Davis,S.S., & Illum,L. (2001) Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J. Control Release* **70**, 353-363.
- [180] Matsumoto,J., Nakada,Y., Sakurai,K., Nakamura,T., & Takahashi,Y. (1999) Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro. *Int. J. Pharm.* **185**, 93-101.
- [181] Witschi,C. & Doelker,E. (1998) Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *Journal of Controlled Release* **51**, 327-341.
- [182] Shah,N.H., Railkar,A.S., Chen,F.C., Tarantino,R., Kumar,S., Murjani,M., Palmer,D., Infeld,M.H., & Malick,A.W. (1993) A biodegradable injectable implant for delivering micro and macromolecules using poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers. *Journal of Controlled Release* **27**, 139-147.
- [183] Wada,R., Hyon,S.H., Nakamura,T., & Ikada,Y. (1991) In vitro evaluation of sustained drug release from biodegradable elastomer. *Pharm. Res.* **8**, 1292-1296.
- [184] Polakovic,M., Gerner,T., Gref,R., & Dellacherie,E. (1999) Lidocaine loaded biodegradable nanospheres. II. Modelling of drug release. *J. Control Release* **60**, 169-177.
- [185] Huang,C.Y., Chen,C.M., & Lee,Y.D. (2007) Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion. *Int. J. Pharm.* **338**, 267-275.

6. Literaturverzeichnis

- [186] Avgoustakis,K., Beletsi,A., Panagi,Z., Klepetsanis,P., Karydas,A.G., & Ithakissios,D.S. (2002) PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J. Control Release* **79**, 123-135.
- [187] Mulik,R., Mahadik,K., & Paradkar,A. (2009) Development of curcuminoids loaded poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles: Physicochemical characterization and stability study. *Eur. J. Pharm. Sci.* **37**, 395-404.
- [188] Yadav,A.K., Mishra,P., Jain,S., Mishra,P., Mishra,A.K., & Agrawal,G.P. (2008) Preparation and characterization of HA-PEG-PCL intelligent core-corona nanoparticles for delivery of doxorubicin. *J. Drug Target* **16**, 464-478.
- [189] Yang,Y., Hua,C., & Dong,C.M. (2009) Synthesis, self-assembly, and in vitro doxorubicin release behavior of dendron-like/linear/dendron-like poly(epsilon-caprolactone)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(epsilon-caprolactone) triblock copolymers. *Biomacromolecules*. **10**, 2310-2318.
- [190] Missirlis,D., Kawamura,R., Tirelli,N., & Hubbell,J.A. (2006) Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **29**, 120-129.
- [191] Fontana,G., Licciardi,M., Mansueto,S., Schillaci,D., & Giammona,G. (2001) Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake. *Biomaterials* **22**, 2857-2865.
- [192] Cetin,M., Aktas,Y., Vural,I., Capan,Y., Dogan,L.A., Duman,M., & Dalkara,T. (2007) Preparation and in vitro evaluation of bFGF-loaded chitosan nanoparticles. *Drug Deliv.* **14**, 525-529.
- [193] Alyautdin,R.N., Petrov,V.E., Langer,K., Berthold,A., Kharkevich,D.A., & Kreuter,J. (1997) Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.* **14**, 325-328.
- [194] Petri,B., Bootz,A., Khalansky,A., Hekmatara,T., Muller,R., Uhl,R., Kreuter,J., & Gelperina,S. (2007) Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J. Control Release* **117**, 51-58.
- [195] Batrakova,E.V., Li,S., Vinogradov,S.V., Alakhov,V.Y., Miller,D.W., & Kabanov,A.V. (2001) Mechanism of Pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier:Contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 483-493.
- [196] Aktories,K. & Unger,C. (2009) Mittel zur Behandlung von Tumoren-Tumorchemotherapeutika. In Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie (Aktories,K., Förstermann,U., Hofmann F.B., & Starke,K., eds), pp. 956-961. Elsevier, München.
- [197] Steiniger,S.C., Kreuter,J., Khalansky,A.S., Skidan,I.N., Bobruskin,A.I., Smirnova,Z.S., Severin,S.E., Uhl,R., Kock,M., Geiger,K.D., & Gelperina,S.E. (2004) Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer* **109**, 759-767.

6. Literaturverzeichnis

- [198] Kreuter, J. & Gelperina, S. (2008) Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori* **94**, 271-277.
- [199] Plosker, G.L. (2008) Pegylated liposomal Doxorubicin: a review of its use in the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *Drugs* **68**, 2535-2551.
- [200] Schneider, S.W., Ludwig, T., Tatenhorst, L., Braune, S., Oberleithner, H., Senner, V., & Paulus, W. (2004) Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathol.* **107**, 272-276.
- [201] Mosskin, M., von, H.H., Ericson, K., & Noren, G. (1986) The blood tumour barrier in intracranial tumours studied with X-ray computed tomography and positron emission tomography using 68-Ga-EDTA. *Neuroradiology* **28**, 259-263.
- [202] Menna, P., Salvatorelli, E., & Minotti, G. (2009) Anthracycline Degradation in Cardiomyocytes: A Journey to Oxidative Survival. *Chem. Res. Toxicol.*
- [203] Lominadze, D., Roberts, A.M., Tyagi, N., Moshal, K.S., & Tyagi, S.C. (2006) Homocysteine causes cerebrovascular leakage in mice. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **290**, H1206-H1213.
- [204] Ates, N., Esen, N., & Ilbay, G. (1999) Absence epilepsy and regional blood-brain barrier permeability: the effects of pentylenetetrazole-induced convulsions. *Pharmacol. Res.* **39**, 305-310.
- [205] Alyautdin, R.N., Tezikov, E.B., Ramge, P., Kharkevich, D.A., Begley, D.J., & Kreuter, J. (1998) Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by adsorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an in situ brain perfusion study. *J. Microencapsul.* **15**, 67-74.
- [206] Aliautdin, R.N., Kreuter, J., & Kharkevich, D.A. (2003) [Drug delivery to the brain with nanoparticles]. *Eksp. Klin. Farmakol.* **66**, 65-68.
- [207] Holzer, M., Barnert, S., Momm, J., & Schubert, R. (2009) Preparative size exclusion chromatography combined with detergent removal as a versatile tool to prepare unilamellar and spherical liposomes of highly uniform size distribution. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5838-5848.
- [208] Jederstrom, G. & Russell, G. (1981) Size exclusion chromatography of liposomes on different gel media. *J. Pharm. Sci.* **70**, 874-878.
- [209] Martins, M.B., Supico, A., Simoes, S.I., Gaspar, R., & Cruz, M.E. (1997) An analytical methodology to quantify the incorporation of enzymes in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles based on size exclusion chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**, 811-818.
- [210] Samuelsen, H., Karlsson-Borga, A., Paulsen, B.S., Wold, J.K., & Rolfsen, W. (1991) Purification of a 20 kD allergen from *Aspergillus fumigatus*. *Allergy* **46**, 115-124.
- [211] Beck, P., Scherer, D., & Kreuter, J. (1990) Separation of drug-loaded nanoparticles from free drug by gel filtration. *J. Microencapsul.* **7**, 491-496.
- [212] Mulik, R., Mahadik, K., & Paradkar, A. (2009) Development of curcuminoids loaded poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles: Physicochemical characterization and stability study. *Eur. J. Pharm. Sci.* **37**, 395-404.

6. Literaturverzeichnis

- [213] Sullivan,C.O. & Birkinshaw,C. (2004) In vitro degradation of insulin-loaded poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* **25**, 4375-4382.
- [214] Mori,S. & Barth H.G. (1999) Special Applications. In Size exclusion Chromatography (Springer laboratory, ed), pp. 189-191. Springer, Nagoya.
- [215] [http: & commons.wikimedia.org/wiki/File:Doxorubicin-3D.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Doxorubicin-3D.png). Doxorubicin 3D Model. 2008. Wikimedia commons.
Ref Type: Online Source
- [216] Tavoloni,N., Guarino,A.M., & Berk,P.D. (1980) Photolytic degradation of adriamycin. *J. Pharm. Pharmacol.* **32**, 860-862.
- [217] Poochikian,G.K., Craddock,J.C., & Flora,K.P. (1981) Stability of anthracycline antitumor agents in four infusion fluids. *Am. J. Hosp. Pharm.* **38**, 483-486.
- [218] Tavoloni,N. & Guarino,A.M. (1980) Disposition and metabolism of adriamycin in the rat. *Pharmacology* **21**, 244-255.
- [219] Maniez-Devos,D.M., Baurain,R., Lesne,M., & Trouet,A. (1986) Degradation of doxorubicin and daunorubicin in human and rabbit biological fluids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **4**, 353-365.
- [220] He,M., Zhao,Z., Yin,L., Tang,C., & Yin,C. (2009) Hyaluronic acid coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles as anticancer drug carriers. *Int. J. Pharm.* **373**, 165-173.
- [221] He,W., Jiang,X., & Zhang,Z.R. (2008) Preparation and evaluation of poly-butylcyanoacrylate nanoparticles for oral delivery of thymopentin. *J. Pharm. Sci.* **97**, 2250-2259.
- [222] Maniez-Devos,D.M., Baurain,R., Trouet,A., & Lesne,M. (1985) Doxorubicin pharmacokinetics in the rabbit. *J. Pharmacol.* **16**, 159-169.
- [223] Rivory,L.P., Pond,S.M., & Winzor,D.J. (1992) The influence of pH on the interaction of lipophilic anthracyclines with bovine serum albumin. Quantitative characterization by measurement of fluorescence quenching. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 2347-2355.
- [224] Bauer,B. In vitro Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke zur Untersuchung der Permeation und P-Glycoprotein-Interaktion von Arzneistoffen. 2002.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- [225] Matsumura,T., Yamanaka,T., Hashizume,S., Irie,Y., & Nitta,K. (1975) Tissue dispersion, cell harvest and fluid suspension culture by the use of bacterial neutral protease. *Jpn. J. Exp. Med.* **45**, 377-382.
- [226] Nagata,M. & Matsumura,T. (1986) Action of the bacterial neutral protease, dispase, on cultured cells and its application to fluid suspension culture with a review on biomedical application of this protease. *Jpn. J. Exp. Med.* **56**, 297-307.
- [227] Pertoft,H., Laurent,T.C., Laas,T., & Kagedal,L. (1978) Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal. Biochem.* **88**, 271-282.

6. Literaturverzeichnis

- [228] Gessner,A., Olbrich,C., Schroder,W., Kayser,O., & Muller,R.H. (2001) The role of plasma proteins in brain targeting: species dependent protein adsorption patterns on brain-specific lipid drug conjugate (LDC) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **214**, 87-91.
- [229] Goppert,T.M. & Muller,R.H. (2003) Plasma protein adsorption of Tween 80- and poloxamer 188-stabilized solid lipid nanoparticles. *J. Drug Target* **11**, 225-231.
- [230] Kim,H.R., Gil,S., Andrieux,K., Nicolas,V., Appel,M., Chacun,H., Desmaele,D., Taran,F., Georgin,D., & Couvreur,P. (2007) Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 356-364.
- [231] Kratzer,I., Wernig,K., Panzenboeck,U., Bernhart,E., Reicher,H., Wronski,R., Windisch,M., Hammer,A., Malle,E., Zimmer,A., & Sattler,W. (2007) Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an in vitro model of the blood-brain barrier. *J. Control Release* **117**, 301-311.
- [232] Kreuter,J., Shamenkov,D., Petrov,V., Ramge,P., Cychutek,K., Koch-Brandt,C., & Alyautdin,R. (2002) Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J. Drug Target* **10**, 317-325.
- [233] Kreuter,J., Hekmatara,T., Dreis,S., Vogel,T., Gelperina,S., & Langer,K. (2007) Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J. Control Release* **118**, 54-58.
- [234] Michaelis,K., Hoffmann,M.M., Dreis,S., Herbert,E., Alyautdin,R.N., Michaelis,M., Kreuter,J., & Langer,K. (2006) Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 1246-1253.
- [235] Zensi,A., Begley,D., Pontikis,C., Legros,C., Mihoreanu,L., Wagner,S., Buchel,C., von,B.H., & Kreuter,J. (2009) Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J. Control Release* **137**, 78-86.
- [236] Shamenkov,D.A., Petrov,V.E., & Alyautdin,R.N. (2006) Effects of apolipoproteins on dalargin transport across the blood-brain barrier. *Bull. Exp. Biol. Med.* **142**, 703-706.
- [237] Aliautdin,R.N., Petrov,V.E., Ivanov,A.A., Kreuter,J., & Kharkevich,D.A. (1996) [Transport of the hexapeptide dalargin across the hemato-encephalic barrier into the brain using polymer nanoparticles]. *Eksp. Klin. Farmakol.* **59**, 57-60.
- [238] Aliautdin,R.N., Petrov,V.E., Langer,K., Berthold,A., Kreuter,J., & Kharkevich,D.A. (1998) [The delivery of loperamide to the brain by using polybutyl cyanoacrylate nanoparticles]. *Eksp. Klin. Farmakol.* **61**, 17-20.
- [239] Ambruosi,A., Yamamoto,H., & Kreuter,J. (2005) Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [¹⁴C]poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i.v. administration in rats. *J. Drug Target* **13**, 535-542.
- [240] Ramge,P., Unger,R.E., Oltrogge,J.B., Zenker,D., Begley,D., Kreuter,J., & von,B.H. (2000) Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1931-1940.

6. Literaturverzeichnis

- [241] Weiss,C.K., Kohnle,M.V., Landfester,K., Hauk,T., Fischer,D., Schmitz-Wienke,J., & Mailander,V. (2008) The first step into the brain: uptake of NIO-PBCA nanoparticles by endothelial cells in vitro and in vivo, and direct evidence for their blood-brain barrier permeation. *ChemMedChem*. **3**, 1395-1403.
- [242] Jallouli,Y., Paillard,A., Chang,J., Sevin,E., & Betbeder,D. (2007) Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood-brain barrier in vitro. *Int. J. Pharm.* **344**, 103-109.
- [243] Lockman,P.R., Koziara,J.M., Mumper,R.J., & Allen,D.D. (2004) Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J. Drug Target* **12**, 635-641.
- [244] Lu,W., Tan,Y.Z., Hu,K.L., & Jiang,X.G. (2005) Cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle with its transcytosis ability and little toxicity against blood-brain barrier. *Int. J. Pharm.* **295**, 247-260.
- [245] Olivier,J.C., Fenart,L., Chauvet,R., Pariat,C., Cecchelli,R., & Couet,W. (1999) Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharm. Res.* **16**, 1836-1842.
- [246] Sharma,H.S. & Sharma,A. (2007) Nanoparticles aggravate heat stress induced cognitive deficits, blood-brain barrier disruption, edema formation and brain pathology. *Prog. Brain Res.* **162**, 245-273.
- [247] Schwedat Anke. Transportstudien von Nanopartikeln an verschiedenen Blut-Hirn Schranke Modellen in vitro. 2006.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- [248] Drewes,L.R., Horton,R.W., Betz,A.L., & Gilboe,D.D. (1977) Cytochalasin B inhibition of brain glucose transport and the influence of blood components on inhibitor concentration. *Biochim. Biophys. Acta* **471**, 477-486.
- [249] Kirkpatrick,J.P., McIntire,L.V., Moake,J.L., & Cimo,P.L. (1980) Differential effects of cytochalasin B on platelet release, aggregation and contractility: evidence against a contractile mechanism for the release of platelet granular contents. *Thromb. Haemost.* **42**, 1483-1489.
- [250] Liang,X.J., Yin,J.J., Taylor,B., Winkovitch,S.M., Garfield,S.H., Shen,D.W., Gottesman,M.M., & Aszalos,A. (2008) Disruption of microfilaments by cytochalasin B decreases accumulation of cisplatin in human epidermal carcinoma and liver carcinoma cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **62**, 977-984.
- [251] Painter,R.G., Whisenand,J., & McIntosh,A.T. (1981) Effects of cytochalasin B on actin and myosin association with particle binding sites in mouse macrophages: implications with regard to the mechanism of action of the cytochalasins. *J. Cell Biol.* **91**, 373-384.
- [252] Kim,H.R., Gil,S., Andrieux,K., Nicolas,V., Appel,M., Chacun,H., Desmaele,D., Taran,F., Georjgin,D., & Couvreur,P. (2007) Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 356-364.

6. Literaturverzeichnis

- [253] Kreuter,J., Ramge,P., Petrov,V., Hamm,S., Gelperina,S.E., Engelhardt,B., Alyautdin,R., von,B.H., & Begley,D.J. (2003) Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm. Res.* **20**, 409-416.
- [254] Kim,H.R., Andrieux,K., Delomenie,C., Chacun,H., Appel,M., Desmaele,D., Taran,F., Georgin,D., Couvreur,P., & Taverna,M. (2007) Analysis of plasma protein adsorption onto PEGylated nanoparticles by complementary methods: 2-DE, CE and Protein Lab-on-chip system. *Electrophoresis* **28**, 2252-2261.
- [255] Shahan,T.A., Siegel,P.D., Sorenson,W.G., Kuschner,W.G., & Lewis,D.M. (1994) A sensitive new bioassay for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* **175**, 181-187.
- [256] Nociari,M.M., Shalev,A., Benias,P., & Russo,C. (1998) A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **213**, 157-167.
- [257] Ahmed,S.A., Gogal,R.M., Jr., & Walsh,J.E. (1994) A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* **170**, 211-224.
- [258] Alberts,B. (2002) *Molecular Biology of the cell 4th ed.*
- [259] Alyautdin,R.N., Reichel,A., Lobenberg,R., Ramge,P., Kreuter,J., & Begley,D.J. (2001) Interaction of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles with the blood-brain barrier in vivo and in vitro. *J. Drug Target* **9**, 209-221.
- [260] Kreuter,J., Ramge,P., Petrov,V., Hamm,S., Gelperina,S.E., Engelhardt,B., Alyautdin,R., von,B.H., & Begley,D.J. (2003) Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm. Res.* **20**, 409-416.